

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091984** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.18

(51) Int. Cl. *C07K 14/54* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.03.12

**(54) НАПРАВЛЕННАЯ ДЗЕТАКИНАМИ Т-КЛЕТОЧНАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ,
НАЦЕЛЕННАЯ НА РЕЦЕПТОР IL-13 АЛЬФА 2**

(31) 62/643,139

(32) 2018.03.14

(33) US

(86) PCT/US2019/021833

(87) WO 2019/178085 2019.09.19

(71) Заявитель:

**СИЭТЛ ЧИЛДРЕН'С ХОСПИТАЛ
(ДБА СИЭТЛ ЧИЛДРЕН'С РЕСЁРЧ
ИНСТИТУТ) (US)**

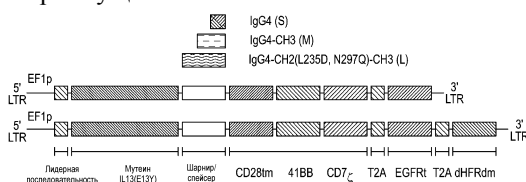
(72) Изобретатель:

**Тампелла Джакомо, Дженсен
Майкл К., Джонсон Адам (US)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, включают клетки, имеющие прикрепленные к мембране направленные мутеином IL-13 дзетакиновые рецепторы, такие как рецепторы, которые специфически связываются с рецептором IL-13 альфа 2 (IL13Ra2) с аффинностью, в 50 раз превышающей аффинность IL-13 дикого типа, и способы клеточной иммунотерапии, нацеленной на раковые клетки, такие как клетки солидных опухолей, с применением этих композиций. В некоторых вариантах осуществления рецепторы включают спейсерные области, такие как определенные спейсерные области, предназначенные для обеспечения определенных преимуществ.



A1

202091984

202091984

A1

НАПРАВЛЕННАЯ ДЗЕТАКИНАМИ Т-КЛЕТОЧНАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ, НАЦЕЛЕННАЯ НА РЕЦЕПТОР IL-13 АЛЬФА 2

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/643139, поданной 14 марта 2018 г. и озаглавленной «НАПРАВЛЕННАЯ ДЗЕТАКИНАМИ Т-КЛЕТОЧНАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ, НАЦЕЛЕННАЯ НА РЕЦЕПТОР IL-13 АЛЬФА 2», настоящим в явном виде включенной посредством ссылки во всей полноте.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка подается вместе с Перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей представлен в виде файла под названием SCRI179WOSEQLIST, созданного 12 марта 2019 г., размером примерно 35 КБ. Информация в электронном формате Перечня последовательностей настоящим в явном виде включена посредством ссылки во всей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, включают клетки, имеющие прикрепленные к мембране направленные мутеином IL-13 дзетакинов рецепторы, такие как рецепторы, которые специфически связываются с рецептором IL-13 альфа 2 (IL13Ra2) с аффинностью, в 50 раз превышающей аффинность IL-13 дикого типа, и способы клеточной иммунотерапии, нацеленной на раковые клетки, такие как клетки солидных опухолей, с применением этих композиций. В некоторых вариантах осуществления рецепторы включают спейсерные области, такие как специально выбранные спейсерные области определенной длины, которые предназначены для придания рецепторам определенных желаемых свойств.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Несмотря на значительные успехи в исследовании рака головного мозга, в течение последнего десятилетия уровень смертности оставался стабильным, и срочно требуются новые инновационные методы лечения. На сегодняшний день Т-клеточная иммунотерапия стала многообещающим видом противораковой терапии, подтвержденным выдающимися клиническими данными, демонстрирующими полную ремиссию у

пациентов с В-клеточными злокачественными новообразованиями после введения CAR Т-клеток, нацеленных на CD19. Однако остается потребность в дальнейших и улучшенных Т-клеточных иммунотерапиях.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, включают нуклеиновую кислоту, кодирующую прикрепленный к мембране направленный мутеином IL-13 дзетакиновый рецептор, содержащий внеклеточный домен, содержащий мутеин IL-13 и спейсер; трансмембранный домен; и внутриклеточную сигнальную область, где указанный спейсер расположен между указанным мутеином и указанным трансмембранным доменом.

[0006] В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-13 содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL-13 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0007] В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой пептидный спейсер.

[0008] В некоторых вариантах осуществления пептидный спейсер состоит из 110 аминокислот или менее, но не менее чем из 1 или 2 аминокислот, например, из 15 аминокислот или менее, но не менее чем из 1 или 2 аминокислот.

[0009] В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, состоит из или по существу состоит из спейсера из шарнира IgG4 (S), спейсера из шарнира IgG4-CH3 (M) или спейсера из шарнира IgG4-CH2-CH3 (L).

[0010] В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, состоит из или по существу состоит из спейсера из шарнира IgG4-CH3 (M).

[0011] В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, состоит из или по существу состоит из спейсера из шарнира IgG4-CH2-CH3 (L).

[0012] В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

[0013] В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей

мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11.

[0014] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит трансмембранный домен CD28 (CD28tm).

[0015] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит весь или часть домена CD3-дзета в комбинации с костимулирующим доменом, выбранным из группы, состоящей из CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C и B7-H3, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область содержит сигнальную функциональную часть домена CD3-дзета и костимулирующую функциональную часть домена 4-1BB.

[0016] Некоторые варианты осуществления также включают последовательность, кодирующую маркер. В некоторых вариантах осуществления маркер содержит усеченную форму рецептора клеточной поверхности, необязательно EGFRt.

