



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2019126655, 20.08.2013

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
20.08.2012 US 61/691,117(62) Номер и дата подачи первоначальной заявки,  
из которой данная заявка выделена:  
2015109631 19.03.2015

(43) Дата публикации заявки: 12.11.2019 Бюл. № 32

Адрес для переписки:

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

(71) Заявитель(и):

**ФРЕД ХАТЧИНСОН КАНСЭР РИСЁЧ  
СЕНТЕР (US),  
СИЭТЛ ЧИЛДРЕН'С ХОСПИТАЛ,  
ДиБиЭй СИЭТЛ ЧИЛДРЕН'С РИСЕРЧ  
ИНСТИТЮТ (US)**

(72) Автор(ы):

**ДЖЕНСЕН, Майкл (US),  
РИДДЕЛЛ, Стенли, Р. (US),  
ГУДЕЧЕК, Михаэль (DE)**

(54) **НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, КОДИРУЮЩИЕ ХИМЕРНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, ПОЛИПЕПТИДНЫЕ ХИМЕРНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, КОДИРУЕМЫЕ ИМИ, ВЕКТОРЫ ЭКСПРЕССИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ИХ, ВЫДЕЛЕННЫЕ КЛЕТКИ-ХОЗЯЕВА, СОДЕРЖАЩИЕ ИХ, КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ВЫДЕЛЕННЫЕ КЛЕТКИ-ХОЗЯЕВА, А ТАКЖЕ СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫДЕЛЕННЫХ КЛЕТОК-ХОЗЯЕВ IN VITRO, СПОСОБЫ ВЫБОРА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ, КОДИРУЮЩИХ ХИМЕРНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, IN VITRO И СПОСОБЫ ПРОВЕДЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ У СУБЪЕКТА, ИМЕЮЩЕГО ОПУХОЛЬ**

## (57) Формула изобретения

1. Нуклеиновая кислота, кодирующая химерный рецептор, при этом нуклеиновая кислота содержит

(a) полинуклеотид, кодирующий антителио или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с ROR1;

(b) полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен;

(c) полинуклеотид, кодирующий полипептидный спейсер, расположенный между антителиом или его антигенсвязывающим фрагментом и трансмембранным доменом, где длина полипептидного спейсера составляет приблизительно 15 аминокислот или меньше; и

(d) полинуклеотид, кодирующий внутриклеточный сигнальный домен, который содержит сигнальный домен CD3ζ и костимулирующий домен.

2. Нуклеиновая кислота по п. 1, где антителио или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом ROR1, расположенным дистально по отношению к мембране.

3. Нуклеиновая кислота по п. 1 или п. 2, где антителио или антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом в Ig-подобном/Frizzled-домене ROR1.

4. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-3, где антителио или его антигенсвязывающий фрагмент содержат

вариабельный участок легкой цепи (VL), характеризующийся по меньшей мере 90%

идентичностью последовательности с VL-участком антитела к ROR1 R12; и  
вариабельный участок тяжелой цепи (VH), характеризующийся по меньшей мере 90%  
идентичностью с VH-участком антитела к ROR1 R12; и/или

вариабельный участок легкой цепи (VL), содержащий CDRL1, CDRL2 и CDRL3  
антитела к ROR1 R12, и вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий CDRH1,  
CDRH2 и CDRH3 антитела к ROR1 R12; или

вариабельный участок легкой цепи (VL) антитела к ROR1 2A2 и вариабельный участок  
тяжелой цепи (VH) антитела к ROR1 2A2.

5. Нуклеиновая кислота, кодирующая химерный рецептор, при этом нуклеиновая  
кислота содержит

(a) полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,  
которые связываются с опухолеассоциированным антигеном;

(b) полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен;

(c) полинуклеотид, кодирующий полипептидный спейсер, расположенный между  
антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и трансмембранным доменом,  
где длина полипептидного спейсера составляет от приблизительно 229 аминокислот  
или меньше до более приблизительно 119 аминокислот; и

(d) полинуклеотид, кодирующий внутриклеточный сигнальный домен, который  
содержит сигнальный домен CD3 $\zeta$  и костимулирующий домен.

6. Нуклеиновая кислота по п. 5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент  
связываются с эпитопом опухолеассоциированного антигена, расположенным  
проксимально по отношению к мембране.

7. Нуклеиновая кислота по п. 5 или 6, где опухолеассоциированный антиген  
представляет собой ROR1, и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент  
связываются с эпитопом в крингл-домене ROR1.

8. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 5-7, где антитело или его  
антигенсвязывающий фрагмент содержат

вариабельный участок легкой цепи (VL), характеризующийся по меньшей мере 90%  
идентичностью последовательности с VL-участком антитела к ROR1 R11; и  
вариабельный участок тяжелой цепи (VH), характеризующийся по меньшей мере 90%  
идентичностью с VH-участком антитела к ROR1 R11; и/или

вариабельный участок легкой цепи (VL), содержащий CDRL1, CDRL2 и CDRL3  
антитела к ROR1 R11, и вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий CDRH1,  
CDRH2 и CDRH3 антитела к ROR1 R11.

9. Нуклеиновая кислота по п. 5 или 6, где опухолеассоциированный антиген  
представляет собой HER2.

10. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 5, 6 и 9, где антитело или его  
антигенсвязывающий фрагмент содержат

вариабельный участок легкой цепи (VL), характеризующийся по меньшей мере 90%  
идентичностью последовательности с VL-участком антитела к HER2 герцептина; и  
вариабельный участок тяжелой цепи (VH), характеризующийся по меньшей мере 90%  
идентичностью с VH-участком антитела к HER2 герцептина; и/или

вариабельный участок легкой цепи (VL), содержащий CDRL1, CDRL2 и CDRL3  
антитела к HER2 герцептина, и вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий  
CDRH1, CDRH2 и CDRH3 антитела к HER2 герцептина.

11. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-10, где антитело или его  
антигенсвязывающий фрагмент содержат scFv.

12. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-11, где полипептидный спейсер содержит  
аминокислотную последовательность X<sub>1</sub>PPX<sub>2</sub>P, где X<sub>1</sub> представляет собой цистеин,  
глицин или аргинин, и X<sub>2</sub> представляет собой цистеин или треонин (SEQ ID NO:1).

13. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-12, где полипептидный спейсер содержит шарнирный участок IgG1, IgG2 или IgG4 человека или его модифицированный вариант.

14. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-13, где полипептидный спейсер содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO:17, 18, 20, 21, 51, 52 или 53.

15. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-4 и пп. 11-14, где длина полипептидного спейсера составляет приблизительно 12 аминокислот.

16. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-4 и пп. 11-15, где полипептидный спейсер состоит из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 21.

17. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 5-14, где полипептидный спейсер содержит шарнирный участок молекулы иммуноглобулина или его модифицированный вариант и по меньшей мере один другой домен константного участка иммуноглобулина, выбранный из группы, состоящей из CH1, CH2, CH3, варианта любого из вышеперечисленных и их комбинаций.

18. Нуклеиновая кислота по п. 17, где полипептидный спейсер содержит шарнирный участок из IgG1, IgG2 или IgG4 или его модифицированный вариант в комбинации со всем участком CH2 или его вариантом или частью таковых и со всем участком CH3 или его вариантом или частью таковых.

19. Нуклеиновая кислота по п. 17 или п. 18, где полипептидный спейсер содержит шарнирный участок IgG4 человека или его модифицированный вариант, домен CH2 IgG4 человека и домен CH3 IgG4 человека.

20. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 5-14 и пп. 17-19, где длина полипептидного спейсера составляет приблизительно 229 аминокислот.

21. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 5-14 и пп. 17-20, где полипептидный спейсер содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 50.

22. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-21, где трансмембранный домен предусматривает трансмембранный домен CD8 или CD28.

23. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-22, где трансмембранный домен предусматривает трансмембранный домен CD28, содержащий аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO:5 или кодируемую последовательностью нуклеотидов atgttctgggtgctggtggt ggtggcggggtgctggcctgctac agcctgctggtgaca gtggcctcatcatctttgggtg, или содержащий аминокислотную последовательность MFWVLLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV.

24. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-23, где костимулирующий домен содержит

сигнальный домен 4-1BB или его модифицированный вариант, где необязательно сигнальный домен 4-1BB содержит аминокислоты 214-255 из SEQ ID NO:15 или содержит аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO:6; или

сигнальный домен CD28 или его модифицированный вариант, где необязательно сигнальный домен CD28 содержит аминокислоты 180-220 из SEQ ID NO:14 или предусматривает его модифицированный вариант, содержащий замену LL → GG, находящуюся в положениях 186-187 SEQ ID NO:14.

25. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-24, где сигнальный домен CD3 $\zeta$  содержит аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO:7.

26. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-4, пп. 11-15 и пп. 22-25, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой scFv, содержащий переменный участок легкой цепи (VL) антитела к ROR1 R12 и переменный участок тяжелой цепи (VH) антитела к ROR1 R12 или последовательность QEQLVESGGRLVTPGG

SLTSLCKASGFDFSAY YMSWVRQAPG KGLEWIATIYPSSGK TYYATWVNGRFTISSD  
NAQNTVDLQMNSLTAA DRATYFCARDSYADDG ALFNIWGPGLTVTISS  
GGGGSGGGGSGGGGSE LVLTQSPSVSAALGSP AKITCTLSSAHKTDTI  
DWYQQLQGEAPRYLMQ VQSDGSYTKRPGVPDR FSGSSSGADRYLIIPS  
VQADDEADY YCGADYI GGYVFGGGTQLTVTG;

полипептидный спейсер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:21;

трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO:5; и

внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен 4-1BB, содержащий аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO:6, и сигнальный домен CD3 $\zeta$ , содержащий аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO:7.

27. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-4, пп. 11-16 и пп. 22-26, где нуклеиновая кислота кодирует химерный рецептор, кодируемый нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность под SEQ ID NO:41 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO:41.

28. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 5-8, пп. 11-14 и пп. 17-25, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой scFv, содержащий переменный участок легкой цепи (VL) антитела к ROR1 R11 и переменный участок тяжелой цепи (VH) антитела к ROR1 R11 или последовательность QSVKESEGDLVTPAGN LTLTCTASGSDINDYP ISWVRQAPGKGLEWIG FINSGGSTWYASWVKG RFTISRTSTTVDLKMT SLTDDTATYFCARGY STYYGDFNIWGPGLTV TISSGGGGSGGGGSGG GGSELMVTQTPSSTSGA VGGTVTINCQASQSID SNLAWFQQKPGQPPTL LIYRASNLASGVPSRF SGRSGTEYTLTISGV QREDAATYYCLGGVGN VSYRTSFGGGTEVVVK;

полипептидный спейсер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:50;

трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO:5; и

внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен 4-1BB, содержащий аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO:6, и сигнальный домен CD3 $\zeta$ , содержащий аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO:7.

29. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 5-8, пп. 11-14, пп. 17-25 и п. 28, где нуклеиновая кислота кодирует химерный рецептор, кодируемый нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность под SEQ ID NO:43 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO:43.

30. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 5, 6, пп. 9-14 и пп. 17-25, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой scFv, содержащий переменный участок легкой цепи (VL) антитела к HER рецептина и переменный участок тяжелой цепи (VH) антитела к HER2 рецептина или аминокислотную последовательность, кодируемую Gcattctcctgatccc agatatccagatgacc cagtccccgagctccc tgtccgcctctgtggg cgatagggtccatca cctgccgtgccagtcagga tgtgaactgtgttagcc tggatcaacagaaacca ggaaaagctccgaaactac tgatttactcggcatcctt cctctactctggagtcctt ctcgcttctgtgtccaga tctgggacggattcactc tgaccatcagcagctgtgca gccggaagacttcgcaact tattactgtcagcaacatt atactactcctcccacgtt cggacagggtaccaagtg gagatcaaaggcagtacta gcggcggtggctccggggg cggatccggtggggggcggc agcagcagggttcagctgg tggagtctggcgggtggcct ggtgcagccagggggctca ctccgtttgtcctgtgcag cttctggctcaacattaa agacacctatatactgg gtgcgtcaggccccgggta agggcctggaatgggttgc aaggatttatctacgaat ggttatactagatatgccg atagegtcaagggccggtt cactataagcgcagacaca tccaaaaacacagcctacc tgcagatgaacagcctgcg tgctgaggactgccgtc tattattgttctagatggggg

RU 2019126655 A

RU 2019126655 A

aggggacggcttctatgcta tggactactgggggtcaa ggaaccctggtcaccgtctcgagt;

полипептидный спейсер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:50;

трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, кодируемую atgttctgggtgctggt ggtggtgggcggggtgct ggcctgctacagcctgct ggtgacagtggccttcac atcttttgggtg; и

внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен 4-1BB, содержащий аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO:6, и сигнальный домен CD3 $\zeta$ , содержащий аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO:7.

31. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 5, 6, пп. 9-14, пп. 17-25 и п. 30, где нуклеиновая кислота кодирует химерный рецептор, кодируемый нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность под SEQ ID NO:56 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO:56.

32. Полипептидный химерный рецептор, кодируемый нуклеиновой кислотой по любому из пп. 1-31.

33. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-31.

34. Вектор экспрессии по п. 33, дополнительно содержащий полинуклеотид, кодирующий маркерную последовательность, где полинуклеотид, кодирующий маркерную последовательность, функционально связан в рамке считывания с нуклеиновой кислотой, кодирующей химерный рецептор, где необязательно нуклеиновая кислота, кодирующая химерный рецептор, и полинуклеотид, кодирующий маркерную последовательность, разделены последовательностью, кодирующей расщепляемый линкер.

