



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.14

(21) Номер заявки
201501109

(22) Дата подачи заявки
2014.05.12

(51) Int. Cl. **C12N 9/22** (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)

(54) CD19-СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ХИМЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

(31) PCT/US2013/040755; 13/892,805; PCT/
US2013/040766; 61/888,259

(32) 2013.05.13; 2013.05.13; 2013.05.13;
2013.10.08

(33) US

(43) 2016.06.30

(86) PCT/EP2014/059662

(87) WO 2014/184143 2014.11.20

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СЕЛЛЕКТИС (FR)

(72) Изобретатель:
**Галетто Роман, Смит Джулианне (FR),
Шаренберг Эндрию (US), Шиффер-
Манниуи Сесиль (FR)**

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) GRAZYNA LIPOWSKA-BHALLA ET
AL.: "Targeted immunotherapy of cancer with
CAR T cells: achievements and challenges",
CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY,
SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 61, no. 7, 22 April

2012 (2012-04-22), pages 953-962, XP035074376,
ISSN: 1432-0851, DOI: 10.1007/S00262-012-1254-0
e.g. table 1; the whole document

Partow Kebriaei ET AL.: "Chimeric antibody
receptors (CARs): driving T-cell specificity to
enhance anti-tumor immunity", Frontiers in bioscience
(Scholar edition), 1 January 2012 (2012-01-01), page
520, XP055130773, United States Retrieved from the
Internet: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22202074> [retrieved on 2014-07-22] e.g. table 1; the
whole document

PARTOW KEBRIAIEI ET AL.: "Infusing
CD19-Directed T Cells to Augment Disease Control
in Patients Undergoing Autologous Hematopoietic
Stem-Cell Transplantation for Advanced B-Lymphoid
Malignancies", HUMAN GENE THERAPY, vol.
23, no. 5, 1 May 2012 (2012-05-01), pages
444-450, XP055130799, ISSN: 1043-0342, DOI:
10.1089/hum.2011.167 e.g. abstract; the whole
document

WO-A1-2012129514

PEIPP M. ET AL.: "Efficient eukaryotic
expression of fluorescent scFv fusion proteins
directed against CD antigens for FACS
applications", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL
METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS
B. V., AMSTERDAM, NL, vol. 285, no. 2, 15 February
2004 (2004-02-15), pages 265-280, XP004491170,
ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/J.JIM.2003.12.001
e.g. page 267, left-hand column, paragraph 2; the
whole document

(57) Описаны химерные антигенные рецепторы (CAR). CAR обладают способностью перенаправлять специфичность и реактивность иммунных клеток на выбранные мишени благодаря свойствам лигандсвязывающего домена. Описан также химерный антигенный рецептор, в котором внеклеточный лигандсвязывающий домен представляет собой scFV, выведенный из моноклонального антитела к CD19, предпочтительно 4G7. Описаны также полинуклеотиды, векторы, кодирующие указанный CAR, и выделенные клетки, экспрессирующие указанный CAR на своей поверхности. Описаны также способы конструирования иммунных клеток, экспрессирующих 4G7-CAR на своей поверхности, которые обеспечивают пролонгированное "активированное" состояние трансдуцированной клетки. Настоящее изобретение наиболее пригодно для лечения В-клеточных лимфом и лейкоза.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к химерным антигенным рецепторам (CAR). CAR обладают способностью перенаправлять специфичность и реактивность иммунных клеток на выбранные мишени благодаря свойствам лигандсвязывающего домена. В частности, настоящее изобретение относится к химерному антигенному рецептору, в котором внеклеточный лигандсвязывающий домен представляет собой scFv, выведенный из моноклонального антитела к CD19, предпочтительно 4G7. Настоящее изобретение относится также к полинуклеотидам, векторам, кодирующим указанный CAR, и к выделенным клеткам, экспрессирующим указанный CAR на своей поверхности. Настоящее изобретение относится также к способам создания иммунных клеток, экспрессирующих 4G7-CAR на своей поверхности, который обеспечивает пролонгированное "активированное" состояние трансдуцированной клетки.

Настоящее изобретение наиболее пригодно для лечения В-клеточных лимфом и лейкоза.

Предпосылки создания изобретения

Адаптивная иммунотерапия, в которой применяются перенос аутологичных антигенспецифических Т-клеток, созданных *ex vivo*, представляет собой перспективную стратегию для лечения вирусных инфекций и рака. Т-клетки, применяемые для адаптивной иммунотерапии, можно создавать либо путем размножения антигенспецифических Т-клеток, либо посредством перенаправления Т-клеток с помощью методов генетической инженерии (Park, Rosenberg и др., 2011). Перенос Т-клеток, специфических в отношении вирусных антигенов, является хорошо зарекомендовавшей себя процедурой, которую применяют для лечения ассоциированных с трансплантацией вирусных инфекций и редких связанных с вирусами злокачественных заболеваний. Продемонстрировано также, что выделение и перенос специфических в отношении опухоли Т-клеток приводит к успеху при лечении меланомы.

В Т-клетках были успешно созданы новые специфичности посредством генетического переноса трансгенных Т-клеточных рецепторов или химерных антигенных рецепторов (CAR) (Jena, Dotti и др., 2010). CAR представляют собой синтетические рецепторы, состоящие из "нацеливающего" фрагмента, ассоциированного с одним или несколькими сигнальными доменами в одной слитой молекуле. В целом, связывающий фрагмент CAR состоит из антигенсвязывающего домена одноцепочечного антитела (scFv), который содержит фрагменты моноклонального антитела, представляющие собой переменные домены легкой и тяжелой цепи, соединенные гибким линкером. Успешно применяли также связывающие фрагменты на основе доменов рецептора или лиганда. Сигнальные домены для первого поколения CAR выводили из цитоплазматической области цепей зета CD3 или гамма Fc-рецептора. Было продемонстрировано, что первое поколение CAR позволяло успешно перенаправлять Т-клеточную цитотоксичность, однако для них не удалось обеспечить пролонгированное размножение и противоопухолевую активность *in vivo*. Для повышения выживаемости и усиления пролиферации модифицированных с помощью CAR Т-клеток осуществляли добавление сигнальных доменов из костимуляторных молекул, включая CD28, OX-40 (CD134) и 4-1BB (CD137), по отдельности (второе поколение) или в комбинации (третье поколение). CAR позволяли успешно перенаправлять Т-клетки на антигены, экспрессируемые на поверхности опухолевых клеток при различных злокачественных заболеваниях, включая лимфомы и солидные опухоли (Jena, Dotti и др., 2010).

CD19 представляет собой привлекательную мишень для иммунотерапии, поскольку огромное большинство клеток острого В-клеточного лимфобластного лейкоза (B-ALL) постоянно экспрессируют CD19, в то время как экспрессия отсутствует на не гематопоэтических клетках, а также на миелоидных, эритроидных и Т-клетках и стволовых клетках костного мозга. В настоящее время проводятся клинические опыты по оценке направленного воздействия на CD19 при В-клеточных злокачественных заболеваниях, в которых получены обнадеживающие противоопухолевые ответы. В большинстве случаев вводимые путем инфузии Т-клетки генетически модифицировали таким образом, чтобы они экспрессировали химерный антигенный рецептор (CAR) со специфичностью, выведенной из scFv-области CD19-специфического мышинового моноклонального антитела FMC63 (Nicholson, Lenton и др., 1997; Cooper, Torp и др., 2003; Cooper, Jena и др., 2012) (международная заявка на патент: WO 2013/126712). Однако все еще существует необходимость в улучшении конструкции CAR, которая была бы в большей степени совместима с Т-клеточной пролиферацией, для того, чтобы клетки, экспрессирующие такие CAR, обладали значимым с клинической точки зрения преимуществом.

Краткое изложение сущности изобретения

При создании изобретения был создан CD19-специфический CAR (4G7-CAR), который содержит scFv, выведенный из CD19-специфического моноклонального антитела, а именно 4G7, и неожиданно было установлено, что интродукция созданного 4G7-CAR в первичные Т-клетки может обеспечивать пролонгированное "активированное" состояние трансдуцированных клеток независимо от связывания с антигеном. После неспецифической активации *in vitro* (например, с использованием покрытых антителом к CD3/CD28 гранул и рекомбинантного IL2) указанные клетки характеризовались увеличенным клеточным размером (образование бластов), а также экспрессией маркеров активации (CD25) в течение более длительного периода времени по сравнению с клетками, трансдуцированными сходным CAR, содержащим scFv FMC63. Такая продолжительная активация дает возможность осуществления более продолжительной пролиферации и обеспечивает независимый от антигена механизм размножения несущих 4G7-

CAR клеток *in vitro*.

Таким образом, в настоящем изобретении предложен химерный антигенный рецептор, содержащий по меньшей мере один внеклеточный лигандсвязывающий домен, трансмембранный домен и по меньшей мере один домен трансдукции сигнала, в котором указанный внеклеточный лигандсвязывающий домен содержит scFV, выведенный из специфического моноклонального антитела, 4G7. В частности, предлагаемый в изобретении CAR после трансдукции в иммунную клетку вносит вклад в независимую от антигена активацию и пролиферацию клетки. Настоящее изобретение относится также к нуклеиновой кислоте, векторам, кодирующим CAR, который содержит scFV, выведенный из CD19-специфического моноклонального антитела 4G7, и способам конструирования иммунных клеток, заключающимся в том, что в указанную клетку интродуцируют 4G7-CAR. Настоящее изобретение относится также к генетически модифицированным иммунным клеткам, экспрессирующим на своей поверхности 4G7, прежде всего к иммунным клеткам, пролиферация которых не зависит от опосредуемого антигеном механизма. Генетически модифицированные иммунные клетки, предлагаемые в настоящем изобретении, наиболее пригодны для таких терапевтических применений, как лечение 3-клеточной лимфомы и лейкоза.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано

на фиг. 1 - сравнение пролиферации Т-клеток с инактивированным TCR- α (КО), трансдуцированных несущим 4G7-CAR лентивирусным вектором, и нетрансдуцированных КО Т-клеток (NTD). Мониторинг пролиферации осуществляли в течение 30 дней после осуществления стадии реактивации растворимым антителом к CD28 (IL2+CD28) или без осуществления стадии реактивации (IL2);

на фиг. 2 - результаты анализа экспрессии маркера активации CD25 на поверхности Т-клеток с инактивированным TCR- α , трансдуцированных несущим 4G7-CAR лентивирусным вектором, где дискриминационное окно устанавливали на основе наличия экспрессии 4G7-CAR (CAR+, CAR-), результаты сравнивали с экспрессией CD25 на TCR- α -позитивных не подвергнутых электропорации (NEP) или несущих разрушенный TCR- α , но не подвергнутых трансдукции (NTD) клетках. Экспрессию CD25 анализировали после осуществления стадии реактивации растворимым антителом к CD28 (IL2+CD28) или без осуществления стадии реактивации (IL2);

на фиг. 3 - результаты анализа экспрессии CAR на поверхности Т-клеток, трансдуцированных лентивирусным вектором, кодирующим либо 4G7-CAR, либо FMC63-CAR. Анализ проводили методом проточной цитометрии через 3, 8 и 15 дней после трансдукции. NT обозначает не подвергнутые трансдукции Т-клетки;

на фиг. 4 - результаты анализа экспрессии CD25 на поверхности Т-клеток, трансдуцированных лентивирусным вектором, кодирующим либо 4G7-CAR, либо FMC63-CAR. Анализ проводили методом проточной цитометрии через 3, 8 и 15 дней после трансдукции. NT обозначает не подвергнутые трансдукции Т-клетки;

на фиг. 5 - результаты анализа размера Т-клеток, трансдуцированных лентивирусным вектором, кодирующим либо 4G7-CAR, либо FMC63-CAR. Анализ проводили методом проточной цитометрии через 3, 8 и 15 дней после трансдукции. NT обозначает не подвергнутые трансдукции Т-клетки;

на фиг. 6 - сравнение пролиферации Т-клеток, трансдуцированных несущим 4G7-CAR и несущим FMC63 лентивирусным вектором. Мониторинг пролиферации осуществляли в течение 20 дней после осуществления стадии реактивации растворимым антителом к CD28 (CD28) или без осуществления стадии реактивации (-). NTD обозначает не подвергнутые трансдукции Т-клетки.

Подробное описание изобретения

Если специально не указано иное, то все технические и научные понятия, использованные в настоящем описании, имеют значение, которое является общепринятым для специалистов в области генной терапии, биохимии, генетики и молекулярной биологии.

Для осуществления на практике или тестирования настоящего изобретения можно применять все методы и материалы, сходные или эквивалентные тем, которые указаны в настоящем описании, при этом в настоящей заявке описаны пригодные методы и материалы. Все публикации, заявки на патент, патенты и другие ссылки, упомянутые в настоящем описании, полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки. В случае разночтения следует руководствоваться настоящим описанием, включая определения. Кроме того, материалы, методы и примеры представлены только для иллюстрации и не направлены на ограничение объема изобретения, если не указано иное. При осуществлении на практике настоящего изобретения следует применять, если не указано иное, общепринятые методы клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК и иммунологии, известные специалисту в данной области. Такие методы подробно описаны в литературе, см., например, *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, изд-во Wiley and son Inc, Library of Congress, USA, 2000); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-е изд. (Sambrook и др., изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001); *Oligonucleotide Synthesis*, под ред. M.J. Gait, 1984; Mullis и др., U.S. № 4683195; *Nucleic Acid Hybridization* (под ред. B.D. Harries и S.J. Higgins, 1984); *Transcription And Translation* (под ред. B.D. Hames и S.J. Higgins, 1984);

Culture Of Animal Cells (R.I. Freshney, изд-во Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (изд-во IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); серия: Methods In ENZYMOLOGY (под ред. J. Abelson и M. Simon, изд-во Academic Press, Inc., New York), прежде всего т. 154 и 155 (под ред. Wu и др.) и т. 185, "Gene Expression Technology" (под ред. D. Goeddel); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (под ред. J.H. Miller и M.P. Calos, 1987, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (под ред. Mayer и Walker, изд-во Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, тт. I-IV (под ред. D.M. Weir и C.C. Blackwell, 1986); и Manipulating the Mouse Embryo, (изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

CD19-специфический химерный антигенный рецептор

Настоящее изобретение относится к химерному антигенному рецептору (CAR), содержащему внеклеточный лигандсвязывающий домен, трансмембранный домен и домен трансдукции сигнала.

Понятие "внеклеточный лигандсвязывающий домен" в контексте настоящего описания обозначает олиго- или полипептид, обладающий способностью связываться с лигандом. Предпочтительно домен должен обладать способностью взаимодействовать с молекулой клеточной поверхности. Например, можно выбирать внеклеточный лигандсвязывающий домен, позволяющий распознавать лиганд, который функционирует в качестве маркера клеточной поверхности на клетках-мишенях, ассоциированных с конкретным болезненным состоянием.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанный внеклеточный лигандсвязывающий домен содержит фрагмент одноцепочечного антитела (scFv), содержащий вариабельный фрагмент легкой (V_L) и тяжелой (V_H) цепи специфического в отношении антигена-мишени моноклонального антитела, соединенные гибким линкером. В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанный scFv выводят из моноклонального антитела к CD19 4G7 (Peipp, Saul и др., 2004), предпочтительно указанный scFv, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит часть иммуноглобулиновой тяжелой γ -1-цепи моноклонального антитела к CD19 4G7 (GenBank: CAD88275.1; SEQ ID NO: 1) и часть иммуноглобулиновой легкой κ -цепи моноклонального антитела к CD19 4G7 (GenBank: CAD88204.1; SEQ ID NO: 2), предпочтительно сцепленные друг с другом с помощью гибкого линкера. В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанный scFv, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит вариабельные фрагменты иммуноглобулиновой тяжелой γ -1-цепи моноклонального антитела к CD19 4G7 (SEQ ID NO: 3) и вариабельные фрагменты иммуноглобулиновой легкой κ -цепи моноклонального антитела к CD19 4G7 (SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5), сцепленные друг с другом с помощью гибкого линкера. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный гибкий линкер имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 6).

Иными словами, указанный CAR содержит внеклеточный лигандсвязывающий домен, который содержит одноцепочечный Fv-фрагмент, выведенный из CD19-специфического моноклонального антитела 4G7. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный scFv содержит часть аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-5. В предпочтительном варианте осуществления изобретения последовательность указанного scFv идентична по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90, 95, 97 или 99% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8.

Домен трансдукции сигнала или внутриклеточный сигнальный домен CAR, предлагаемого в настоящем изобретении, ответствен за внутриклеточную передачу сигнала после связывания внеклеточного лигандсвязывающего домена с мишенью, приводящую к активации иммунной клетки и иммунному ответу. Иными словами, домен трансдукции сигнала ответствен за активацию по меньшей мере одной из обычных эффекторных функций иммунной клетки, в которой имеет место экспрессия CAR. Например, эффекторная функция Т-клетки может представлять собой цитолитическую активность или хелперную активность, включая секрецию цитокинов. Таким образом, понятие "домен трансдукции сигнала" относится к части белка, которая осуществляет трансдукцию сигнала эффекторной сигнальной функции и "направляет" клетку на выполнение специализированной функции.

Предпочтительными примерами домена трансдукции сигнала, которые можно использовать в CAR, могут служить цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора и корецепторов, которые функционируют согласованно, иницируя трансдукцию сигнала после привлечения антигенного рецептора, а также любые производные или варианты указанных последовательностей и любая синтетическая последовательность, обладающая такой же функциональной способностью. Домен трансдукции сигнала содержит два различных класса цитоплазматических сигнальных последовательностей, а именно те, которые иницируют антигензависимую первичную активацию, и те, которые функционируют независимо от антигена образом, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал. Первичная цитоплазматическая сигнальная последовательность может содержать сигнальные мотивы, известные как мотивы активации иммунных рецепторов на основе тирозина, ITAM. ITAM представляют собой хорошо известные сигнальные мотивы, присутствующие во внутрицитоплазматическом "хвосте" различных ре-

цепторов, которые служат в качестве сайтов связывания для класса syk/zap70 тирозинкиназ. Примерами ИТАМ, применяемых согласно изобретению, могут служить (но не ограничиваясь только ими) ИТАМ, выведенные из TCR-зета, FcR-гамма, FcR-бета, FcR-эпсилон, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В предпочтительном варианте осуществления изобретения домен трансдукции сигнала CAR может содержать выведенный из CD3-зета сигнальный домен, который имеет аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90, 95, 97 или 99% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из (SEQ ID NO: 10).

В конкретном варианте осуществления изобретения домен трансдукции сигнала CAR, предлагаемого в настоящем изобретении, содержит костимуляторную сигнальную молекулу. Костимуляторная молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности, отличную от антигенного рецептора или его лигандов, которая требуется для эффективного иммунного ответа. Понятие "костимуляторный лиганд" относится к молекуле на антигенпрезентирующей клетке, которая специфически связывается с когнатной костимуляторной молекулой на Т-клетке, создавая тем самым сигнал, который в дополнение к первичному сигналу, создаваемому, например, при связывании комплекса TCR/CD3 с молекулой ГКГС, загруженной пептидом, опосредует Т-клеточный ответ, включая (но не ограничиваясь только этим) активацию пролиферации, дифференцировку и т.п. Костимуляторный лиганд может включать (но не ограничиваясь только ими) CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, индуцибельный костимуляторный лиганд (ICOS-L), молекулу межклеточной адгезии (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, рецептор лимфотоксина бета, 3/TR6, ILT3, ILT4, агонист или антитело, который/которое связывается с лигандом Толл-рецептора, и лиганд, который специфически связывается с B7-H3. Под понятие "костимуляторный лиганд" подпадает, среди прочего, антитело, которое специфически связывается с костимуляторной молекулой, присутствующей на Т-клетке, такой как (но не ограничиваясь только ими) CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, антиген-1, ассоциированный с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганд, специфически связывающийся с CD83.

Понятие "костимуляторная молекула" относится к когнатному (родственному) связывающему партнеру, присутствующему на Т-клетке, который специфически связывается с костимуляторным лигандом, опосредуя тем самым костимулирующий ответ клетки, такой как (но не ограничиваясь только им) пролиферация. Костимуляторные молекулы включают (но не ограничиваясь только ими) молекулу ГКГС класса I, BTLA и лиганд Толл-рецептора. Примерами костимуляторных молекул являются CD27, CD28, CD8, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, антиген-1, ассоциированный с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, специфически связывающийся с CD83, и т.п.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения домен трансдукции сигнала CAR, предлагаемого в настоящем изобретении, содержит часть костимуляторной сигнальной молекулы, выбранной из группы, состоящей из фрагмента 4-1BB (GenBank: AAA53133.) и CD28 (NP_006130.1). В частности, домен трансдукции сигнала CAR, предлагаемого в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90, 95, 97 или 99% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12.

CAR, предлагаемый в настоящем изобретении, экспрессируется на поверхности клеточной мембраны. Таким образом, CAR может содержать трансмембранный домен. Отличительными особенностями соответствующих трансмембранных доменов являются способность экспрессироваться на поверхности клетки, согласно настоящему изобретению предпочтительно на поверхности иммунной клетки, прежде всего лимфоцитов или естественных клеток-киллеров (NK), и взаимодействовать друг с другом, направляя клеточный ответ иммунной клетки на заранее определенную клетку-мишень. Трансмембранный домен можно выводить как из встречающегося в естественных условиях, так и синтетического источника. Трансмембранный домен можно выводить из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. Примерами трансмембранных полипептидов могут служить (но не ограничиваясь только ими) субъединица Т-клеточного рецептора, такая как α -, β -, γ - или δ -субъединица, полипептид, образующий комплекс CD3, p55 (α -цепь), p75 (β -цепь) или γ -цепь рецептора IL2, цепь субъединиц Fc-рецепторов, в частности Fc γ -рецептора III или CD-белки. Альтернативно этому трансмембранный домен может быть синтетическим, и он может содержать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанный трансмембранный домен выводят из α -цепи человеческого CD8 (например, NP_001139345.1). Трансмембранный домен может содержать также "стеблевую область" между указанным внеклеточным лигандсвязывающим доменом и указанным трансмембранным доменом. В контексте настоящего описания понятие "стеблевая область", как правило, обозначает олиго- или полипептид, функция которого заключается в сцеплении трансмембранного домена с внеклеточным лигандсвязывающим доменом. В частности, "стеблевую область" используют для обеспечения большей гибкости и доступности внеклеточного лигандсвязывающего домена. "Стеблевая область" может содержать вплоть до 300 аминокислот, предпочтительно от 10 до 100

аминокислот и наиболее предпочтительно от 25 до 50 аминокислот. "Стеблевую область" можно выводить из полных встречающихся в естественных условиях молекул или их частей, таких как полная внеклеточная область CD8, CD4 или CD28, или ее часть, или полная константная область антитела или ее часть. Альтернативно этому "стеблевая область" может представлять собой синтетическую последовательность, которая соответствует встречающейся в естественных условиях "стеблевой" последовательности, или может представлять собой полностью синтетическую "стеблевую" последовательность. В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная "стеблевая область" представляет собой часть α -цепи человеческого CD8 (например, NP_001139345.1). В другом конкретном варианте осуществления изобретения указанный трансмембранный домен и шарнирный домен содержат часть α -цепи человеческого CD8, последовательность которой идентична предпочтительно по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90, 95, 97 или 99% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13.

В конкретном варианте осуществления изобретения указанный химерный антигенный рецептор, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит scFv, выведенный из моноклонального антитела к CD19 4G7, шарнирного и трансмембранного домена α -цепи человеческого CD8, сигнального домена CD3-зета и сигнального домена 4-1BB. Предпочтительно последовательность 4G7-CAR, предлагаемого в настоящем изобретении, идентична по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90, 95, 97 или 99% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14 и 15.

В раковых клетках часто имеет место понижающая регуляция или мутация антигенов-мишеней, что приводит к появлению так называемых вариантов "потерянных антигенов", т.е. антигенов, ускользающих от иммунологического надзора. Таким образом, для того, чтобы противостоять ускользанию опухоли от иммунологического надзора и придавать иммунной клетке большую специфичность в отношении мишени, CD19-специфический CAR может содержать другие внеклеточные лигандсвязывающие домены, предназначенные для одновременного связывания с другими элементами на мишени и усиления тем самым активации и функции иммунной клетки. В одном из вариантов осуществления изобретения внеклеточные лигандсвязывающие домены можно размещать тандемно на одном и том же трансмембранном полипептиде и их необязательно можно отделять друг от друга с помощью линкера. В другом варианте осуществления изобретения указанные другие внеклеточные лигандсвязывающие домены можно размещать на различных трансмембранных полипептидах, из которых состоит CAR. Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к популяции CAR, каждый из которых содержит различные внеклеточные лигандсвязывающие домены. В частности, настоящее изобретение относится к способу создания иммунных клеток, заключающемуся в том, что получают иммунную клетку и экспрессируют на поверхности указанной клетки популяцию, каждый из которых содержит различные внеклеточные лигандсвязывающие домены. Другой конкретный вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу создания иммунной клетки, заключающемуся в том, что получают иммунную клетку и интродуцируют в указанную клетку полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, из которых состоит популяция CAR, каждый из которых содержит различные внеклеточные лигандсвязывающие домены. Под популяцией CAR подразумевают по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть или большее количество CAR, каждый из которых содержит различные внеклеточные лигандсвязывающие домены. Согласно настоящему изобретению различные внеклеточные лигандсвязывающие домены, предлагаемые в настоящем изобретении, предпочтительно могут связываться одновременно с различными элементами на мишени, усиливая тем самым активацию и функцию иммунной клетки. Настоящее изобретение относится также к выделенной иммунной клетке, которая содержит популяцию CAR, каждый из которых содержит различные внеклеточные лигандсвязывающие домены.

Полинуклеотиды, векторы.

Настоящее изобретение относится также к полинуклеотидам, векторам, кодирующим описанный выше CAR, предлагаемый в изобретении. Предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения является полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17. В предпочтительном варианте осуществления изобретения последовательность полинуклеотида идентична по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90, 95, 97 или 99% нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17.

Полинуклеотид может содержаться в касете экспрессии или экспрессионном векторе (например, в плазмиде, предназначенной для интродукции в бактериальную клетку-хозяин, или вирусном векторе, таком как бакуловирусный вектор, предназначенный для трансфекции клетки насекомого-хозяина, или плазмидном или вирусном векторе, таком как лентивирус, предназначенном для трансфекции млекопитающего-хозяина).

В конкретном варианте осуществления изобретения можно включать различные нуклеотидные последовательности в один полинуклеотид или вектор, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую рибосомальную skip-последовательность, такую как последовательность, кодирующую

щую пептид 2A. Пептиды 2A, которые были идентифицированы в подгруппе афтовирюсов группы пикорнавирусов, приводят к рибосомальному "перескоку" (skip) от одного кодона к следующему без образования пептидной связи между двумя аминокислотами, кодируемыми кодонами (см. Donnelly и Elliott, 2001; Atkins, Wills и др., 2007; Doronina, Wu и др., 2008). Под "кодоном" понимают три нуклеотида на мРНК (или на смысловой цепи молекулы ДНК), которые транслируются рибосомой в один аминокислотный остаток. Таким образом, можно синтезировать два полипептида из одной непрерывной рамки считывания в мРНК, если полипептиды разделены последовательностью олигопептида 2A, присутствующей в рамке считывания. Такие рибосомальные skip-механизмы хорошо известны в данной области и известно их применение в нескольких векторах для экспрессии нескольких белков, кодируемых одной матричной РНК.

Для направления трансмембранного полипептида в секреторный путь клетки-хозяина, в последовательность полинуклеотида или в последовательность вектора помещают секреторную сигнальную последовательность (известную также как лидерная последовательность, пре-последовательность или препоследовательность). Секреторную сигнальную последовательность функционально связывают с трансмембранной нуклеотидной последовательностью, т.е. две последовательности соединяют в правильной рамке считывания и размещают так, чтобы направлять новый синтезированный полипептид в секреторный путь клетки-хозяина. Секреторные сигнальные последовательности, как правило, размещают в 5'-направлении относительно нуклеотидной последовательности, кодирующей представляющий интерес полипептид, хотя некоторые секреторные сигнальные последовательности можно размещать и в другом месте представляющей интерес нуклеотидной последовательности (см., например, Welch и др., US № 5037743; Holland и др., US № 5143830). В предпочтительном варианте осуществления изобретения сигнальный пептид содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 18 и 19.

Специалистам в данной области должно быть очевидно, что с учетом вырожденности генетического кода могут иметь место значительные вариации последовательности указанных полинуклеотидных молекул. Предпочтительно нуклеотидные последовательности, предлагаемые в настоящем изобретении, имеют оптимизированные кодоны для экспрессии в клетках млекопитающих, предпочтительно для экспрессии в человеческих клетках. Оптимизация кодонов относится к замене в представляющей интерес последовательности кодонов, встречающихся относительно редко в генах с высоким уровнем экспрессии, на кодоны, которые, как правило, часто встречаются в генах с высоким уровнем экспрессии в указанных видах, такие кодоны кодируют те же аминокислоты, что и подлежащие замене кодоны.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17. Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, содержащим нуклеотидную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90, 95, 97 или 99% нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17.

Способы создания иммунной клетки.

Конкретные варианты осуществления, подпадающие под объем настоящего изобретения, относятся к способу получения иммунных клеток для иммунотерапии, заключающемуся в том, что интродуцируют в указанные иммунные клетки CAR, предлагаемый в настоящем изобретении, и размножают указанные клетки. Конкретный вариант осуществления изобретения относится к способу создания иммунной клетки, заключающемуся в том, что получают клетку и экспрессируют на поверхности указанной клетки по меньшей мере один CAR, описанный выше. В конкретном варианте осуществления изобретения способ заключается в том, что трансформируют клетку по меньшей мере одним полинуклеотидом, кодирующим CAR, описанный выше, и экспрессируют указанные полинуклеотиды в указанной клетке.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанные полинуклеотиды включают в лентивирусные векторы, принимая во внимание, что они стабильно экспрессируются в клетках.

В другом варианте осуществления изобретения указанный способ дополнительно включает стадию, на которой генетически модифицируют указанную клетку путем инактивации по меньшей мере одного гена, экспрессирующего один компонент TCR, мишень иммуносупрессорного агента, ген HLA и/или ген иммунных чекпойнтов, такой как PDCD1 или CTLA-4. В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанный ген выбирают из группы, состоящей из TCR- α , TCR- β , CD52, GR, PD1 и CTLA-4. В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанный способ дополнительно заключается в том, что интродуцируют в указанные T-клетки редко расщепляющую эндонуклеазу, обладающую способностью осуществлять избирательную инактивацию путем расщепления ДНК указанных генов. В более предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная редко расщепляющая эндонуклеаза представляет собой TALE-нуклеазу или эндонуклеазу Cas9.

Методы доставки.

Различные методы, описанные выше, предполагают интродукцию CAR в клетку. Например (но не ограничиваясь только этим), указанный CAR можно интродуцировать в виде трансгенов, кодируемых одним плазмидным вектором. Указанный плазмидный вектор может содержать также селективируемый маркер, обеспечивающий идентификацию и/или отбор клеток, в которые встроены указанный вектор.

Полипептиды можно синтезировать *in situ* в клетке в результате интродукции в клетку полинуклеотидов, кодирующих указанные полипептиды. Альтернативно этому указанные полипептиды можно получать вне клетки и затем интродуцировать в нее. Методы интродукции полинуклеотидных конструкций в клетки известны в данной области и их примерами являются (но не ограничиваясь только ими) методы стабильной трансформации, в которых полинуклеотидную конструкцию интегрируют в геном клетки, методы кратковременной трансформации, в которых полинуклеотидную конструкцию не интегрируют в геном клетки, и методы, основанные на использовании вирусов. Указанные полинуклеотиды можно интродуцировать в клетку, например, с использованием рекомбинантных вирусных векторов (например, ретровирусов, аденовирусов), липосом и т.п. Например, методы кратковременной трансформации включают микроинъекцию, электропорацию или бомбардировку частицами. Указанные полинуклеотиды можно включать в векторы, более конкретно в плазмиды или вирусы, с целью экспрессии в клетках.

Сконструированные иммунные клетки.

Настоящее изобретение относится также к выделенным клеткам или клеточным линиям, которые можно получать указанным способом создания клеток. В частности, указанная выделенная клетка содержит по меньшей мере один описанный выше CAR. В другом варианте осуществления изобретения указанная выделенная клетка содержит популяцию CAR, каждый из которых содержит различные внеклеточные лигандсвязывающие домены. В частности, указанная выделенная клетка содержит экзогенную полинуклеотидную последовательность, кодирующую CAR. Активация и пролиферация генетически модифицированных иммунных клеток, предлагаемых в настоящем изобретении, происходит независимо от механизмов связывания с антигеном.

Под объем настоящего изобретения подпадает также выделенная иммунная клетка, предпочтительно Т-клетка, полученная с помощью одного из описанных ранее способов. Указанная иммунная клетка представляет собой клетку, происходящую из гематопозитической клетки, функционально участвующую в инициации и/или реализации врожденного или адаптивного иммунного ответа. Указанную иммунную клетку, предлагаемую в настоящем изобретении, можно выводить из стволовой клетки. Стволовые клетки могут представлять собой зрелые стволовые клетки, нечеловеческие эмбриональные стволовые клетки из организма кроме человека, более предпочтительно нечеловеческие стволовые клетки, стволовые клетки из пуповинной крови, клетки-предшественники, стволовые клетки костного мозга, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, тотипотентные стволовые клетки или гематопозитические стволовые клетки. Репрезентативными человеческими клетками являются CD34⁺-клетки. Указанная выделенная клетка может представлять собой также дендритную клетку, дендритную клетку-киллер, тучную клетку, НК-клетку, В-клетку или Т-клетку, выбранную из группы, состоящей из воспалительных Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов, регуляторных Т-лимфоцитов или хэлперных Т-лимфоцитов. В другом варианте осуществления изобретения указанную клетку можно выводить из группы, состоящей из CD4⁺-Т-лимфоцитов и CD8⁺-Т-лимфоцитов. Перед осуществлением размножения и генетической модификации клеток, предлагаемых в изобретении, из организма индивидуума можно получать источник клеток с помощью различных методов, не ограничивающих объем изобретения. Клетки можно получать из многочисленных источников, включая (но не ограничиваясь только ими) мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из инфицированной области, асциты, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения можно применять любое количество Т-клеточных линий, доступных и известных специалистам в данной области. В другом варианте осуществления изобретения указанную клетку можно получать из организма здорового донора, пациента, у которого диагностирован рак или пациента, у которого диагностирована инфекция. В другом варианте осуществления изобретения указанная клетка представляет собой часть смешанной популяции клеток, обладающих различными фенотипическими характеристиками. Под объем настоящего изобретения подпадает также клеточная линия, полученная из трансформированной Т-клетки согласно ранее описанному способу. Под объем настоящего изобретения подпадают модифицированные клетки, полученные с помощью ранее описанного способа, которые являются устойчивыми или чувствительными к иммунопрессорной обработке.

В другом варианте осуществления изобретения указанная выделенная клетка, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит полинуклеотид, кодирующий CAR.

Активация и размножение Т-клеток.

Как до, так и после осуществления генетической модификации Т-клеток, даже в том случае, если активация и пролиферация генетически модифицированных иммунных клеток, предлагаемых в настоящем изобретении, не зависит от механизмов связывания с антигеном, иммунные клетки, прежде всего Т-клетки, предлагаемые в настоящем изобретении, можно подвергать дополнительной активации и размножать с помощью методов, описанных, например, в US №№ 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041 и публикации заявки на патент США № 2006/0121005. Т-клетки можно размножать *in vitro* или *in vivo*.

Как правило, Т-клетки, предлагаемые в изобретении, размножают путем приведения в контакт с

агентом, который стимулирует комплекс CD3 TCR, и костимуляторной молекулой на поверхности Т-клеток с целью создания сигнала активации для Т-клетки.

Например, для создания сигнала активации для Т-клетки можно применять химические соединения, такие как ионофор кальция А23187, форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА), или митогенные лектины, такие как фитогемагглютинин (ФГА).

Например (но не ограничиваясь только этим), популяции Т-клеток можно стимулировать *in vitro* 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 ионофором кальция. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток можно использовать лиганд, который связывается с вспомогательной молекулой. Например, популяцию Т-клеток можно приводить в контакт с антителом к CD3 и антителом к CD28 в условиях, обеспечивающих стимуляцию пролиферации Т-клеток. Условия, пригодные для культивирования Т-клеток, включают соответствующие среды (например, минимальную поддерживающую среду или среду RPMI 1640, или X-vivo 5 (фирма Lonza)), которые могут содержать факторы, необходимые для обеспечения пролиферации и жизнеспособности, включая сыворотку (например, фетальную бычью сыворотку или человеческую сыворотку), интерлейкин-2 (IL-2), инсулин, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, -10, -2, IL-15, TGF β и TNF- или любые другие добавки для роста клеток, известные специалисту в данной области. Другие добавки для роста клеток включают (но не ограничиваясь только ими) сурфактант, плазманат и восстановители, такие как N-ацетилцистеин и 2-меркаптоэтанол. Среда могут представлять собой RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 1 и X-Vivo 20, Optimizer, содержащие в качестве добавок аминокислоты, пируват натрия и витамины, они могут быть бесывороточными или могут содержать в качестве добавок в определенном количестве сыворотку (или плазму) или определенный набор гормонов, и/или цитокин(ы) в количестве, достаточном для роста и размножения Т-клеток. Антибиотики, например пенициллин и стрептомицин, включают только в экспериментальные культуры, но не в культуры клеток, которые предназначены для введения путем инфузии индивидууму. Клетки-мишени поддерживают в условиях, необходимых для поддержания роста, например при соответствующей температуре (например, при 37°C) и атмосфере (например, в воздухе плюс 5% CO₂). Клетки, которые подвергали стимуляции в течение различных промежутков времени, могут обладать различными характеристиками.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения указанные клетки можно размножить путем совместного культивирования с тканью или клетками. Указанные клетки можно размножить также *in vivo*, например, в крови индивидуума после введения указанной клетки индивидууму.

Терапевтические применения.

В другом варианте осуществления изобретения выделенные клетки, полученные различными методами, или клеточную линию, выведенную из указанной выделенной клетки, согласно описанному ранее методу, можно применять в качестве лекарственного средства. В другом варианте осуществления изобретения указанное лекарственное средство можно применять для лечения рака, прежде всего для лечения В-клеточных лимфом и лейкозов у пациента, нуждающегося в этом. В другом варианте осуществления изобретения указанную выделенную клетку, предлагаемую в изобретении, или клеточную линию, выведенную из указанной выделенной клетки, можно применять для изготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения рака у пациента, нуждающегося в этом.

Другой объект настоящего изобретения относится к способам лечения пациентов, нуждающихся в этом, где указанный способ заключается в том, что осуществляют по меньшей мере одну из следующих стадий, на которых:

(а) получают иммунную клетку, которую можно создавать с помощью одного из ранее описанных методов;

(б) вводят указанные трансформированные иммунные клетки указанному пациенту.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанные Т-клетки, предлагаемые в изобретении, можно подвергать интенсивному Т-клеточному размножению *in vivo* и их можно сохранять в течение продолжительного периода времени.

Указанное лечение может быть облегчающим, терапевтическим или профилактическим. Оно может представлять собой либо составную часть аутологичного иммунотерапевтического лечения, либо составную часть аллогенного иммунотерапевтического лечения. Понятие "аутологичный" означает, что клетки, клеточная линия или популяция клеток, применяемые для лечения пациентов, происходят из организма указанного пациента или из организма совместимого по человеческому лейкоцитарному антигену (HLA) донора. Понятие "аллогенный" означает, что клетки или популяция клеток, применяемые для лечения пациентов, не происходят из организма указанного пациента, но происходят из организма донора.

Клетки, которые можно применять в заявляемых способах, описаны в предыдущем разделе. Указанное лечение можно применять для лечения пациентов, у которых диагностирован рак. Типы рака, которые можно лечить, включают несолидные опухоли (такие как гематологические опухоли, включая (но не ограничиваясь только ими) пре-В ALL (при педиатрических показаниях), ALL взрослых, лимфому из клеток мантии, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому и т.п. Типы рака, которые можно

лечить с помощью CAR, предлагаемых в изобретении, включают (но не ограничиваясь только ими) некоторые типы лейкозов или лимфоидных злокачественных заболеваний. Они включают также опухоли/типы рака взрослых и детские опухоли/типы рака.