[0017] Некоторые варианты осуществления также включают трансген дигидрофолатредуктазы, обеспечивающий возможность селекции метотрексатом. В некоторых вариантах осуществления трансген дигидрофолатредуктазы представляет собой двойной мутант дигидрофолатредуктазы (DHFRdm). В некоторых вариантах осуществления двойной мутант дигидрофолатредуктазы содержит аминокислотные мутации L22F и F31S.

[0018] Некоторые варианты осуществления также включают последовательность, кодирующую последовательность рибосомного проскока.

[0019] В некоторых вариантах осуществления последовательность рибосомного проскока содержит P2A или T2A.

[0020] Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, включают вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту согласно любому из вариантов осуществления, предложенных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой лентивирусный или аденовирусный вектор.

[0021] Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, включают полипептид химерного рецептора, кодируемый нуклеиновой кислотой согласно любому из вариантов осуществления, предложенных в настоящем документе.

[0022] Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, включают клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту согласно любому из вариантов осуществления, предложенных в настоящем документе.

[0023] В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой Т-клетку или предшественника Т-клетки.

[0024] В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой цитотоксический CD8⁺ Т-лимфоцит, выбранный из группы, состоящей из наивных CD8⁺ Т-клеток, CD8⁺ центральных Т-клеток памяти, CD8⁺ эффекторных Т-клеток памяти и общей популяции CD8⁺ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления цитотоксический CD8⁺ Т-лимфоцит представляет собой центральную Т-клетку памяти, и при этом указанная центральная Т-клетка памяти является положительной в отношении CD45RO⁺, CD62L⁺ и CD8⁺.

[0025] В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой CD4⁺ Т-хелперный лимфоцит, выбранный из группы, состоящей из наивных CD4⁺ Т-клеток, CD4⁺ центральных Т-клеток памяти, CD4⁺ эффекторных Т-клеток памяти и общей популяции CD4⁺ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления CD4⁺ хелперный лимфоцит представляет собой наивную CD4⁺ Т-клетку, и при этом указанная наивная CD4⁺ Т-клетка является положительной в отношении CD45RA⁺, CD62L⁺ и CD4⁺, и отрицательной в отношении CD45RO.

[0026] В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой Т-клетку-предшественника.

[0027] В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку.

[0028] Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, включают композицию, содержащую клетку-хозяина согласно любому из вариантов осуществления, предложенных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[0029] Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, включают способ получения клетки-хозяина, такой как клетка-хозяин согласно любому из вариантов осуществления, предложенных в настоящем документе, включающий: введение нуклеиновой кислоты согласно любому из вариантов осуществления, предложенных в настоящем документе, в лимфоцит; культивирование указанного лимфоцита в присутствии антител к CD3 и/или к CD28 и по меньшей мере одного гомеостатического цитокина; и отбор лимфоцита с помощью

реагента для селекции, где указанный реагент для селекции обеспечивает возможность селективного обогащения клетками, трансдуцированными указанной нуклеиновой кислотой или вектором.

[0030] В некоторых вариантах осуществления реагент для селекции содержит метотрексат.

[0031] В некоторых вариантах осуществления лимфоциты имеют фенотип CD45RA-, CD45RO+ и CD62L+. В некоторых вариантах осуществления лимфоциты являются CD8+ или CD4+.

[0032] В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-15, IL-7 и/или IL-21.

[0033] Некоторые варианты осуществления также включают введение второго полинуклеотида в указанную клетку-хозяина, где указанный второй полинуклеотид кодирует маркерный белок. В некоторых вариантах осуществления маркерный белок представляет собой EGFRt.

[0034] Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, включают клетку-хозяина согласно любому из вариантов осуществления, предложенных в настоящем документе, для применения в лекарственном средстве или для применения для лечения или ингибирования рака или солидной опухоли, экспрессирующих рецептор IL-13 α 2 (IL-13Ra2). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак головного мозга. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой IL13Ra-положительное злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой глиобластому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой мультиформную глиобластому (GBM).

[0035] Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, включают способ лечения, ингибирования или ослабления рака у субъекта, включающий введение клетки-хозяина согласно любому из вариантов осуществления, предложенных в настоящем документе, указанному нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой IL13Ra-положительное злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак головного мозга. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой глиому или глиобластому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой глиому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой мультиформную глиобластому (GBM). В некоторых вариантах

осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

[0036] Некоторые варианты осуществления также включают введение дополнительной терапии, выбранной из химиотерапии и лучевой терапии. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтический препарат включает электрохимиотерапию, алкилирующий агент, антиметаболит (например, 5-фторурацил (5-FU), 6-меркаптопурин (6-MP), капецитабин (Xeloda®), кладрибин, клофарабин, цитарабин (Ara-C®), флоксуридин, флударабин, гемцитабин (Gemzar®), гидроксимочевину, метотрексат, пеметрексед (Alimta®), пентостатин и тиогуанин), противоопухолевый антибиотик, ингибитор топоизомеразы, ингибитор митоза, кортикостероид, интеркалирующий ДНК агент или ингибитор контрольной точки (киназа контрольной точки CHK1, CHK2).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0037] На ФИГ. 1 представлена схема нуклеиновых кислот, кодирующих определенные IL-13(E13Y)-дзетакиновые CAR с различными спейсерными областями. Нуклеиновые кислоты, кодирующие дзетакиновые CAR, включали: лидерную последовательность (EF1p); полинуклеотид, кодирующий мутеин IL-13(E13Y); полинуклеотид, кодирующий один из трех разных спейсеров; полинуклеотид, кодирующий трансмембранную последовательность CD28tm; полинуклеотид, кодирующий сигнальный домен, включающий первичный и костимулирующий домен, которые представляли собой домен 4-1BB, домен CD3-дзета, соответственно. Спейсеры включали: короткий спейсер «S», который включал модифицированный шарнир IgG4; спейсер средней длины «M», который включал модифицированный шарнир IgG4 и область CH3 иммуноглобулина (шарнир IgG4-CH3); и длинный спейсер «L», который включал модифицированный шарнир IgG4, домен CH2 иммуноглобулина и домен CH3 иммуноглобулина (шарнир IgG4-CH2-CH3). Спейсер L содержал две мутации в домене CH2 (L235D, N297Q). Также были включены последовательности саморасщепляющегося пептида 2A (T2A) в качестве последовательности рибосомного пропуска. В некоторых конструкциях лентивектор также включал трансген двойного мутанта дигидрофолатредуктазы, обеспечивающий возможность селекции метотрексатом (DHFRdm).

[0038] На ФИГ. 2A представлены стадии способа создания Т-клеток, экспрессирующих химерные рецепторы, включая стадии селекции CD8⁺ и условия культивирования. Селекция CD8 и условия культивирования. CD8 Т-клетки отбирали из МНПК с использованием микрогранул к CD8. Отобранные клетки стимулировали

микрогранулами к CD3/CD28, а затем передавали трансдуцировали лентивирусами с конструкциями, показанными на фиг. 1. В некоторых циклах (*) CD8 Т-клетки трансдуцировали конструкцией, которая также содержала T2A-DHFRdm, который находился в пределах рамки считывания по ходу транскрипции от EGFRt, чтобы обеспечить совместную экспрессию, что позволило отобрать MTX-устойчивые Т-клетки, совместно экспрессирующие функционально релевантные уровни IL13-дзетакинового CAR.

[0039] На ФИГ. 2В представлены данные анализа методом проточной цитометрии для CD8⁺ Т-клеток, содержащих CAR, которые включали спейсер S, M или L, и окрашенных на экспрессию суррогатного маркера (EGFRt).

[0040] На ФИГ. 3А представлен анализ экспрессии IL13Ra2 для линий опухолевых клеток-мишеней U87, U251T и DAOY.

[0041] На ФИГ. 3В представлены графики специфического лизиса клеток-мишеней (верхняя панель: U87; средняя панель: U251T; и нижняя панель: DAOY) в присутствии эффекторных CD8⁺ Т-клеток, содержащих CAR со спейсером S, M или L, в указанных соотношениях. Данные представляют собой среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (SD) для 3 разных доноров.

[0042] На ФИГ. 3С представлены графики продукции цитокинов CD8⁺ Т-клетками, содержащими CAR со спейсером S, M или L, в присутствии клеток-мишеней (верхний ряд: U87; средний ряд: U251T; и нижний ряд: DAOY). Планки представляют собой среднее значение $\pm$ SD.

[0043] На ФИГ. 4А представлены графики потока, демонстрирующие зависимость опухолевой нагрузки от времени для мышей, которым вводили различные дозы Т-клеток, содержащих IL13-дзетакиновые CAR со спейсером M или L.

[0044] На ФИГ. 4В представлена кривая выживаемости Каплана-Мейера для мышей, которым вводили различные дозы Т-клеток, содержащих IL-13-дзетакиновые CAR со спейсером M или L.

[0045] На ФИГ. 5А представлены стадии способа получения и анализа клеток, содержащих IL-13-дзетакиновые CAR.

[0046] На ФИГ. 5В представлены данные проточной цитометрии для клеток, содержащих IL13-дзетакиновые CAR со спейсером M или мутантным спейсером L в отношении экспрессии CD4, CD8, EGFRt и экспрессии дзетакина (с окрашиванием антителом к IL13).

[0047] На ФИГ. 6 представлен анализ специфического лизиса клеток-мишеней в присутствии эффекторных CD4+/CD8+ Т-клеток, содержащих CAR со спейсером М или L в указанных соотношениях.

[0048] На ФИГ. 7 представлен анализ прогрессирования опухоли у мышей, измеренный по потоку, для мышей, получивших клетки, содержащие IL13-дзетакиновый CAR со спейсером М или спейсером L.

[0049] На ФИГ. 8 представлен анализ специфического лизиса клеток-мишеней в присутствии эффекторных CD4+/CD8+ Т-клеток, содержащих CAR со спейсером М или L в указанных соотношениях.

[0050] На ФИГ. 9 представлен анализ высвобождения цитокинов для CD4+/CD8+ Т-клеток, содержащих IL13-дзетакиновый CAR со спейсером М или L.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0051] Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, относятся к IL-13-дзетакиновым химерным антигенным рецепторам (CAR), способным к специфическому связыванию с альфа-2-субъединицей рецептора интерлейкина-13 (IL-13R α 2) или обеспечивающим такую возможность. Некоторые варианты осуществления включают нуклеиновые кислоты, кодирующие такие CAR, клетки-хозяева, содержащие такие CAR, и методы терапии, в которых используются клетки-хозяева, содержащие эти CAR, например, путем предоставления этих клеток нуждающимся субъектам в качестве лекарственного средства, например, для лечения или ингибирования заболевания или состояний, опосредованных альфа-2-субъединицей рецептора интерлейкина-13 (IL-13R α 2), таких как рак, например, IL-13R α 2-положительные злокачественные новообразования, включая глиомы и глиобластомы.

[0052] Ранее было обнаружено, что IL-13R α 2 в большом количестве присутствует в метастатическом или находящимся на поздних стадиях BLBC (базальноподобном варианте рака молочной железы) (Papageorgis *et al.* Breast Cancer Research, 2015; 17 (1); настоящим в явном виде включенный посредством ссылки во всей полноте). На основе общедоступных данных была проведена корреляция между вероятностью выживаемости без прогрессирования и высокими уровнями IL-13R α 2. Подтип BLBC, который имел тенденцию быстро распространяться в легкие, имел высокие уровни IL-13R α 2. Было также обнаружено, что IL-13R α 2 стимулирует рост и метастазирование клеток глиомы человека через сигнальный путь Src/PI3K/Akt/mTOR. (Tu *et al.* Tumour Biol. 2016 Nov; 37(11):14701-14709; настоящим в явном виде включенный

посредством ссылки во всей полноте). Были описаны виды терапии, нацеленные на IL13Ra2, такие как виды терапии на основе химерных рецепторов (см., например, Brown et al Clin Cancer Res 2015; Brown et al N Engl J Med 2016; Brown et al Mol Ther 2017; WO 2014072888-A1, описывающие антитела к рецептору IL-13 альфа 2 (IL-13-Ra2) и конъюгаты антитело-лекарственное средство для лечения рака, каждый из которых в явном виде включен в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте). Среди таких видов терапии есть виды, основанные на связывающих или антигенраспознающих доменах на основе мутантного IL-13 (например, E13Y) или включающие их, такие как дзетакины (zetakines). Желательной мишенью для адаптивной Т-клеточной терапии является вариант 2 альфа-цепи рецептора интерлейкина-13 (IL-13R α 2). В частности, при мультиформной глиобластоме (GBM) экспрессия IL-13R α 2 является прогностическим маркером выживаемости пациентов и связана со стимуляцией прогрессирования опухоли.

[0053] Хотя IL-13Ra2 экспрессируется на более чем 80% глиом высокой степени злокачественности, включая мультиформную глиобластому, было показано, что опухоли ускользают от направленной терапии из-за утраты эпитопа-мишени или экспрессии мишени в целом. Соответственно, в некоторых альтернативных вариантах для преодоления этого недостатка используются многонаправленные терапевтические средства для лечения или ингибирования глиомы. Совместное применение IL-13-дзетакина с другими направленными видами лечения, такими как химерные антигенные рецепторы, как полагают, позволяет преодолеть ускользание опухоли, вызванное утратой эпитопа-мишени. Предложенные в настоящем документе альтернативные варианты были протестированы *in vitro* и на ксенотрансплантатной ортотопической модели опухоли. В некоторых вариантах осуществления такие виды лечения, как иммунотерапия, направленная IL-13-дзетакином, будут эффективны как таковые или как часть тактики лечения глиобластомы и других IL-13Ra2-положительных злокачественных новообразований, или для некоторых страдающих ими субъектов.

[0054] Некоторые варианты осуществления, предложенные в настоящем документе, включают химерные рецепторы, такие как дзетакины. В некоторых вариантах осуществления дзетакин включает лиганд-связывающий домен, спейсерную область, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область, обычно включающую первичный и костимулирующий сигнальные домены. Некоторые варианты осуществления, предложенные в настоящем документе, включают дзетакины IL-13 второго поколения, такие включающие определенные выбранные или созданные спейсерные области. В некоторых аспектах предложенные в настоящем документе дзетакины включают дзетакины, способные проявлять или обладающие возможностью проявления улучшенной

терапевтической эффективности или противоопухолевых действий или ответов *in vivo*. Некоторые варианты осуществления, предложенные в настоящем документе, в некоторых отношениях основаны на наблюдениях, описанных в настоящем документе, демонстрирующих, что некоторые дзетакины были способны вызывать более высокие уровни продукции цитокинов в ответ на антиген-мишень по сравнению с референсными химерными рецепторами, которые в остальном были схожими или идентичными, но отличались выбранными спейсерными областями. Некоторые варианты осуществления, предложенные в настоящем документе, в некоторых отношениях основаны на наблюдениях, описанных в настоящем документе, демонстрирующих способность некоторых дзетакинов контролировать рост опухоли в течение длительного периода и значительно увеличивать медианную выживаемость, например, в ортотопической ксенотрансплантатной модели опухоли.

Определения

[0055] В настоящем документе термины «нуклеиновая кислота» или «молекула нуклеиновой кислоты» имеют свое простое и обычно используемое значение в контексте описания и могут включать, не ограничиваясь перечисленным, например, полинуклеотиды, такие как дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) или рибонуклеиновая кислота (РНК), олигонуклеотиды, фрагменты, генерируемые полимеразной цепной реакцией (ПЦР), и фрагменты, генерируемые любым из лигирования, расщепления, действия эндонуклеазы или действия экзонуклеазы. Молекулы нуклеиновых кислот могут состоять из мономеров, которые представляют собой встречающиеся в природе нуклеотиды (такие как ДНК и РНК) или аналоги встречающихся в природе нуклеотидов (например, энантиомерные формы встречающихся в природе нуклеотидов), или их комбинации. Модифицированные нуклеотиды могут иметь изменения в сахарных фрагментах или фрагментах пиримидиновых или пуриновых оснований. Модификации сахаров включают, например, замену одной или нескольких гидроксильных групп галогенами, алкильными группами, аминами или азидогруппами, или сахара могут быть функционализированы с образованием простых или сложных эфиров. Более того, весь сахарный фрагмент может быть заменен стерически и электронно схожими структурами, такими как азасахара или карбоциклические аналоги сахаров. Примеры модификаций основного фрагмента включают алкилированные пурины или пиримидины, ацилированные пурины или пиримидины или другие хорошо известные гетероциклические заместители. Момеры нуклеиновых кислот могут быть связаны фосфодиэфирными связями или аналогами таких связей. Аналоги фосфодиэфирных связей включают тиофосфат, дитиофосфат,

фосфоселеноат, фосфодиселеноат, фосфоанилотриат, фосфоанилидат или фосфоамидат, и тому подобное. Термин «молекула нуклеиновой кислоты» также включает так называемые «пептидные нуклеиновые кислоты», которые включают встречающиеся в природе или модифицированные основания нуклеиновых кислот, присоединенные к полиамидной основной цепи. Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. В некоторых альтернативных вариантах предложена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок. В некоторых альтернативных вариантах нуклеиновая кислота представляет собой РНК или ДНК.

[0056] В настоящем документе термины «вектор», «вектор экспрессии» или «конструкция» имеют свое простое и обычно используемое значение в контексте описания и могут включать, не ограничиваясь перечисленным, например, нуклеиновую кислоту, используемую для введения гетерологичных нуклеиновых кислот в клетку, имеющую регуляторные элементы для обеспечения экспрессии указанных гетерологичных нуклеиновых кислот в указанной клетке. Векторы включают, не ограничиваясь перечисленным, плазмиды, миникольца, дрожжи или вирусные геномы. В некоторых альтернативных вариантах векторы представляют собой плазмиды, миникольца или вирусные геномы. В некоторых альтернативных вариантах вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых альтернативных вариантах вирусный вектор представляет собой лентивирус. В некоторых альтернативных вариантах вектор представляет собой лентивирусный вектор. В некоторых вариантах вектор представляет собой пенистый вирусный вектор, аденовирусные векторы, ретровирусные векторы или лентивирусные векторы.

[0057] В некоторых вариантах осуществления предложенные векторы и последовательности модифицированы или оптимизированы, например, путем оптимизации кодонов, которая может включать процесс разработки замены кодонов на кодоны, которые, как известно, повышают максимальную эффективность экспрессии белка в желаемой клетке, предпочтительно в человеческой клетке. В некоторых альтернативных вариантах описана оптимизация кодонов, которая может быть проведена с использованием алгоритмов, известных специалистам в данной области техники, для создания синтетических генетических транскриптов, оптимизированных для высокого выхода белка. Программы, содержащие алгоритмы для оптимизации кодонов, известны специалистам в данной области техники. Программы могут включать, например, алгоритмы OptimumGene™ или GeneGPS®, и т. д. Кроме того, синтетические последовательности, оптимизированные по кодонам, могут быть приобретены, например, у Integrated DNA Technologies и других компаний, предоставляющих коммерческие услуги по

секвенированию ДНК. В некоторых альтернативных вариантах описаны нуклеиновые кислоты, где гены нуклеиновой кислоты для полного транскрипта гена оптимизированы по кодонам для экспрессии в организме человека. В некоторых альтернативных вариантах гены оптимизированы так, чтобы они имели специально выбранные кодоны для максимальной экспрессии белка в человеческих клетках, что может повысить концентрацию белков или CAR в Т-клетке.

[0058] Оптимизация кодонов также может быть проведена для снижения вероятности наличия вторичной структуры в полинуклеотиде. В некоторых альтернативных вариантах оптимизация кодонов также может быть проведена для уменьшения общего соотношения GC/AT. Строгая оптимизация кодонов также может привести к нежелательной вторичной структуре или нежелательному содержанию GC, которое приводит ко вторичной структуре. Как таковые, вторичные структуры влияют на эффективность транскрипции. Такие программы, как GeneOptimizer, можно использовать после оптимизации использования кодонов для предотвращения вторичных структур и оптимизации содержания GC. Эти дополнительные программы могут быть использованы для дальнейшей оптимизации и устранения дефектов после первоначальной оптимизации кодонов, чтобы ограничить вторичные структуры, которые могут возникнуть после первого этапа оптимизации. Альтернативные программы для оптимизации известны специалистам в данной области техники. В некоторых альтернативных вариантах нуклеиновая кислота содержит последовательности, оптимизированные по кодонам для экспрессии у человека, и/или для удаления вторичной структуры, и/или для уменьшения общего соотношения GC/AT. В некоторых альтернативных вариантах последовательности оптимизированы для предотвращения вторичной структуры. В некоторых альтернативных вариантах последовательности оптимизированы для уменьшения общего соотношения GC/AT.

[0059] Некоторые варианты осуществления включают полипептидные последовательности или их консервативные вариации, такие как консервативные замены в полипептидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления «консервативная аминокислотная замена» относится к аминокислотным заменам, которые заменяют функционально эквивалентные аминокислоты. Консервативные изменения аминокислот приводят к молчащим изменениям аминокислотной последовательности получаемого пептида. Например, одна или более аминокислот схожей полярности действуют как функциональные эквиваленты и приводят к молчащему изменению в аминокислотной последовательности пептида. Замены с нейтральным зарядом, которые заменяют остаток меньшим остатком, также могут считаться «консервативными заменами», даже если остатки относятся к разным группам (например, замена

фенилаланина более мелким изолейцином). Семейства аминокислотных остатков, имеющих схожие боковые цепи, были определены в уровне техники. Несколько семейств консервативных аминокислотных замен приведены в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1

Семейство	Аминокислоты
неполярные	Trp, Phe, Met, Leu, Ile, Val, Ala, Pro
незаряженные полярные	Gly, Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr, Cys
кислые/отрицательно заряженные	Asp, Glu
основные/положительно заряженные	Arg, Lys, His
Бета-разветвленные	Thr, Val, Ile
остатки, влияющие на ориентацию цепи	Gly, Pro
ароматические	Trp, Tyr, Phe, His

[0060] В настоящем документе термин «химерный антигенный рецептор» имеет свое простое и обычно используемое значение в контексте описания и может включать, не ограничиваясь перечисленным, например, синтетически сконструированный рецептор, содержащий лиганд-связывающий домен антитела или другую белковую последовательность, которая связывается с молекулой, связанной с заболеванием или нарушением, и связана через спейсерный домен с одним или более внутриклеточными сигнальными Т-клетки или другими рецепторами, такими как костимулирующий домен. Химерные рецепторы также могут называться искусственными Т-клеточными рецепторами, химерными Т-клеточными рецепторами, химерными иммунорецепторами и химерными антигенными рецепторами (CAR). Эти рецепторы могут быть использованы для прививки специфичности моноклонального антитела или его связывающего фрагмента к Т-клетке, с переносом их кодирующей последовательности с помощью вирусных векторов, таких как ретровирусный вектор или лентивирусный вектор. CAR представляют собой генетически сконструированные Т-клеточные рецепторы, предназначенные для перенаправления Т-клеток на клетки-мишени, экспрессирующие определенные антигены клеточной поверхности. Т-клетки могут быть взяты у субъекта и модифицированы так, чтобы они могли экспрессировать рецепторы, которые могут быть специфичными к антигену, с помощью процесса, называемого адоптивным переносом клеток. Т-клетки повторно вводят пациенту, где они затем могут распознавать антиген и нацеливаться на него. Эти CAR представляют собой сконструированные рецепторы, которые могут прививать произвольную специфичность иммунной рецепторной клетке. Некоторые исследователи считают, что термин «химерные антигенные рецепторы» или «CAR» также включает антитело или фрагмент антитела, спейсер, сигнальный домен и трансмембранную

область. Из-за неожиданных эффектов модификации различных компонентов или доменов CAR, описанных в настоящем документе, таких как эпитоп-связывающая область (например, фрагмент антитела, scFv или его часть), спейсер, трансмембранный домен или сигнальный домен), компоненты CAR часто дифференцируют в данном описании как независимые элементы. Вариация различных элементов CAR может, например, привести к более сильной аффинности связывания с определенным эпитопом или антигеном.

[0061] CAR прививают специфичность моноклонального антитела или его связывающего фрагмента или scFv Т-клетке, с переносом их кодирующей последовательности с помощью векторов. Чтобы использовать CAR в качестве терапии для нуждающегося субъекта используют метод, называемый адоптивным переносом клеток, при котором Т-клетки получают у субъекта и модифицируют таким образом, чтобы они могли экспрессировать CAR, специфичные к антигену. Т-клетки, которые затем могут распознавать антиген и нацеливаться на него, повторно вводят пациенту.

[0062] В настоящем документе термин «лиганд» имеет свое простое и обычно используемое значение в контексте описания и может включать, не ограничиваясь перечисленным, например, вещество, которое может образовывать комплекс с биомолекулой. В качестве неограничивающего примера, лиганды могут включать субстраты, белки, малые молекулы, ингибиторы, активаторы, нуклеиновые кислоты или нейротрансмиттеры. Связывание может происходить посредством межмолекулярных сил, например, ионных связей, водородных связей или ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Связывание лиганда с рецепторным белком может изменять трехмерную структуру и определять его функциональное состояние. Сила связывания лиганда называется аффинностью связывания и может определяться непосредственными взаимодействиями и эффектами растворителя. Лиганд может быть связан с «лиганд-связывающим доменом». Например, лиганд-связывающий домен может относиться к консервативной последовательности в структуре, которая может связывать определенный лиганд или определенный эпитоп на белке. Лиганд-связывающий домен или лиганд-связывающая часть может содержать антитело или его связывающий фрагмент или scFv, лиганд рецептора или его мутанты, пептид и/или молекулу с аффинностью к полипептиду или партнер по связыванию. В качестве неограничивающего примера, лиганд-связывающий домен может представлять собой специфичный белковый домен или эпитоп на белке, специфичном к лиганду или лигандам.

[0063] В настоящем документе термин «одноцепочечный переменный фрагмент» или scFv имеет свое простое и обычно используемое значение в контексте описания и может включать, не ограничиваясь перечисленным, например, слитый белок,

содержащий переменные области тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей иммуноглобулина, связанные друг с другом коротким линкерным пептидом. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, линкер может содержать глицин для гибкости и гидрофильные аминокислоты, например, серин или треонин, для растворимости. Линкер может соединять N-конец VH с C-концом VL, или может соединять C-конец VH с N-концом VL. В некоторых альтернативных вариантах лиганд-связывающий домен, присутствующий на CAR, представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). В некоторых альтернативных вариантах домен scFv, присутствующий на CAR, является специфичным к рецептору IL-13 альфа 2 (IL13R α 2), присутствующему на опухолевой клетке.

[0064] В некоторых альтернативных вариантах внеклеточный домен содержит по меньшей мере один пептидный спейсер. В некоторых альтернативных вариантах пептидный спейсер состоит из 15 аминокислот или менее, но не менее чем из 1 или 2 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой полипептидную цепь. В некоторых аспектах длина полипептидной цепи может варьировать, например, от 3, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 или 240 аминокислот, или длины в диапазоне, определенном любыми двумя из вышеуказанных длин. Спейсер может содержать любые 20 аминокислот, например, в любом порядке, для создания желаемой длины полипептидной цепи в химерном рецепторе, которые включают аминокислоты аргинин, гистидин, лизин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, серин, треонин, аспарагин, глутамин, цистеин, глицин, пролин, аланин, валин, изолейцин, метионин, фенилаланин, тирозин или триптофан. В некоторых альтернативных вариантах спейсер находится между scFv или лиганд-связывающим доменом и трансмембранной областью химерного рецептора. Спейсер также может быть разработан, выбран, создан или оптимизирован для достижения желаемой длины, чтобы улучшить связывание домена scFv или лиганд-связывающего

домена с клеткой-мишенью, что может повысить цитотоксическую эффективность. В некоторых альтернативных вариантах линкер или спейсер между доменом scFv или лиганд-связывающим доменом и трансмембранным доменом может иметь длину от 25 до 55 аминокислот (например, по меньшей мере равную 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 или 55 аминокислот, или длину в диапазоне, определенном любыми двумя из вышеуказанных длин). Примеры спейсеров включают только шарнир IgG4, шарнир IgG4, связанный с доменами CH2 и CH3, или шарнир IgG4, связанный с доменом CH3. Примеры спейсеров включают описанные в Hudecek et al. *Clin. Cancer Res.*, 19:3153 (2013), публикации международной патентной заявки № WO2014031687, патенте США №8,822,647 или опубликованной заявке № US2014/0271635, настоящим в явном виде включенных посредством ссылки во всей полноте.

[0065] В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен CAR, такой как первичный сигнальный домен или костимулирующий домен, включает внутриклеточный или цитоплазматический домен белка или рецепторного белка, который взаимодействует с компонентами внутри клеток и способен ретранслировать или участвовать в ретрансляции сигнала. Такие взаимодействия в некоторых аспектах могут происходить посредством внутриклеточного домена, связывающегося посредством специфических взаимодействий белок-белок или белок-лиганд с эффекторной молекулой или эффекторным белком, которые, в свою очередь, могут посылать сигнал по сигнальной цепи к месту назначения. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен включает костимулирующий домен. В некоторых аспектах костимулирующий домен включает сигнальный фрагмент, который дает Т-клеткам сигнал, который в дополнение к первичному сигналу, обеспечиваемому, например, дзета-цепью CD3 комплекса TCR/CD3, усиливает ответ, такой как Т-клеточный эффекторный ответ, такой как, например, иммунный ответ, активация, пролиферация, дифференцировка, секреция цитокинов, цитолитическая активность, активность перфорина и/или гранзима и т. п. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен и/или костимулирующий домен могут включать весь или часть, не ограничиваясь перечисленным, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, ICOS, антигена-1, связанного с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C или B7-H3, или лиганд, специфически связывающийся с CD83.

[0066] В некоторых вариантах осуществления композиции, клетки и векторы включают маркерные последовательности или кодирующие их нуклеиновые кислоты, которые могут включать, например, белок, который служит меткой для клетки. В некоторых альтернативных вариантах клеток, описанных в настоящем документе, клетки

совместно экспрессируют маркерный белок для определенного экспрессируемого химерного белка. В некоторых альтернативных вариантах клеток, предложенных в настоящем документе, химерный рецептор экспрессируется совместно с определенным маркерным белком. В некоторых альтернативных вариантах клеток, предложенных в настоящем документе, указанные клетки содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный рецептор. Маркеры могут включать селективируемую маркерную последовательность, такую как ген, введенный в вектор или клетку, придающий признак для искусственного отбора. Селективируемая маркерная последовательность или маркерная последовательность может представлять собой подходящий для скрининга маркер, чтобы обеспечить исследователю возможность различать желаемые и нежелательные клетки или осуществлять обогащение клетками определенного типа. В некоторых альтернативных вариантах предложен вектор, кодирующий химерный рецептор, содержащий маркерную последовательность, где указанная маркерная последовательность кодирует селективируемый маркер на клеточной поверхности. В альтернативных вариантах, описанных в настоящем документе, предложенные CAR могут содержать маркерную последовательность, которая может быть отобрана в экспериментах, таких как проточная цитометрия. В некоторых альтернативных вариантах маркер представляет собой белок Her2tG или EGFRt.

[0067] В настоящем документе термин «метотрексат» (MTX) имеет свое простое и обычно используемое значение в контексте описания и может включать, не ограничиваясь перечисленным, например, антиметаболит и антифолатное лекарственное средство. Он действует путем ингибирования метаболизма фолиевой кислоты. В некоторых альтернативных вариантах предложен способ создания сконструированных мультиплексированных Т-клеток для адоптивной Т-клеточной иммунотерапии. В самом широком смысле указанный способ может включать предоставление полинуклеотида для доставки гена согласно любому из альтернативных вариантов, описанных в настоящем документе, селекцию клеток, содержащих полинуклеотид для доставки гена, где селекция включает добавление реагента для селекции. В некоторых альтернативных вариантах, описанных в настоящем документе, реагент для селекции содержит агент для селекции. В некоторых альтернативных вариантах реагент для селекции представляет собой MTX.