35. Вектор экспрессии по п. 34, где маркерная последовательность представляет собой усеченную последовательность EGFR.

36. Вектор экспрессии по п. 34 или 35, где расщепляемый линкер содержит пептид T2A.

37. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:42 или 44.

38. Вектор экспрессии, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO:41, 43 или 56.

39. Способ получения выделенной клетки-хозяина *in vitro*, включающий введение нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-31 в клетки популяции лимфоцитов и культивирование клеток в присутствии антитела к CD3 или антитела к CD28 или обоих и по меньшей мере одного гомеостатического цитокина.

40. Способ получения выделенной клетки-хозяина *in vitro*, включающий введение вектора экспрессии по любому из пп. 33-38 в клетки популяции лимфоцитов и культивирование клеток в присутствии антитела к CD3 или антитела к CD28 или обоих и по меньшей мере одного гомеостатического цитокина.

41. Способ выбора нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный рецептор, *in vitro*, при этом способ включает

а) обеспечение наличия библиотеки нуклеиновых кислот, кодирующих химерный рецептор, где каждая из множества нуклеиновых кислот кодирует химерный рецептор, отличающийся по длине, и содержит

i) полинуклеотид, кодирующий лиганд-связывающий домен, где лиганд-связывающий домен связывается с лигандом, где лиганд представляет собой опухолеспецифическую молекулу;

ii) полинуклеотид, кодирующий полипептидный спейсер, имеющий длину, которая независимо соответствует длине от 10 до 229 аминокислот;

iii) полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен; и

RU 2019126655 A

RU 2019126655 A

iv) полинуклеотид, кодирующий внутриклеточный сигнальный домен, который содержит сигнальный домен CD3 $\zeta$  и костимулирующий домен;

b) введение каждой из множества нуклеиновых кислот или вектора экспрессии, содержащего нуклеиновую кислоту, в отдельную выделенную популяцию Т-лимфоцитов и культивирование клеток *in vitro* в условиях, обеспечивающих размножение клеток;

c) введение каждой генетически модифицированной популяции Т-лимфоцитов опухоленосителю в животной модели и определение того, обладает ли генетически модифицированная популяция Т-лимфоцитов противоопухолевой эффективностью; и

d) осуществление выбора нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный рецептор, который обеспечивает противоопухолевую эффективность *in vitro* или в животной модели.

42. Способ получения выделенной клетки-хозяина *in vitro*, при этом способ включает

a) введение нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный рецептор, в популяцию лимфоцитов, которая имеет фенотип CD45RA-, CD45RO+ и CD62L+, где нуклеиновая кислота содержит

i) полинуклеотид, кодирующий лиганд-связывающий домен, где лиганд-связывающий домен связывается с лигандом, где лиганд представляет собой опухолеспецифическую молекулу;

ii) полинуклеотид, кодирующий полипептидный спейсер, имеющий длину, специфичную для лиганда, где спейсер обеспечивает повышенные пролиферацию Т-клеток или выработку цитокинов в ответ на воздействие лиганда по сравнению с эталонным химерным рецептором;

iii) полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен; и

iv) полинуклеотид, кодирующий внутриклеточный сигнальный домен, который содержит сигнальный домен CD3 $\zeta$  и костимулирующий домен; и

b) культивирование клеток до получения количества размножившихся клеток, достаточного для применения в инфузии клеток.

43. Выделенная клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-31.

44. Выделенная клетка-хозяин, содержащая химерный рецептор по п. 32.

45. Выделенная клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по любому из пп. 33-38.

46. Выделенная клетка-хозяин, полученная с помощью способа по любому из пп. 39, 40 или 42.

47. Выделенная клетка-хозяин по любому из пп. 43-46, где выделенной клеткой-хозяином является цитотоксический Т-лимфоцит CD8+ или лимфоцит CD4+.

48. Композиция, содержащая выделенную клетку-хозяина по любому из пп. 43-47 в фармацевтически приемлемом наполнителе.

49. Способ проведения клеточной иммунотерапии у субъекта, имеющего опухоль, при этом способ включает введение субъекту химерного рецептора по п. 32.

50. Способ проведения клеточной иммунотерапии у субъекта, имеющего опухоль, при этом способ включает введение субъекту выделенной клетки-хозяина по любому из пп. 43-47.

51. Способ проведения клеточной иммунотерапии у субъекта, имеющего опухоль, при этом способ включает введение субъекту композиции по п. 48.

52. Способ по любому из пп. 49-51, где опухоль представляет собой солидную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль.