

4. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, где HC CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

5. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, которая кодирует любую переменную область легкой цепи, перечисленную в SEQ ID NO:32, 31 или 33-42.

6. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, которая кодирует любую переменную область тяжелой цепи, перечисленную в SEQ ID NO:32, 31 или 33-42.

7. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, которая кодирует переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи аминокислотной последовательности, перечисленной в SEQ ID NO:32, 31 или 33-42.

8. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-7, в которой анти-CD19-связывающий домен представляет собой scFv.

9. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 7, в которой анти-CD19 связывающий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичности с ней.

10. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 7, в которой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая анти-CD19 связывающий домен, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72, или последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с ними.

11. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 7, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95 и SEQ ID NO: 96, или последовательности нуклеиновой кислоты с по меньшей мере 95% идентичности с ней.

12. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-7, в которой кодируемый CAR содержит трансмембранный домен, который представляет собой трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа, бета или дзета-цепи T-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154.

13. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 12, в которой кодируемый CAR содержит трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен альфа-цепи CD8.

14. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-7, где кодируемый трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая трансмембранный домен, содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 56, или последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с ней.

15. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-7, в которой кодируемый анти-CD19 связывающий домен связан с трансмембранным доменом с помощью шарнирной области.

16. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.15, в которой шарнирная область представляет собой альфа-шарнир CD8.

17. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.15, в которой кодируемая шарнирная область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с ней, или

в которой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая шарнирную область, содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 55, или последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с ней.

18. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-7, где внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий домен.

19. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.18, в которой костимулирующий домен представляет собой функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137).

20. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.18, в которой кодируемый костимулирующий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, или

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая костимулирующий домен, содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 60, или последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с ней.

21. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-7, где внутриклеточный сигнальный домен содержит основной сигнальный домен.

22. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-7, в которой кодируемый внутриклеточный сигнальный домен содержит функциональный сигнальный домен 4-1BB и/или функциональный сигнальный домен CD3-дзета.

23. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-7, в которой кодируемый внутриклеточный сигнальный домен содержит: (i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 и/или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 43, или (ii) аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16 и/или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 43.

24. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-7, в которой кодируемый внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 43, при этом последовательности, составляющие внутриклеточный сигнальный домен, экспрессированы в одной и той же рамке считывания и в виде одной полипептидной цепи.

25. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-7, в которой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая внутриклеточный сигнальный домен, содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 60 или последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с ней, и/или последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 101 или SEQ ID NO: 44, или последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с ними.

26. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-7, дополнительно кодирующая лидерную последовательность.

27. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.26, в которой лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13

или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью SEQ ID NO: 13.

28. Выделенная молекула полипептида, кодируемая молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-27.

29. Выделенная молекула полипептида по п. 28, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:32, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41 и SEQ ID NO:42.

30. Выделенная молекула химерного антигенного рецептора (CAR), содержащая: (i) антитело или фрагмент антитела, которые содержат анти-CD19 связывающий домен, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный сигнальный домен,

где анти-CD19 связывающий домен содержит

определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LC CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25,

определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (LC CDR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26,

определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (LC CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27,

определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HC CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19,

определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (HC CDR2), содержащую любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 22, 21 или 23, и

определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (HC CDR3) содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

31. Выделенная молекула CAR по п. 30, где HC CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

32. Выделенная молекула CAR по п. 30, где HC CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

33. Выделенная молекула CAR по п. 30, где HC CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

34. Выделенная молекула CAR по любому из пунктов 30-33, в которой анти-CD19 связывающий домен представляет собой scFv.

35. Выделенная молекула CAR по любому из пунктов 30-33, в которой анти-CD19 связывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, перечисленной в SEQ ID NO: 32, 31 или 33-42.

36. Выделенная молекула CAR по любому из пунктов 30-33, в которой анти-CD19 связывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи, перечисленную в SEQ ID NO: 32, 31 или 33-42.

37. Выделенная молекула CAR по любому из пунктов 30-33, в которой анти-CD19 связывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, перечисленную в SEQ ID NO: 32, 31 или 33-42.

38. Выделенная молекула CAR по п. 35, в которой анти-CD19 связывающий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичности с ними.

39. Выделенная молекула CAR по любому из пунктов 30-33, дополнительно содержащая трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из

альфа, бета или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154.

40. Выделенная молекула CAR по п.39, которая содержит трансмембранный домен альфа-цепи CD8.

41. Выделенная молекула CAR по п.39, где трансмембранный домен содержит

(i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, или

(ii) аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15.

42. Выделенная молекула CAR по любому из пунктов 30-33, в которой гуманизированный анти-CD19 связывающий домен связан с трансмембранным доменом с помощью шарнирной области.

43. Выделенная молекула CAR по п.42, в которой шарнирная область представляет собой альфа-шарнир CD8.

44. Выделенная молекула CAR по п.42, где шарнирная область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с ними.

45. Выделенная молекула CAR по любому из пунктов 30-33, где внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий домен.

46. Выделенная молекула CAR по п.45, в которой костимулирующий домен представляет собой функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137).

47. Выделенная молекула CAR по п.45, в которой костимулирующий домен содержит

(i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, или

(ii) аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16.

48. Выделенная молекула CAR по любому из пунктов 30-33, где внутриклеточный сигнальный домен содержит основной сигнальный домен.

49. Выделенная молекула CAR по п. 48, в которой внутриклеточный сигнальный домен содержит функциональный сигнальный домен 4-1BB и/или функциональный сигнальный домен CD3-дзета.

50. Выделенная молекула CAR по п. 48, в которой внутриклеточный сигнальный домен содержит

(i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 и/или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 и/или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, или

(ii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16 и/или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 43.

51. Выделенная молекула CAR по п. 48, в которой внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 43, при этом последовательности, составляющие внутриклеточный сигнальный домен, экспрессированы в одной и той же рамке считывания и в виде одной полипептидной цепи.

52. Выделенная молекула CAR по любому из пунктов 30-33, дополнительно содержащая лидерную последовательность.

53. Выделенная молекула CAR по п.52, в которой лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или аминокислотная последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13.

54. Анти-CD19 связывающий домен, содержащий определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LC CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (LC CDR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (LC CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HC CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (HC CDR2), содержащую любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 22, 21 или 23, и определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (HC CDR3) содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.
55. Анти-CD19 связывающий домен по п. 54, где HC CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.
56. Анти-CD19 связывающий домен по п. 54, где HC CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.
57. Анти-CD19 связывающий домен по п. 54, где HC CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.
58. Анти-CD19 связывающий домен по п. 54, содержащий переменную область легкой цепи, перечисленную в SEQ ID NO: 32, 31 или 33-42.
59. Анти-CD19 связывающий домен по п. 54, содержащий переменную область тяжелой цепи, перечисленную в SEQ ID NO: 32, 31 или 33-42.
60. Анти-CD19 связывающий домен по п. 54, содержащий scFv, содержащий переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи любой аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 32, 31 или 33-42.
61. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу CAR по любому из пп. 30-53.
62. Вектор по п.61, выбранный из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды или вирусного вектора.
63. Вектор по п. 62, который представляет собой лентивирусный вектор, аденовирусный вектор или ретровирусный вектор.
64. Вектор по любому из пп.61-63, дополнительно содержащий промотор.
65. Вектор по п.64, в котором промотор представляет собой промотор EF-1.
66. Вектор по п.65, в котором промотор EF-1 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 100.
67. Вектор по любому из пп. 61-63, представляющий собой *in vitro* транскрибируемый вектор.
68. Вектор по любому из пп. 61-63, в котором последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит поли(А)-последовательность.
69. Вектор по любому из пп. 61-63, в котором последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит 3'UTR.
70. Клетка, экспрессирующая молекулу CAR по любому из пп. 30-53, содержащая вектор по любому из пп. 61-69.
71. Клетка, экспрессирующая молекулу CAR по любому из пп. 30-53, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-27.
72. Клетка для лечения млекопитающего, страдающего пролиферативным заболеванием, ассоциированным с экспрессией CD19, содержащая молекулу CAR по любому из пп. 30-53.
73. Клетка по любому из пп.70-72, представляющая собой человеческую Т-клетку.

74. Клетка по п.73, представляющая собой CD8+ Т-клетку.
75. Клетка по любому из пп. 70-72, дополнительно экспрессирующая ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанный со вторым полипептидом, который обеспечивает положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена.
76. Клетка по п.75, в которой ингибирующая молекула содержит первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть PD1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и основной сигнальный домен.
77. Способ получения клетки, включающий трансдуцирование Т-клетки вектором по любому из пунктов 61-69 или молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-27.
78. Способ получения популяции клеток с генетически измененной РНК, включающий введение *in vitro* транскрибированной РНК или синтетической РНК в клетку, при этом РНК содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу CAR по любому из пп. 30-53.
79. Применение клетки, экспрессирующей молекулу CAR по любому из пп. 30-53 для получения лекарственного средства для создания противоопухолевого иммунитета у млекопитающего.
80. Применение по п.79, в котором клетка представляет собой аутологичную Т-клетку.
81. Применение по п.79, в котором клетка представляет собой аллогенную Т-клетку.
82. Применение по п. 79 или 80, в котором млекопитающее является человеком.
83. Применение клетки по любому из пп. 70-76, молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-27 или молекулы CAR по любому из пп. 30-53 для получения лекарственного средства для лечения заболевания, ассоциированного с экспрессией CD19.
84. Применение по п.83, в котором заболевание, ассоциированное с экспрессией CD19, выбрано из группы, состоящей из рака или злокачественного заболевания, предракового состояния или не относящегося к раку симптома, ассоциированного с экспрессией CD19.
85. Применение по п.83 или 84, в котором пролиферативное заболевание представляет собой рак крови, выбранный из группы, состоящей из В-клеточного острого лимфобластного лейкоза («BALL»), Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза («TALL»), острого лимфобластного лейкоза (ALL), хронического миелогенного лейкоза (СML), хронического лимфоцитарного лейкоза (СLL), В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, новообразования из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток, лимфомы Беркитта, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, мелкоклеточной или крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественных лимфопролиферативных состояний, лимфомы MALT-типа, лимфомы из клеток мантийной зоны, лимфомы из клеток маргинальной зоны, множественной миеломы, миелодисплазии и миелодиспластического синдрома, неходжкинской лимфомы, плазмабластной лимфомы, новообразования из плазмцитоподобных дендритных клеток, макроглобулинемии Вальденстрема и предлейкоза, и их сочетаний.
86. Применение по п. 83 или 84, в котором клетку вводят в сочетании с агентом, который повышает эффективность клетки, агентом, который ослабляет один или более побочных эффектов, связанных с введением клетки, агентом, который лечит заболевание, ассоциированное с CD19, или агентом, который ингибирует ингибирующую молекулу, выбранную из PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160 или 2B4.

87. Применение по п. 83 или 84, где клетку вводят в дозе $10^4 - 10^9$ клеток/кг массы тела.

88. Применение по п. 83 или 84, где субъект получает одно или более последующих введений клетки по любому из пп. 70-76.

89. Применение по п. 83 или 84, где лечение включает одно или более введений в неделю клеток, экспрессирующих молекулу CAR.

90. Применение CD19 CAR клетки для получения лекарственного средства для лечения заболевания, ассоциированного с экспрессией CD19, где клетку вводят в сочетании с PD1 CAR, содержащим внеклеточный домен PD1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, где CD19 CAR представляет собой молекулу CAR по любому из пп. 30-53.

91. Применение по п. 90, где CD19 CAR и PD1 CAR экспрессируются в одной и той же клетке.

92. Применение по п. 83 или 84, где клетку вводят в сочетании с агонистом GITR.

93. Применение по п. 83 или 84, где клетку вводят в сочетании с ингибитором IL-6.

94. Применение по п. 83 или 84, где клетку вводят в сочетании с ингибитором mTOR.

95. Применение CD19 CAR клетки для получения лекарственного средства для клеточной симптоматической терапии перед трансплантацией клеток, где CD19 CAR клетка представляет собой клетку по любому из пп. 70-76.

96. Способ получения *in vitro* транскрибированной РНК, кодирующей CD19 CAR, включающий проведение транскрипции *in vitro* последовательности ДНК, кодирующей CD19 CAR, где CD19 CAR представляет собой молекулу CAR по любому из пп. 30-53.

97. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку по любому из пп. 70-76 и фармацевтически или физиологически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

98. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR, где CAR содержит, от N-конца к C-концу:

анти-CD19 связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2,

трансмембранный домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15,

костимулирующий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и

основной внутриклеточный сигнальный домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

RU 2020100865 A

RU 2020100865 A