Лечение можно осуществлять в сочетании с применением одного или нескольких типов противораковой терапии, выбранных из группы, включающей терапию на основе антител, химиотерапию, цитокиновую терапию, терапию с использованием дендритных клеток, генную терапию, гормональную терапию, свето-лазерную терапию и лучевую терапию.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения указанное лечение можно применять для пациентов, подвергающихся иммуносупрессорной терапии. Фактически, настоящее изобретение основано предпочтительно на применении клеток или популяции клеток, которые приобрели устойчивость по меньшей мере к одному иммунодепрессанту в результате инактивации гена, кодирующего рецептор для такого иммунодепрессанта. С этой точки зрения иммуносупрессорная терапия должна способствовать отбору и размножению Т-клеток, предлагаемых в изобретении, в организме пациента.

Введение клеток или популяции клеток, предлагаемых в настоящем изобретении, можно осуществлять любым пригодным методом, включая ингаляционно аэрозоля, инъекцию, прием внутрь, трансфузию, имплантацию или трансплантацию. Композиции, представленные в настоящем описании, можно вводить пациенту подкожно, внутривенно, внутрь опухоли, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной или внутривенной инъекции, или внутривенно. В одном из вариантов осуществления изобретения клеточные композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, предпочтительно вводят путем внутривенной инъекции.

Введение клеток или популяции клеток может заключаться во введении 10^4 - 10^9 клеток/кг веса тела, предпочтительно от 10^5 до 10^6 клеток/кг веса тела, включая все целочисленные количества клеток в указанных диапазонах. Клетки или популяцию клеток можно вводить в виде одной или нескольких доз. В другом варианте осуществления изобретения указанное эффективное количество клеток вводят в виде однократной дозы. В другом варианте осуществления изобретения указанное эффективное количество клеток вводят в виде более чем одной дозы в течение некоторого периода времени. График введения находится в компетенции лечащего врача и зависит от клинического состояния пациента. Клетки или популяцию клеток можно получать из любого источника, такого как банк крови или донор. Поскольку индивидуальные потребности варьируются, определение оптимальных диапазонов эффективных количеств рассматриваемого типа клеток для конкретного заболевания или состояний, находится в компетенции специалиста в данной области. Эффективное количество представляет собой количество, которое обеспечивает терапевтическое или профилактическое полезное действие. Вводимая доза должна зависеть от возраста, состояния здоровья и веса реципиента, вида одновременно применяемого лечения, если это имеет место, частоты обработки и природы требуемого действия.

В другом варианте осуществления изобретения клетки или композицию, содержащую эти клетки, вводят в указанном эффективном количестве парентерально. Указанное введение может представлять собой внутривенное введение. Указанное введение можно осуществлять непосредственно путем инъекции в опухоль.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетки вводят пациенту в сочетании с осуществлением (например, до, одновременно или после) любого количества соответствующих форм лечения, включая (но не ограничиваясь только ими) лечение с помощью средств противовирусной терапии, таких как цидофовир и интерлейкин-2, цитарабин (известный также под названием ARA-C), или лечение натализумабом пациентов с MS (рассеянный склероз), или лечение эфализумабом пациентов с псориазом, или другие виды лечения пациентов с PML (прогрессирующая многоочаговая лейкоэнцефалопатия). В других вариантах осуществления изобретения Т-клетки, предлагаемые в изобретении, можно применять в сочетании с химиотерапией, лучевой терапией, иммунодепрессантами, такими как циклоsporин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антителами или другими иммунодепрессивными агентами, такими как CAMPATH, антитела к CD3, или с другими видами терапии на основе антител, цитоксинами, флударибином, циклоспорином, FK506, рапамицином, микофеноловой кислотой, стероидами, FR901228, цитокинами и облучением. Эти лекарственные средства ингибируют или кальций-зависимую фосфатазу, кальцинеурин (циклоспорин и FK506), или ингибируют киназу p70S6, которая важна для индуцируемой фактором роста передачи сигнала (рапамицин) (Henderson, Naya и др., 1991; Liu, Albers и др., 1992; Bierer, Hollander и др., 1993). В другом варианте осуществления изобретения клеточные композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, вводят пациенту в сочетании с (например, до, одновременно или после) трансплантацией костного мозга, Т-клеточной абляционной терапией с использованием либо химиотерапевтических средств, таких как флударабин, либо внешней лучевой терапии (XRT), циклофосфамида, либо антител, таких как OKT3 или CAMPATH. В другом варианте осуществления изобретения клеточные композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, вводят после осуществления В-клеточной абляционной терапии с использованием агентов, которые взаимодействуют с CD20, таких, например, как ритуксан. Например, в одном из вариантов осуществления изобретения индивидуумов можно подвергать стандартной обработке химиотерапевтическими средствами в высокой дозе с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В некоторых вариантах

осуществления изобретения после трансплантации индивидуумам вводят путем инфузии размноженные иммунные клетки, предлагаемые в настоящем изобретении. В еще одном варианте осуществления изобретения размноженные клетки вводят до или после хирургического вмешательства.

Другие определения.

Если специально не указано иное, то множественное число и единственное число и понятие "по меньшей мере один" используются взаимозаменяемо и означают "один" или "более чем один".

Аминокислотные остатки в полипептидной последовательности обозначают в настоящем описании с помощью однобуквенного кода, согласно которому, например, Q обозначает Gln или остаток глутамина, R обозначает Arg или остаток аргинина и D обозначает Asp или остаток аспарагиновой кислоты.

Аминокислотная замена обозначает замену одного аминокислотного остатка на другой, например замена остатка аргинина на остаток глутамина в пептидной последовательности представляет собой аминокислотную замену.

Нуклеотиды обозначают следующим образом.

Однобуквенный код используют для обозначения основания нуклеозида: а обозначает аденин, t обозначает тимин, с обозначает цитозин и g обозначает гуанин. Для вырожденных нуклеотидов г обозначает g или а (пуриновые нуклеотиды), k обозначает g или t, s обозначает g или с, w обозначает а или t, m обозначает а или с, у обозначает t или с (пиримидиновые нуклеотиды), d обозначает g, а или t, v обозначает g, а или с, b обозначает g, t или с, h обозначает а, t или с и n обозначает g, а, t или с.

В контексте настоящего описания понятия "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотиды" относятся к нуклеотидам и/или полинуклеотидам, таким как дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) или рибонуклеиновая кислота (РНК), олигонуклеотидам, фрагментам, созданным с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), и фрагментам, созданным путем лигирования, расщепления, обработки эндонуклеазами и обработки экзонуклеазами. Молекулы нуклеиновой кислоты могут состоять из мономеров, которые являются встречающимися в естественных условиях нуклеотидами (такими как ДНК или РНК) или аналогами встречающихся в естественных условиях нуклеотидов (например, энантиомерными формами встречающихся в естественных условиях нуклеотидов), или представляют собой их комбинацию. Модифицированные нуклеотиды могут иметь изменения в сахарных фрагментах и/или во фрагментах, содержащих пиримидиновые или пуриновые основания. Модификации сахаров включают, например, замену одной или нескольких гидроксильных групп на галогены, алкильные группы, амины и азидогруппы, или сахара могут быть функционализированы до простых или сложных эфиров. Кроме того, весь сахарный фрагмент может быть заменен стерически и электронно сходными структурами, такими как аза-сахара и карбоциклические аналоги сахаров. Примерами модификаций во фрагменте, представляющем собой основание, могут служить алкилированные пурины и пиримидины, ацилированные пурины или пиримидины или другие хорошо известные гетероциклические заместители. Момеры нуклеиновой кислоты могут быть сшиты фосфодиэфирными связями или аналогами таких связей. Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными.

Под химерным антигенным рецептором (CAR) подразумевают молекулы, в которых объединен связывающий домен, направленный против компонента, присутствующего на клетке-мишени, например, присущую антителу специфичность в отношении требуемого антигена (например, опухолевого антигена), с активирующим Т-клеточный рецептор внутриклеточным доменом, в результате чего образуется химерный белок, обладающий специфической клеточной иммунной активностью в отношении мишени. Как правило, CAR состоит из внеклеточного одноцепочечного антитела (scFvFc), слитого с внутриклеточным сигнальным доменом зета-цепи комплекса Т-клеточный антиген-рецептор (scFvFc:ζ, и при экспрессии в Т-клетках он обладает способностью перенаправлять распознавание антигена благодаря специфичности моноклонального антитела. Одним из примеров CAR, применяемого в настоящем изобретении, является CAR, направленный против антигена CD19, и он может, например, содержать (но не ограничиваясь только ей) аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 14.

Понятие "эндонуклеаза" относится к ферменту дикого типа или его варианту, обладающему способностью катализировать гидролиз (расщепление) связей между нуклеиновыми кислотами в молекуле ДНК или РНК, предпочтительно в молекуле ДНК. Эндонуклеазы не расщепляют молекулу ДНК или РНК независимо от ее последовательности, но они распознают и расщепляют молекулу ДНК или РНК в специфических полинуклеотидных последовательностях, в дальнейшем обозначенных как "последовательности-мишени" или "сайты-мишени". Эндонуклеазы можно классифицировать как редко расщепляющие эндонуклеазы, для которых, как правило, полинуклеотидный сайт распознавания имеет длину более 12 пар оснований (bp), более предпочтительно 14-55 пар оснований. Редко расщепляющие эндонуклеазы значительно повышают гомологичную рекомбинацию (HR), индуцируя двухцепочечные разрывы ДНК (DSB) в определенном локусе (Perrin, Buckle и др., 1993; Rouet, Smih и др., 1994; Choulika, Perrin и др., 1995; Pingoud и Silva, 2007). Редко расщепляющие эндонуклеазы могут представлять собой, например, хоминг-эндонуклеазу (Paques и Duchateau, 2007), химерную нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), образованную слиянием сконструированных доменов "цинковых пальцев" с каталитическим доменом рестриктазы, такой как FokI (Porteus и Carroll, 2005), эндонуклеазу Cas9 из системы CRISPR (Gasiunas, Barrangou и др., 2012; Jinek, Chylinski и др., 2012; Cong, Ran и др., 2013; Mali, Yang и др., 2013) или хи-

мическую эндонуклеазу (Eisenschmidt, Lanio и др., 2005; Agimondo, Thomas и др., 2006). В химических эндонуклеазах химический или пептидный расщепляющий компонент конъюгируют либо с полимером нуклеиновой кислоты, либо с другой ДНК, распознающей специфическую последовательность-мишень, тем самым обеспечивая направление расщепляющей активности на специфическую последовательность. Химические эндонуклеазы включают также синтетические нуклеазы типа конъюгатов ортофенантролина, ДНК-расщепляющей молекулы и триплекс-образующих олигонуклеотидов (TFO), которые, как известно, связываются со специфическими последовательностями ДНК (Kalish и Glazer, 2005). Такие химические эндонуклеазы подпадают под понятие "эндонуклеазы" в контексте настоящего изобретения.

Под "TALE-нуклеазой" (TALEN) понимают слитый белок, который состоит из связывающего нуклеиновую кислоту домена, как правило, выведенного из подобного активатору транскрипции эффектора (TALE), и одного нуклеазного каталитического домена для расщепления последовательности нуклеиновой кислоты-мишени. Каталитический домен предпочтительно представляет собой нуклеазный домен и более предпочтительно домен, обладающий эндонуклеазной активностью, например, типа I-TevI, ColE7, NucA и Fok-I. В конкретном варианте осуществления изобретения домен TALE может быть слит с мегануклеазой, например, типа I-CreI и I-OnuI, или ее функциональным вариантом. В более предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная нуклеаза представляет собой мономерную TALE-нуклеазу. Мономерная TALE-нуклеаза представляет собой TALE-нуклеазу, которая не требует димеризации для специфического распознавания и расщепления, например, в виде слияний сконструированных повторов TAL с каталитическим доменом I-TevI, описанным в WO 2012/138927. Подобные активатору транскрипции эффекторы: (TALE) представляют собой белки из видов бактерий рода *Xanthomonas*, содержащие несколько повторяющихся последовательностей, где каждый повтор содержит di-остатки (двойные остатки) в положениях 12 и 13 (RVD), обладающие специфичностью в отношении каждого нуклеотидного основания последовательности нуклеиновой кислоты-мишени. Связывающие домены, обладающие сходными модульными свойствами связывания нуклеиновых кислот по типу основание-с-основанием ("base-pair-base") (MBBBD) могут быть выведены также из новых модульных белков, недавно обнаруженных заявителями в различных видах бактерий. Преимущество новых модульных белков заключается в том, что они характеризуются большей вариабельностью последовательности, чем TAL-повторы. Предпочтительно RVD, ассоциированные с распознаванием различных нуклеотидов, представляют собой HD для распознавания C, NG для распознавания T, NI для распознавания A, NN для распознавания G или A, NS для распознавания A, C, G или T, HG для распознавания T, IG для распознавания T, NK для распознавания G, HA для распознавания C, ND для распознавания C, HI для распознавания C, HN для распознавания G, NA для распознавания G, SN для распознавания G или A и YG для распознавания T, TL для распознавания A, VT для распознавания A или G и SW для распознавания A. В другом варианте осуществления изобретения имеющие решающее значение аминокислоты 12 и 13 можно изменять путем мутации на другие аминокислотные остатки для модуляции их специфичности в отношении нуклеотидов A, T, C и G и, прежде всего, для повышения их специфичности. Ранее уже была описана TALE-нуклеаза, и ее применяют для стимуляции генного нацеливания и генных модификаций (Boch, Scholze и др., 2009; Moscou и Bogdanove, 2009; Christian, Cermak и др., 2010; Li, Huang и др., 2011). Сконструированные TAL-нуклеазы поступают в продажу под товарным знаком TALEN® (фирма Collectis, 8 rue de la Croix Jarry, 75013, Париж, Франция).

Редко расщепляющая эндонуклеаза, предлагаемая в настоящем изобретении, может представлять собой также эндонуклеазу Cas9. В последние годы был разработан новый инструмент для генетической инженерии на основе РНК-направляемой нуклеазы Cas9 (Gasiunas, Barrangou и др., 2012; Jinek, Chylinski и др., 2012; Cong, Ran и др., 2013; Mali, Yang и др., 2013) из адаптивной иммунной системы CRISPR (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (Clustered Regularly Interspaced Short palindromic Repeats)) типа II прокариот (см. обзор Sorek, Lawrence и др., 2013). CRISPR-ассоциированная (Cas) система впервые была обнаружена в бактериях, и ее функция состоит в защите от чужой вирусной или плазмидной ДНК. При осуществлении опосредуемой CRISPR генетической инженерии сначала проводят отбор последовательности-мишени, часто фланкированной короткой последовательностью мотива, который обозначают как примыкающий к протоспейсеру мотив (PAM). После отбора последовательности-мишени конструируют специфическую crPНК (CRISPR-РНК), комплементарную указанной последовательности-мишени. Для систем CRISPR типа II требуется транскрибирующая crPНК (tracrPНК), спаренная с crRNA и связанная с внесенным белком Cas9. Cas9 функционирует в качестве молекулярного якоря, облегчающего спаривание оснований tracrPНК с crPНК (Deltcheva, Chylinski и др., 2011). В этом тройном комплексе двойная структура tracrPНК:crPНК функционирует в качестве направляющей РНК, которая направляет эндонуклеазу Cas9 к когнатной последовательности-мишени. Распознавание мишени комплексом Cas9-tracrPНК:crPНК инициируется путем сканирования последовательности-мишени для обнаружения гомологии между последовательностью-мишенью и crPНК. Помимо комплементарности последовательности-мишени и crPНК, нацеливание ДНК требует присутствия короткого мотива, примыкающего к протоспейсеру (примыкающий к протоспейсеру мотив - PAM). После спаривания двойной РНК и последовательности-мишени Cas9 интродуцирует "тупой" двухцепочечный разрыв на расстоянии 3 пар оснований в обратном направлении относительно мотива PAM (Garneau, Du-

puis и др., 2010).

Редко расщепляющая эндонуклеаза может представлять собой хоминг-эндонуклеазу, также известную под названием мегануклеаза. Такие хоминг-эндонуклеазы хорошо известны в данной области (Stoddard, 2005). Хоминг-эндонуклеазы распознают последовательность ДНК-мишени и создают одноцепочечный или двухцепочечный разрыв. Хоминг-эндонуклеазы обладают высокой специфичностью, распознавая сайты ДНК-мишени длиной от 12 до 45 пар оснований (bp), как правило, длиной от 14 до 40 пар оснований. Хоминг-эндонуклеаза, предлагаемая в изобретении, может соответствовать, например, эндонуклеазе LAGLIDADG, эндонуклеазе HNH или эндонуклеазе GIY-YIG. Предпочтительно хоминг-эндонуклеаза, предлагаемая в настоящем изобретении, может представлять собой вариант I-CreI.

Под "вектором для доставки" или "векторами для доставки" понимают любой доставляющий вектор, который можно применять согласно настоящему изобретению для приведения в контакт с клеткой (т.е. для "контактирования") или доставки внутрь клетки или в субклеточные компартменты (т.е. для "интродукции") агентов/химических веществ и молекул (белков или нуклеиновых кислот), требующихся для осуществления настоящего изобретения. К ним относятся (но не ограничиваясь только ими) липосомальные векторы для доставки, вирусные векторы для доставки, векторы для доставки лекарственного средства, химические носители, полимерные носители, липоплексы, полиплексы, дендримеры, микропузырьки (ультразвуковые контрастные агенты), наночастицы, эмульсии или другие пригодные векторы для переноса. Такие векторы для доставки позволяют доставлять молекулы, химические вещества, макромолекулы (гены, белки) или другие векторы, такие как плазмиды, пептиды, разработанные фирмой Diatos. В этих случаях векторы для доставки представляют собой молекулы-носители. Под "вектором для доставки" или "векторами для доставки" понимают также методы доставки, предназначенные для осуществления трансфекции.

Понятия "вектор" или "векторы" относятся к молекуле нуклеиновой кислоты, обладающей способностью транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она сцеплена. К "векторам", применяемым согласно настоящему изобретению, относятся (но не ограничиваясь только ими) вирусный вектор, плазида, РНК-вектор или молекула линейной или кольцевой ДНК или РНК, которые могут состоять из хромосомальных, нехромосомальных, полусинтетических или синтетических нуклеиновых кислот. Предпочтительными векторами являются векторы, которые способны автономно реплицировать (эписомальный вектор) и/или экспрессировать нуклеиновые кислоты, с которыми они сцеплены (экспрессионные векторы). Специалистам в данной области известно большое количество пригодных векторов, которые поступают в продажу.

К вирусным векторам относятся ретровирус, аденовирус, парвовирус (например, аденоассоциированный вирус), коронавирусы, РНК-вирусы с негативной цепью, такие как ортомиксовирус (например, вирус гриппа), рабдовирус (например, вирус бешенства и вирус везикулярного стоматита), парамиксовирус (например, вирус кори и вирус Сендай), РНК-вирусы с позитивной цепью, такие как пикорнавирус и альфавирус, и вирусы с двухцепочечной ДНК, включая аденовирус, вирус герпеса (например, вирус герпеса простого типов 1 и 2, вирус Эпштейна-Барра, цитомегаловирус) и вирус оспы (например, вирус коревой оспы, вирус оспы птиц и вирус оспы канарейки). Другие вирусы включают, например, вирус Норовалк, тогавирус, флавивирус, реовирусы, паповирус, гепаднавирус и вирус гепатита. Примерами ретровирусов являются вирус птичьего лейкоза-саркомы, вирусы млекопитающих С-типа, В-типа, вирусы D-типа, группа HTLV-BLV, лентивирус, спумавирус (Coffin J. ML, Retroviridae: The viruses and their replication, в Fundamental Virology, 3-е изд., под ред. B.N. Fields и др., изд-во Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996).

Под "лентивирусным вектором" подразумевают лентивирусные векторы на основе ВИЧ, которые являются очень перспективными с точки зрения доставки гена благодаря их относительно большой способности к упаковке, пониженной иммуногенности и их способности стабильно трансдуцировать с высокой эффективностью большой спектр различных типов клеток. Лентивирусные векторы, как правило, создают посредством кратковременной трансфекции клеток-продуцентов тремя (упаковывающая плазида, оболочечная плазида и плазида переноса) или большим количеством плазмид. Подобно ВИЧ, лентивирусные векторы проникают в клетку-мишень посредством взаимодействия гликопротеинов вирусной поверхности с рецепторами на клеточной поверхности. После проникновения вирусная РНК подвергается обратной транскрипции, опосредуемой комплексом вирусной обратной транскриптазы. Продуктом обратной транскрипции является двухцепочечная линейная вирусная ДНК, которая служит субстратом для вирусной интеграции в ДНК инфицированных клеток. Понятие "интегрирующие лентивирусные векторы (или LV)" обозначает, например (но не ограничиваясь только ими), такие векторы, которые способны интегрироваться в геном клетки-мишени. В противоположность этому понятие "неинтегрирующие лентивирусные векторы (или NILV)" обозначает эффективные векторы для доставки генов, которые не интегрируются в геном клетки-мишени под действием вирусной интегразы.

Векторы для доставки и векторы можно объединять или комбинировать с любыми методами клеточной пермеабиллизации, такими как сонопорация или электропорация, или вариантами этих методов.

Под клеткой или клетками подразумевают любые эукариотические живые клетки, первичные клетки и клеточные линии, выведенные из указанных организмов для получения культур *in vitro*.

Под "первичной клеткой" или "первичными клетками" подразумевают клетки, взятые непосредственно из живой ткани (т.е. материал, полученный путем биопсии) и подготовленные для выращивания *in vitro*, в популяции которых имело место лишь небольшое количество удвоений и следовательно они являются более репрезентативными с точки зрения основных функциональных компонентов и характеристик тканей, из которых они выведены, по сравнению с непрерывно поддерживаемыми или искусственно иммортализованными онкогенными клеточными линиями.

Примерами таких клеточных линий могут являться (но не ограничиваясь только ими) клеточные линии, выбранные из группы, состоящей из клеток линии CHO-K1; клеток линии HEK293; клеток линии Caco2; клеток линии U2-OS; клеток линии NIH 3T3; клеток линии NSO; клеток линии SP2; клеток линии CHO-S; клеток линии DG44; клеток линии K-562, клеток линии U-937; клеток линии MRC5; клеток линии IMR90; клеток линии Jurkat; клеток линии HepG2; клеток линии HeLa; клеток линии HT-1080; клеток линии HCT-116; клеток линии Hu-h7; клеток линии Nuvec; клеток линии Molt 4.

Все эти клеточные линии можно модифицировать с помощью способа, предлагаемого в настоящем изобретении, создавая модели клеточных линий для получения, экспрессии, количественной оценки, обнаружения, изучения представляющего интерес гена или белка; эти модели можно применять также скрининга представляющих интерес биологически активных молекул для исследовательских и промышленных целей в различных областях, например, таких как (но не ограничиваясь только ими) химия, биотопливо, терапевтические средства и агрономия.

Под "мутацией" подразумевают замену, делецию или инсерцию одного/одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати, двенадцати, тринадцати, четырнадцати, пятнадцати, двадцати, двадцати пяти, тридцати, сорока, пятидесяти или большего количества нуклеотидов/аминокислот в полинуклеотидной (кДНК, ген) или полипептидной последовательности. Мутация может влиять на кодирующую последовательность гена или его регуляторную последовательность. Она может влиять также на структуру геномной последовательности или структуру/стабильность кодируемой мРНК.

Под "вариантом(ами)" подразумевают вариант повтора, вариант, ДНК-связывающий вариант, вариант TALE-нуклеазы, вариант полипептида, полученный в результате мутации или замены по меньшей мере одного остатка в аминокислотной последовательности родительской молекулы.

Под "функциональным вариантом" подразумевают обладающий каталитической активностью мутант белка или домена белка; такой мутант может обладать такой же активностью, что и родительский белок или домен белка, или дополнительными свойствами, или более высокой или более низкой активностью.

Понятие "идентичность" относится к идентичности последовательностей двух молекул нуклеиновых кислот или полипептидов. Идентичность можно оценивать путем сравнения положений в каждой из последовательностей, которые можно выравнивать для целей сравнения. Если положение в сравниваемой последовательности занято тем же самым основанием, то молекулы являются идентичными в этом положении. Степень сходства или идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями является функцией количества идентичных или совпадающих нуклеотидов в положениях нуклеотидных последовательностей. Для расчета идентичности двух последовательностей можно использовать различные алгоритмы и/или программы сравнительного анализа первичной структуры последовательностей, включая FASTA или BLAST, которые доступны в виде компонента пакета программ анализа последовательностей GCG (Университет Висконсина, Мэдисон, шт. Висконсин), и их можно применять, например, с использованием задаваемых по умолчанию параметров. Например, можно рассматривать полипептиды, обладающие идентичностью, составляющей по меньшей мере 70, 85, 90, 95, 98 или 99%, с конкретными полипептидами, представленными в настоящем описании, и предпочтительно обладающие практически такими же функциями, а также полинуклеотиды, кодирующие такие полипептиды.

Понятие "сходство" характеризует степень родства между аминокислотными последовательностями двух или большего количества полипептидов. BLASTP можно применять также для идентификации аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 87,5, 90, 92,5, 95, 97,5, 98, 99% аминокислотной референс-последовательности, с использованием матриц сходства, таких как BLOSUM45, BLOSUM62 или BLOSUM80. Если специально не указано иное, то указанные в описании баллы сходства получены с использованием BLOSUM62. При использовании BLASTP процент сходства основан на рассчитанном программой BLASTP балле положительных оценок, а процент идентичности последовательностей основан на рассчитанном BLASTP балле идентичности. Рассчитанные с помощью BLASTP "идентичности" представляют собой количество и пропорцию идентичных остатков относительно общего количества остатков в парах последовательностей с высокими баллами; а рассчитанные с помощью BLASTP "положительные оценки" представляют собой количество и пропорцию остатков, для которых полученные при сравнительном анализе первичной структуры последовательностей баллы, являющиеся положительными, и которые сходны друг с другом. В настоящей заявке предложены и подпадают под объем изобретения аминокислотные последовательности, имеющие указанные степени идентичности или сходства или любую промежуточную степень идентичности или сходства с представ-

ленными в настоящем описании аминокислотными последовательностями. Полинуклеотидные последовательности сходных полипептидов выводят с использованием генетического кода и их можно получать с помощью общепринятых методов. Полинуклеотид, кодирующий такой функциональный вариант, можно получать путем обратной трансляции его аминокислотной последовательности с использованием генетического кода.

Понятия "домен трансдукции сигнала" или "костимуляторный лиганд" относятся к молекуле на антигенпрезентирующей клетке, которая специфически связывается с когнатной костимуляторной молекулой на Т-клетке, обеспечивая тем самым сигнал, который в дополнение к первичному сигналу, обеспечиваемому, например, связыванием комплекса TCR/CD3 с молекулой ГКГС, загруженной пептидом, опосредует Т-клеточный ответ, включая (но не ограничиваясь только ими) активацию пролиферации, дифференцировку и т.п. Костимуляторным лигандом могут служить (но не ограничиваясь только ими) CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, индуцибельный костимуляторный лиганд (ICOS-L), молекула межклеточной адгезии (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, рецептор лимфотоксина бета, 3/TR6, ILT3, ILT4, агонист или антитело, который/которое связывается с лигандом Толл-рецептора, и лиганд, который специфически связывается с B7-H3. Костимуляторный лиганд включает также, среди прочего, антитело, которое специфически связывается с костимуляторной молекулой, присутствующей на Т-клетке, такой как (но не ограничиваясь только ими) CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, ассоциированный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, лиганд, который специфически связывается с CD83.

Понятие "костимуляторная молекула" относится к когнатному связывающему партнеру на Т-клетке, который специфически связывается с костимуляторным лигандом, опосредуя тем самым костимуляторный ответ клетки, такой как (но не ограничиваясь только им) пролиферация. Костимуляторные молекулы включают (но не ограничиваясь только ими) молекулу ГКГС класса I, BTLA и лиганд Толл-рецептора.

В контексте настоящего описания понятие "костимуляторный сигнал" относится к сигналу, который в сочетании с первичным сигналом, таким как сигнал, обусловленный сцеплением TCR/CD3, приводит к пролиферации Т-клеток и/или повышающей или понижающей регуляции имеющих решающее значение молекул.

В контексте настоящего описания понятие "внеклеточный лигандсвязывающий домен" обозначает олиго- или полипептид, который обладает способностью связываться с лигандом. Предпочтительно домен должен обладать способностью взаимодействовать с молекулой клеточной поверхности. Например, можно выбирать внеклеточный лигандсвязывающий домен для распознавания лиганда, который функционирует в качестве маркера клеточной поверхности на клетках-мишенях, ассоциированных с конкретным болезненным состоянием. Так, примерами маркеров клеточной поверхности, которые могут функционировать в качестве лигандов, являются маркеры, ассоциированные с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями, аутоиммунным заболеванием и раковыми клетками.

В контексте настоящего описания понятие "индивидуум" или "пациент" включает всех представителей царства животных, в том числе приматов кроме человека и человека.

В представленном выше описании изобретения изложены подход и способ его осуществления и применения, так что любой специалист в данной области способен осуществлять и применять его, эта возможность относится, прежде всего, к сущности изобретения, изложенной в прилагаемой формуле изобретения, которая представляет собой составную часть исходного описания.

Если в настоящем описании указаны численные пределы или численный диапазон, то они включают их границы. Кроме того, считается, что включены все значения и поддиапазоны, находящиеся в указанных пределах или указанном численном диапазоне, как если бы они были специально указаны.

Приведенное выше описание представлено для того, чтобы дать возможность специалисту в данной области осуществлять и применять изобретение, и оно изложено в контексте конкретного применения и требуемых для этого условий. Специалистам в данной области должны быть очевидны различные модификации предпочтительных вариантов осуществления изобретения, и общие принципы, указанные в нем могут быть применены для других вариантов осуществления изобретения и применений без отклонения от сущности и объема изобретения. Таким образом, не следует считать, что настоящее изобретение ограничено представленными вариантами осуществления изобретения, напротив, оно соответствует наиболее широкому объему, согласующемуся с принципами и отличительными признаками, указанными в настоящем описании.

Имея общее описание настоящего изобретения, можно достичь более полного понимания после ознакомления с некоторыми конкретными примерами, которые представлены в настоящем описании только для целей иллюстрации и не направлены на ограничение объема, если специально не указано иное.

Примеры

Пример 1. Пролиферация клеток с инактивированным TCR- α экспрессирующим 4G7-CAR.

Конструировали и создавали гетеродимерную TALE-нуклеазу, нацеленную на две последовательности длиной 17 пар оснований (которые обозначали как полумишени), разделенные состоящим из 15

пар оснований спейсером в гене константной области α -цепи Т-клеточного рецептора (TRAC). Каждая из полумишенной распознавалась повторами половин TALE-нуклеаз, представленными в таблице.

Мишень	Последовательность-мишень	Последовательность повторов	Половина TALE-нуклеазы
TRAC_T01	TTGTCCCACAGATATCC Agaacctgacctg CCGTGTACCAGCTGAGA (SEQ ID NO: 20)	повтор TRAC_T01-L (SEQ ID NO: 21)	TRAC_T01-L TALEN (SEQ ID NO: 23)
		повтор TRAC_T01-R (SEQ ID NO: 22)	TRAC_T01-R TALEN (SEQ ID NO: 24)

Каждую конструкцию TALE-нуклеазы субклонировали с использованием расщепления рестриктазами в экспрессионном секторе млекопитающих под контролем промотора T7. мРНК, кодирующую TALE-нуклеазу, которая расщепляла геномную последовательность TRAC, синтезировали с использованием плазмиды, несущей кодирующую последовательность, расположенную в прямом направлении относительно промотора T7.

Очищенные Т-клетки, предварительно активированные в течение 72 ч покрытыми антителом к CD3/CD28 гранулами, трансфектировали каждой из 2 мРНК, кодирующих обе половины TRAC T01 TALE-нуклеаз. Через 48 ч после трансфекции Т-клетки трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим 4G7-CAR (SEQ ID NO: 14). Через 2 дня после трансдукции CD3^{NEG}-клетки очищали с использованием покрытых антителом к CD3 магнитных гранул и через 5 дней после трансдукции клетки реактивировали растворимым антителом к CD28 (5 мкг/мл).

Мониторинг клеточной пролиферации осуществляли в течение периода времени вплоть до 30 дней после реактивации, подсчитывая количество клеток 2 раза в неделю. На фиг. 1 представлена кратность индукции в виде отношения количества клеток к количеству клеток, присутствовавших в день 2 после реактивации, для двух различных доноров. Обнаружено увеличение пролиферации клеток с инактивированным TCR- α , экспрессирующим 4G7-CAR, прежде всего в том случае, когда их реактивировали антителом к CD28, по сравнению с нетрансдуцированными клетками.

Для изучения вопроса о том, находятся ли человеческие Т-клетки, экспрессирующие 4G7-CAR, в активированном состоянии, анализировали экспрессию маркера активации CD25 с помощью FACS через 7 дней после трансдукции. Как проиллюстрировано на фиг. 2, очищенные клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, кодирующим 4G7-CAR, экспрессировали значительно в большем количестве CD25 на своей поверхности, чем нетрансдуцированные клетки. Повышенный уровень экспрессии CD25 обнаружен как в условиях после реактивации антителом к CD28, так и в условиях без реактивации.

Пример 2. Сравнение исходной активации первичных человеческих Т-клеток, экспрессирующих 4G7-CAR и классический FMC63-CAR.

Для определения того, обеспечивает ли scFv 4G7 пролонгированное "активированное" состояние трансдуцированной клетки, сравнивали исходную активацию Т-клетки, трансдуцированной CAR, который нес scFv 4G7 (SEQ ID NO: 17, кодируемая SEQ ID NO: 15) или классический scFv FMC63 (SEQ ID NO: 16).

Очищенные человеческие Т-клетки трансдуцировали согласно представленному ниже протоколу: в целом он состоял в следующем: 1×10^6 CD3⁺-клеток, предварительно активированных в течение 3 дней с использованием покрытых антителом к CD3/CD28 гранул и рекомбинантным IL2, трансдуцировали лентивирусными векторами, кодирующими 4G7-CAR (SEQ ID NO: 15) и FMC63-CAR (SEQ ID NO: 16), с величиной MOI, равной 5, в 12-луночных не предназначенных для культур ткани планшетах, сенсibilизированных 30 мкг/мл ретронекина. Через 24 ч после трансдукции среду удаляли и заменяли свежей средой. После этого клетки поддерживали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в течение периода культивирования, осуществляя подсчет клеток каждые 2-3 дня.

Через 3, 8 и 15 дней после трансдукции лентивирусным вектором, кодирующим либо 4G7-CAR, либо FMC63-CAR, оценивали процент экспрессирующих CAR клеток с помощью проточной цитометрии. Установлено, что эффективность трансдукции была примерно эквивалентна эффективности трансдукции двумя лентивирусными векторами, что продемонстрировано на фиг. 3.

Затем проводили изучение того, характеризуются ли человеческие Т-клетки, экспрессирующие 4G7-CAR, более активированным состоянием, чем человеческие Т-клетки, экспрессирующие FMC63-CAR. Для этого сравнивали экспрессию маркера активации CD25 на поверхности Т-клеток, трансдуцированных 2 лентивирусными векторами, в различные моменты времени. Как продемонстрировано на фиг. 4, через 3 и 8 дней после трансдукции уровень экспрессии CD25 на поверхности клеток, трансдуцированных лентивирусным вектором, кодирующим 4G7-CAR, был значительно выше, чем на поверхности клеток, трансдуцированных лентивирусным вектором, кодирующим FMC63-CAR.

Размер клеток, трансдуцированных 4G7-CAR или FMC63-CAR, оценивали также с помощью проточной цитометрии в различные моменты времени. Установлено, что через 3, 8 и 15 дней после трансдукции клетки, экспрессирующие 4G7-CAR, имели больший размер, чем клетки, экспрессирующие FMC63-CAR, см. фиг. 5.

После неспецифической активации *in vitro* трансдуцированные 4G7-CAR клетки имели больший размер (образование бластов), а также уровень экспрессии маркеров активации (CD25) в течение более

продолжительного периода времени. Такая более продолжительная активация позволяет обеспечивать более продолжительную пролиферацию по сравнению с клетками, трансдуцированными сходным CAR, содержащим FMC63 ScFv.

Пример 3. Сравнение пролиферации первичных человеческих Т-клеток, экспрессирующих 4G7-CAR и классический FMC63-CAR.

Для определения того, обеспечивает ли scFv 4G7 более высокую пролиферирующую активность, оценивали пролиферацию Т-клеток, трансдуцированных CAR, несущим scFv 4G7 (SEQ ID NO: 17 кодируемая SEQ ID NO: 15) или классический scFv FMC63 (SEQ ID NO: 16), в течение периода времени вплоть до 20 дней, осуществляя подсчет количества клеток два раза в неделю. Очищенные человеческие Т-клетки трансдуцировали согласно представленному ниже протоколу, в целом он состоял в следующем: 1×10^6 CD3⁺-клеток, предварительно активированных в течение 3 дней с использованием покрытых антигеном к CD3/CD28 гранул и рекомбинантным IL2, трансдуцировали лентивирусными векторами, кодирующими 4G7-CAR (SEQ ID NO: 15) и FMC63-CAR (SEQ ID NO: 16). После этого клетки поддерживали в классических условиях и реактивировали в день 12. Клетки высевали с одинаковой плотностью и подсчитывали их количество два раза в неделю в течение 20 дней. Как проиллюстрировано на фиг. 6, пролиферирующая активность Т-клеток, экспрессирующих 4G7-CAR, была в два раза выше, чем активность клеток, экспрессирующих классический FMC63-CAR.

Ссылки.

Arimondo P. B., C. J. Thomas и др., "Exploring the cellular activity of camptothecin-triple-helix-forming oligonucleotide conjugates", *Mol Cell Biol* 26(1), 2006, сс. 324-333;

Atkins J. F., N. M. Wills и др., "A case for "StopGo": reprogramming translation to augment codon meaning of GGN by promoting unconventional termination (Stop) after addition of glycine and then allowing continued translation (Go)", *Rna* 13(6), 2007, сс. 803-810;

Bierer B. E., G. Hollander и др., "Cyclosporin A and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology", *Curr Opin Immunol* 5(5), 1993, сс. 763-773%;

Boch J., H. Scholze и др., "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors", *Science* 326(5959), 2009, сс. 1509-1512;

Choulika A., A. Perrin и др., "Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*", *Mol Cell Biol* 15(4), 1995, сс. 1968-1973;

Christian M., T. Cermak и др., "Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases", *Genetics* 186(2), 2010, сс. 757-761;

Cong L., F. A. Ran и др., "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems", *Science* 339(6121), 2013, сс. 819-823;

Deltcheva E., K. Chylinski и др., "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III", *Nature* 471(7340), 2011, сс. 602-607;

Donnelly M. и G. Elliott, "Nuclear localization and shuttling of herpes simplex virus tegument protein VP13/14", *J Virol* 75(6), 2001, сс. 2566-2574;

Doronina V. A., C. Wu и др., "Site-specific release of nascent chains from ribosomes at a sense codon", *Mol Cell Biol* 28(13), 2008, сс. 4227-4239;

Eisenschmidt K., T. Lanio и др., "Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage", *Nucleic Acids Res* 33(22), 2005, сс. 7039-7047;

Garneau J. E., M. E. Dupuis и др., "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA", *Nature* 468(7320), 2010, сс. 67-71;

- Gasiunas G., R. Barrangou и др., "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria", *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(39), 2012, сс. E2579-2586;
- Henderson D. J., I. Naya и др., "Comparison of the effects of FK-506, cyclosporin A and rapamycin on IL-2 production", *Immunology* 73(3), 1991, сс. 316-321;
- Jena B., G. Dotti и др., "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor ", *Blood* 116(7), 2010), сс. 1035-1044;
- Jinek M., K. Chylinski и др., "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity", *Science* 337(6096), 2012, сс. 816-821;
- Kalish J. M. и P. M. Glazer, "Targeted genome modification via triple helix formation", *Ann N Y Acad Sci* 1058, 2005, сс. 151-161;
- Li T., S. Huang и др., "TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain", *Nucleic Acids Res* 39(1), 2011, сс. 359-372;
- Liu J., M. W. Albers и др., "Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity", *Biochemistry* 31(16), 1992, сс. 3896-3901.
- Mali P., L. Yang и др., "RNA-guided human genome engineering via Cas9", *Science* 339(6121), 2013, сс. 823-826;
- Moscou M. J. и A. J. Bogdanove, "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors", *Science* 326(5959), 2009, с. 1501;
- Paques F. и P. Duchateau, "Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy", *Curr Gene Ther* 7(1), 2007, сс. 49-66;
- Park T. S., S. A. Rosenberg и др., "Treating cancer with genetically engineered T cells", *Trends Biotechnol* 29(11), 2011, сс. 550-557;
- Peipp M., D. Saul и др., "Efficient eukaryotic expression of fluorescent scFv fusion proteins directed against CD antigens for FACS applications", *J Immunol Methods* 285(2), 2004, сс. 265-280;
- Perrin A., M. Buckle и др., "Asymmetrical recognition and activity of the I-SceI endonuclease on its site and on intron-exon junctions", *Embo J* 12(7), 1993, сс. 2939-2947;
- Pingoud A. и G. H. Silva, "Precision genome surgery", *Nat Biotechnol* 25(7), 2007, сс. 743-744;
- Porteus M. H. и D. Carroll, "Gene targeting using zinc finger nucleases", *Nat Biotechnol* 23(8), 2005, сс. 967-973;
- Rouet P., F. Smih и др., "Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease", *Mol Cell Biol* 14(12), 1994, сс. 8096-8106;
- Sorek R., C. M. Lawrence и др., "CRISPR-mediated Adaptive Immune Systems in Bacteria and Archaea", *Annu Rev Biochem.* 2013;
- Stoddard B. L., "Homing endonuclease structure and function", *Q Rev Biophys* 38(1), 2005, сс. 49-95.

Перечень последовательностей

<110> СЕЛЛЕКТИС

<120> CD19-СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ХИМЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

<130> P81403460PCT00

<150> PCT/US2013/040755
<151> 2013-05-13

<150> PCT/US2013/040766
<151> 2013-05-13

<150> US 13/892,805
<151> 2013-05-13

<150> USP 61/888,259
<151> 2013-10-08

<160> 24

<170> PatentIn, версия 3.5

<210> 1

<211> 464
<212> FRT
<213> mus musculus

<220>
<223> иммуноглобулиновая тяжелая цепь гамма 1 античеловеческого моноклонального антитела к CD19 4G7

<400> 1
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn

036200

<220>

<223> иммуноглобулиновая легкая цепь каппа античеловеческого моноклонального антитела к CD19 4G7

<400> 2

Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
1 5 10 15

Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
35 40 45

Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala
65 70 75 80

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

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

Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp
165 170 175

Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp
180 185 190

036200

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys
195 200 205

Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys
210 215 220

Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225 230 235

<210> 3

<211> 121

<212> PRT

<213> mus musculus

<220>

<223> фрагмент иммуноглобулиновой тяжелой цепи гамма 1 античеловеческого
моноклонального антитела к CD19 4G7 (остатки 20-140)

<400> 3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

036200

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> mus musculus

<220>

<223> фрагмент иммуноглобулиновой легкой цепи каппа античеловеческого
 моноклонального антитела к CD19 4G7 (остатки 21-130)

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

Arg Ala Asp
 115

<210> 5

<211> 116

<212> PRT

036200

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> фрагмент иммуноглобулиновой легкой цепи каппа античеловеческого моноклонального антитела к CD19 4G7

<400> 5

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Arg Ser Asp Pro
115

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> описание искусственная последовательность: синтетический олигопептид

<220>

<223> линкер

<400> 6

036200

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 7

<211> 252

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<220>

<223> scFV 4G7, версия 1

<400> 7

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala
 130 135 140

036200

Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg
145 150 155 160

Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp
 165 170 175

Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met
 180 185 190

Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 195 200 205

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

Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly
225 230 235 240

Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro
 245 250

<210> 8

<211> 251

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<220>

<223> scFV 4G7, версия 2

<400> 8

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

036200

245

250

<210> 9

<211> 250

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<220>

<223> scFV FMC63

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Lys Ala Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser
130 135 140

036200

Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp
 145 150 155 160

Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp
 165 170 175

Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu
 180 185 190

Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe
 195 200 205

Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 210 215 220

Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 225 230 235 240

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp
 245 250

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<223> фрагмент зета-цепи гликопротеина CD3 T-клеточной поверхности

<400> 10

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60

036200

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 11

<211> 42

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<223> фрагмент 4-1BB (остатки 214-255)

<400> 11

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Glr Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 12

<211> 41

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<223> фрагмент специфического в отношении Т-клетки поверхностного гликопротеина CD28

<400> 12

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

036200

<223> 4G7-CAR, версия 1

<400> 14

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 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
20 25 30

Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45

Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys
65 70 75 80

Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser
85 90 95

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val
115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
145 150 155 160

Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val
165 170 175

Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn
180 185 190

Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu

036200

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr
 65 70 75 80

Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser
 85 90 95

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
 100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met
 145 150 155 160

Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser
 165 170 175

Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr
 180 185 190

Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu
 195 200 205

Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 210 215 220

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu
 225 230 235 240

Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro
 245 250 255

Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro
 260 265 270

036200

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 275 280 285

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

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

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

Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 340 345 350

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
 355 360 365

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg
 370 375 380

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
 385 390 395 400

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 405 410 415

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 420 425 430

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
 435 440 445

036200

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490 495

<210> 16

<211> 494

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<220>

<223> FMC63-CAR

<400> 16

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp
 35 40 45

Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn
 100 105 110

Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Lys
 115 120 125

Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140

036200

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
 145 150 155 160

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

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys
 180 185 190

Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr
 195 200 205

Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys
 210 215 220

Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala
 225 230 235 240

Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met
 245 250 255

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp Pro Thr
 260 265 270

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

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

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

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

Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
 340 345 350

036200

Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
355 360 365

Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
370 375 380

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
385 390 395 400

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
405 410 415

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
420 425 430

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
435 440 445

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
450 455 460

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
465 470 475 480

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210> 17

<211> 1488

<212> DNA

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<220>

<223> 4G7-CAR, версия 2

<400> 17

atggagaccg acaccctgct gctgtgggtg ctgctgctgt cggtgccagg cagcaccggc 60

036200

```

gagggtgcagc tgcagcagag cggaccgag ctgatcaagc caggcgccag cgtgaagatg 120
agctgcaagg ccagcggcta caccctcacc agctacgtga tgcactgggt gaagcagaag 180
ccaggccagg gcctggagtg gatcggctac atcaaccctt acaacgacgg caccaagtac 240
aacgagaagt tcaagggaag gccaccctg accagcgaca agagcagcag caccgcctac 300
atggagctga gcagcctgac cagcaggagc agcgcctgtt actactgccc cagaggcacc 360
tactactacg gcagccgggt gttcgactac tggggccagg gcaccaccct gaccgtgagc 420
tctggcggag gcggctctgg cggagcggc tctggcggag gcggcagcga catcgtgatg 480
accagggctg cccccagcat ccccgtgacc ccaggcgaga gcgtgagcat cagctgccgg 540
agcagcaaga gcctgctgaa cagcaacggc aacacctacc tgtactggtt cctgcagcgg 600
ccaggccaga gccccagct gctgatctac cggatgagca acctggccag cggcgtgcc 660
gaccggttca gcggcagcgg cagcggcacc gccttcacc tgcggatcag ccgggtggag 720
gccgaggacg tgggctgta ctactgcatg cagcacctgg agtaccctt caccctcgga 780
gccggcacca agctggagct gaagcggctg gatcccacca ccaccaccg cccaccgcca 840
cctaccctg cccaaccat cggcagccag cccctgagcc tgcggcctga agcctgcagg 900
cctgccggcg gaggagcctg gcacacaagg ggctggact tgcctgcca catctatctc 960
tgggcccccc tggcgggac atgcccgggtg ctgctgctgt cctggtgat taccctgtat 1020
tgcaaacggg gccggaagaa gctgctgtac atcttcaagc agcccttcat gcggcccgtg 1080
cagaccacc aggaggagga cggctgcagc tgcgggttcc ccgaggaaga ggaaggcggc 1140
tgcgagctgc ggtggaagt cagccggagc gccgacgccc cagcctacca gcaggccag 1200
aaccagctgt acaacgagct gaacctggga cggcgggagg agtacgagct gctggacaag 1260
cggcggggac gggacccga gatggcggc aagcctgcc ggaagaatcc ccaggagggc 1320
ctgtacaacg agctgcagaa ggacaagatg gccgagcct acagcgagat cggcatgaag 1380
ggcagcggc gccgggcaa gggccacgac ggcctgtacc agggcctgag caccgccacc 1440
aaggacacct acgacccct gcacatgag gcctgccac cccggtga 1488

```

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> описание искусственной последовательности: синтетический олигопептид

<220>

<223> сигнальный пептид

<400> 18

```

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1           5           10           15

```

```

Gly Ser Thr Gly
           20

```

<210> 19

<211> 21

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> описание искусственной последовательности: синтетический олигопептид

<220>

<223> сигнальный пептид

<400> 19
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
20

<210> 20

<211> 49

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1
ttgtcccaca gatatccaga accctgaccc tgcogtgtac cagctgaga 49

<210> 21

<211> 530

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<220>

<223> повтор TRAC_T01-L

<400> 21
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
35 40 45

036200

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 65 70 75 80

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 210 215 220

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
 245 250 255

036200

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

036200

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu
 530

<210> 22

<211> 530

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<220>

<223> повтор TRAC_T01-R

<400> 22

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
 35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 65 70 75 80

036200

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
275 280 285

036200

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
 305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
 355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
 370 375 380

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
 420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
 465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495

036200

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu
 530

<210> 23

<211> 2814

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<220>

<223> TRAC_T01-R TALEN

<400> 23

```

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catac gatgt tccagattac 60
gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc aycagcaaca ggagaagatc 120
aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgcaq caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180
acacacgcgc acatcgttgc gttaaagcaa cacccggcag cgttagggac cgtcgtgtc 240
aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc 300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacgggtgc gggagagtgt 360
agaggccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420
gtgaccgagc tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgaacgggtgc cccgctcaac 480
ttgaccccc agcagggtgtt ggccatcgcc agcaatggcg gggcaagca ggcgctggag 540
acgggtccagc ggtggttgc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg 600
gtggccatcg ccagcaataa tggtggaag caggcgctgg agacgggtcca gcgctgttg 660
ccgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccccagcagg tgggtggccat cgcagcaat 720
ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgcgggtgct gtgccaggcc 780
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 840
ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccgggag 900
cagggtggtg ccacgcccag ccacgatggc ggcaagcagg cgtgagagac ggtccagcgg 960
ctgttgccgg tgtgtgcca ggcccacggc ttgacccggc agcagggtgt ggccatcgcc 1020
agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag acgggtccagc ggtgtgtgccc ggtgctgtgc 1080
caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag 1140
caggcgctgg agacgggtgca ggcgctgttg ccgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1200
ccggagcagg tgggtggccat cgcagccac gatggcgcca agcaggcgct ggagacggtc 1260
cagcggctgt tgcgggtgct gtgccaggcc cagcgttga ccccgagca ggtggtggcc 1320
atcgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg 1380
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccacgcccag caataatggt 1440
    
```

036200

ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca gggccacggc 1500
 ttgaccccgg agcagggtgtt ggccatcgcc agcaatattg ttggcaagca ggcgctggag 1560
 acggtgacagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcagggtg 1620
 gtggccatcg ccagcaatgg cgttgccaag caggcgctgg agacgggtcca gcggctgttg 1680
 ccgggtgctgt gccagcccca cggcttgacc ccggagcagg ttgtggccat cggcagcaat 1740
 attggtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccgggtgt gtgccaggcc 1800
 cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggttg caagcaggcg 1860
 ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccggag 1920
 cagggtggtg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg 1980
 ctgttgccgg tgctgtgcca gggccacggc ttgaccctc agcagggtgt ggccatcgcc 2040
 agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg ccacagttat tcgcccgat 2100
 ccggcggttg ccgcttgac caacgaccac ctgctgcct tgccctgcct cggcggcgct 2160
 cctgctgttg atcgagtga aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg 2220
 aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
 gagtacatcg agctgatcga gatcgcccgg aacagcacc ccagaccgat cctggagatg 2340
 aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacc gggcggctcc 2400
 aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctccccc tggactacgg cgtgatcgtg 2460
 gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gacaggccga cgaatgcag 2520
 aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca acccaacga gtggtggaag 2580
 gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttctg tjtccggcca ctcaaggggc 2640
 aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacea actgcaacgg cgcctgtctg 2700
 tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcaccct gaccctggag 2760
 gaggtgagga ggaagttaa caacggcgag atcaacttgc cggccgactg ataa 2814

<210> 24

<211> 2832

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 24

atgggcgcat ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgcccg tgccaagttc 60
 gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120
 cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cgttcgacag tggcgcagca ccacgaggca 180
 ctggctcggc acgggtttac acacgcgcac atcgttgctt taagccaaca cccggcagcg 240
 ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac 300
 gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc 360
 acggtgccgg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag 420
 attgcaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcaactg 480
 acgggtgccc cgtcaactt gaccccggag cagggtggtg ccatcgccag ccacgatggc 540
 ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca gggccacggc 600
 ttgaccccc agcagggtgtt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 660
 acggctcagc ggtggtgccc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcagggtg 720
 gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggctgttg 780
 ccgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg ttgtggccat cggcagcaat 840
 attggtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccgggtgt gtgccaggcc 900
 cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggttg caagcaggcg 960
 ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccggag 1020

```

caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcgg 1080
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcaccggc ttgaccccc agcaggtggt gcccatcgcc 1140
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggtgttgcc ggtgctgtgc 1200
cagggcccag cgttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tgggggcaag 1260
cagggcgtgg agacggtcca gcggtgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1320
ccccagcagg ttgtggccat cgcacgcaat aatggtggca agcaggcgcct ggagacggtc 1380
cagcggctgt tgcgggtgct gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtggcc 1440
atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tcacagcggct gttgccggtg 1500
ctgtgccagg cccacggcct gacccccggag caggtggtgg ccatcgccag caatattggt 1560
ggcaagcagg cgttgagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tctgtgcca ggcccacggc 1620
ttgacccccg agcaggtggt gcccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag 1680
acggtccagc ggtgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg 1740
gtggccatcg ccagcaatat tggtggaag cagggcctgg agcaggtgca ggcgctgttg 1800
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgttgccat cggcagccac 1860
gatggcggca agcaggcgcct ggagacggtc cagcggctgt tgcgggtgct gtgccaggcc 1920
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca a-aatggtgg caagcaggcg 1980
ctggagacgg tcacagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggcct gacccctcag 2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaagcagg cgttgagag cattgttgcc 2100
cagttatctc gccctgatcc ggcgttgccc gcgttgacca acgaccacct cgtcgccttg 2160
gcttcgctcg gcggcgctcc tgcgctggat gcagtgaaaa agggattggg ggatcctatc 2220
agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgacgaga tggcccggaa cagcaccag 2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacagggcg 2400
aagcacctgg gcggtccag gaagcccagc ggcgcatct acaccgtggg ccccccatc 2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gtacaacct gccatcggc 2520
cagggcagcg aatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
cccaacagat ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
tccggcact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcacctga cctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
gccgactgat aa 2832

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. CD19-специфичный химерный антигенный рецептор, содержащий внеклеточный лигандсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, в котором указанный внеклеточный домен содержит одноцепочечный FV-фрагмент, происходящий из моноклонального антитела 4G7, специфичного к CD19, при этом указанный одноцепочечный FV-фрагмент содержит переменный фрагмент иммуноглобулиновой тяжелой γ -1 цепи моноклонального антитела 4G7 к CD19 SEQ ID NO: 3 и переменный фрагмент иммуноглобулиновой легкой κ -цепи моноклонального антитела 4G7 к CD19 SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

2. CD19-специфичный химерный антигенный рецептор по п.1, в котором указанный одноцепочечный FV-фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8.

3. CD19-специфичный химерный антигенный рецептор по п.1 или 2, в котором указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3-зета.

4. CD19-специфичный химерный антигенный рецептор по одному из пп.1-3, в котором указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит домен 4-1BB.

5. CD19-специфичный химерный антигенный рецептор по одному из пп.1-4, содержащий трансмембранный и "стеблевой" домен α -цепи человеческого CD8.

6. CD19-специфичный химерный антигенный рецептор по одному из пп.1-5, содержащий аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, предпочтительно 80, 85, 90, 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14 или 15.

7. CD19-специфичный химерный антигенный рецептор по одному из пп.1-6, дополнительно содержащий другой внеклеточный лигандсвязывающий домен, не обладающий специфичностью в отношении CD19.

8. Полинуклеотид, кодирующий указанный химерный антигенный рецептор по одному из пп.1-7.

9. Полинуклеотид по п.8, содержащий нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, предпочтительно 80, 85, 90, 95% идентичностью последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 17.

10. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.8 или 9.

11. Иммунная клетка-хозяин, экспрессирующая на мембране клеточной поверхности CD19-специфичный химерный антигенный рецептор, который содержит по меньшей мере один внеклеточный лигандсвязывающий домен и по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный домен, где указанный внеклеточный домен содержит одноцепочечный FV-фрагмент, выведенный из моноклонального антитела 4G7, специфичного в отношении CD19, причем указанный одноцепочечный FV-фрагмент содержит переменные фрагменты иммуноглобулиновой тяжелой γ -1 цепи моноклонального антитела 4G7 к CD19

SEQ ID NO: 3 и переменные фрагменты иммуноглобулиновой легкой к-цепи моноклонального антитела 4G7 к CD19 SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

12. Иммунная клетка-хозяин по п.11, где указанный одноцепочечный FV-фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8.

13. Иммунная клетка-хозяин, экспрессирующая на мембране клеточной поверхности CD19-специфичный химерный антигенный рецептор по одному из пп.1-7.

14. Иммунная клетка-хозяин по любому из пп.11-13, дополнительно содержащая другой химерный антигенный рецептор, который не обладает специфичностью в отношении CD19.

15. Иммунная клетка-хозяин по одному из пп.11-14, выведенная из воспалительных Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов, регуляторных Т-лимфоцитов или хелперных Т-лимфоцитов.

16. Иммунная клетка-хозяин по любому из пп.11-15, где указанная клетка получена от здорового донора.

17. Иммунная клетка-хозяин по любому из пп.11-15, где указанная клетка получена от пациента, у которого диагностирован рак.

18. Применение клетки по любому из пп.11-17 для терапии.

19. Применение клетки по любому из пп.11-17 для лечения В-клеточной лимфомы или лейкоза.

20. Способ создания иммунной клетки, включающий:

(а) получение иммунной клетки,

(б) экспрессию на поверхности указанной клетки по меньшей мере одного CD19-специфичного химерного антигенного рецептора по одному из пп.1-7.

21. Способ создания иммунной клетки по п.20, включающий:

(а) получение иммунной клетки,

(б) трансфекцию или трансдукцию в указанную клетку по меньшей мере одного полинуклеотида, кодирующего указанный CD19-специфичный химерный антигенный рецептор,

(в) экспрессию указанного полинуклеотида в указанной клетке.

22. Способ создания иммунной клетки по п.20, включающий:

(а) получение иммунной клетки,

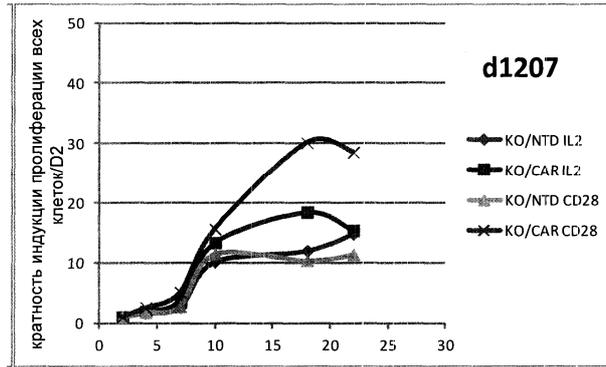
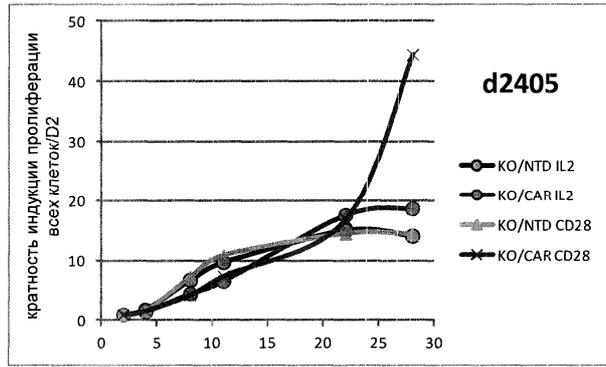
(б) трансфекцию или трансдукцию в указанную клетку по меньшей мере одного полинуклеотида, кодирующего указанный CD19-специфичный химерный антигенный рецептор,

(в) интродукцию по меньшей мере одного другого химерного антигенного рецептора, не обладающего специфичностью в отношении CD19.

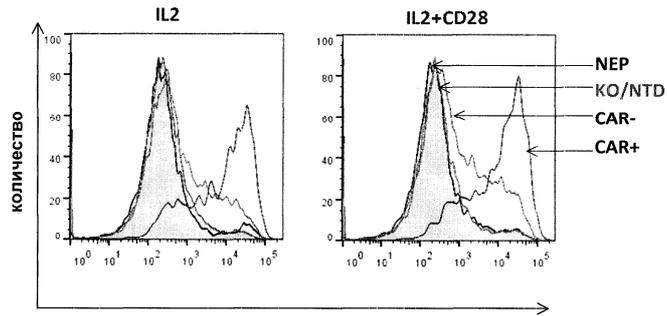
23. Способ лечения В-клеточной лимфомы или лейкоза у индивидуума, который нуждается в этом, включающий:

(а) получение иммунной клетки, экспрессирующей на поверхности CD19-специфичного химерного антигенного рецептора по одному из пп.1-7;

(б) введение указанной иммунной клетки указанному пациенту.

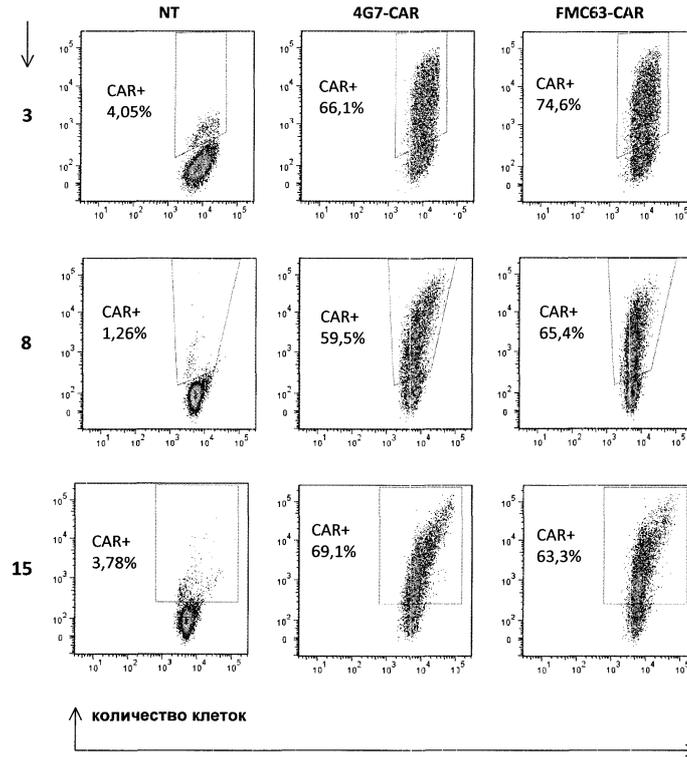


Фиг. 1

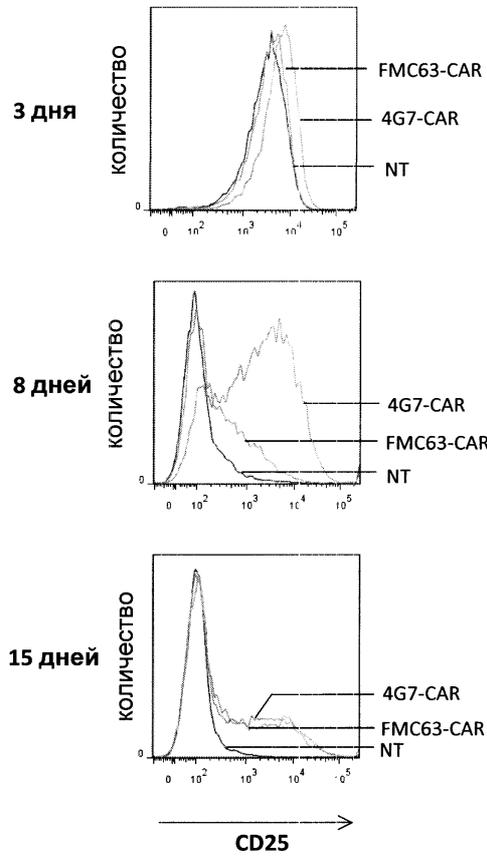


Фиг. 2

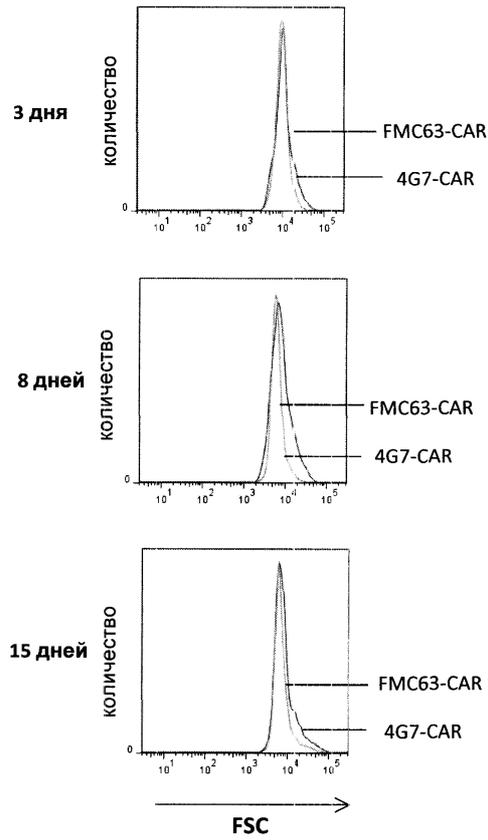
Дни после трансдукции



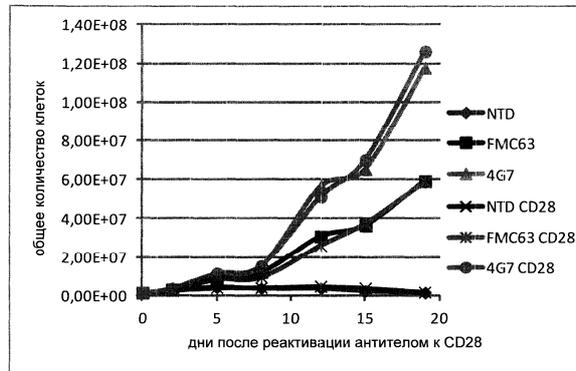
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