[0068] В настоящем документе термин «дигидрофолатредуктаза» или DHFR, как описано в настоящем документе, имеет свое простое и обычно используемое значение в контексте описания и может включать, не ограничиваясь перечисленным, например, фермент, восстанавливающий дигидрофолиевую кислоту до тетрагидрофолиевой кислоты с использованием НАДФН в качестве донора электронов, которая может быть превращена

в разновидности тетрагидрофолатных кофакторов, используемых в химии переноса одноуглеродных фрагментов. В некоторых альтернативных вариантах, описанных в настоящем документе, предложен полинуклеотид для доставки гена. В некоторых альтернативных вариантах полинуклеотид для доставки гена содержит по меньшей мере одну кассету селектируемого маркера, кодирующую двойной мутант дигидрофолатредуктазы (DHFRdm).

[0069] В настоящем документе «последовательность рибосомного проскока», как описано в настоящем документе, относится к последовательности, которая во время трансляции заставляет рибосому «проскакивать» последовательность рибосомного проскока и транслировать область после последовательности рибосомного проскока без образования пептидной связи. Некоторые вирусы, например, имеют последовательности рибосомного пропуска, которые обеспечивают последовательную трансляцию нескольких белков на одной нуклеиновой кислоте без связывания белков пептидной связью. В контексте настоящего документа она представляет собой «линкерную» последовательность. В некоторых альтернативных вариантах нуклеиновых кислот, предложенных в настоящем документе, нуклеиновые кислоты содержат последовательность рибосомного пропуска между последовательностью химерного рецептора и последовательностью маркерного белка, так что белки совместно экспрессируются и не связаны пептидной связью. В некоторых альтернативных вариантах последовательность рибосомного пропуска представляет собой последовательность P2A, T2A, E2A или F2A. В некоторых альтернативных вариантах последовательность рибосомного пропуска представляет собой последовательность T2A.

[0070] В настоящем документе термин «дзетакин» может относиться к определенному типу CAR, в котором лиганд-связывающий домен включает цитокин, который может специфически связываться с рецептором цитокина. В некоторых вариантах осуществления цитокин может включать человеческий цитокин, такой как IL-13. В некоторых вариантах осуществления IL-13 включает мутацию в последовательности и имеет высокую аффинность к рецептору IL-13 $\alpha 2$.

[0071] В настоящем документе термин «мутеин» имеет свое простое и обычно используемое значение в контексте описания и может включать, не ограничиваясь перечисленным, например, белок, возникающий в результате мутации. «Мутеин IL-13» может представлять собой мутанта IL-13, который может иметь по меньшей мере одну или по меньшей мере две аминокислотные замены.

[0072] В настоящем документе термин «альфа-2-субъединица рецептора интерлейкина-13 (IL-13R $\alpha 2$)», также известная как CD213A2 (кластер дифференцировки

213A2), имеет свое простое и обычно используемое значение в контексте описания и может включать, не ограничиваясь перечисленным, например, мембранно-связанный белок, который у человека кодируется геном IL-13RA2. IL-13R α 2 тесно связан с IL-13R α 1, субъединицей рецепторного комплекса интерлейкина-13. IL-13R α 2 обычно связывает IL-13 с высокой аффинностью, но лишен какого-либо значимого цитоплазматического домена и, по-видимому, не действует как медиатор сигнала. Однако он способен регулировать действия как IL-13, так и IL-4, несмотря на то, что он неспособен напрямую связываться с последним. Также сообщается, что он играет роль в интернализации IL-13.

[0073] В настоящем документе термин «Т-клетки» или Т-лимфоциты в некоторых вариантах осуществления может включать Т-клетки из любого вида млекопитающих, предпочтительно приматов, включая обезьян, собак или людей. В некоторых альтернативных вариантах Т-клетки являются аллогенными (происходят от того же вида, но от другого донора) для субъекта-реципиента, который получает или должен получить клетки, например, в форме терапевтической композиции; в некоторых альтернативных вариантах Т-клетки являются аутологичными (донор и реципиент представляют собой один и тот же организм); в некоторых альтернативных вариантах Т-клетки являются сингенными (донор и реципиенты являются разными, но являются однояйцевыми близнецами).

[0074] В настоящем документе термин «цитотоксический Т-лимфоцит» (CTL) имеет свое простое и обычно используемое значение в контексте описания и может включать, не ограничиваясь перечисленным, например, Т-лимфоцит, экспрессирующий CD8 на своей поверхности (например, CD8⁺ Т-клетку). В некоторых альтернативных вариантах такие клетки предпочтительно представляют собой Т-клетки «памяти» (Т_М-клетки), имевшие контакт с антигеном. В некоторых альтернативных вариантах клетка представляет собой цитотоксический Т-лимфоцит. В настоящем документе термин «центральная Т-клетка памяти» (или «Т_{СМ}») относится к имевшему контакт с антигеном CTL, который экспрессирует CD62L, CCR-7 и/или CD45RO на своей поверхности и не экспрессирует или имеет пониженную экспрессию CD45RA по сравнению с наивными клетками. В некоторых альтернативных вариантах клетка представляет собой центральную Т-клетку памяти (Т_{СМ}). В некоторых альтернативных вариантах центральные клетки памяти являются положительными в отношении экспрессии CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO или CD95, или их комбинации, и могут иметь пониженную экспрессию CD54RA по сравнению с наивными клетками. В настоящем документе термин «эффекторная Т-клетка памяти» (или «Т_{ЕМ}») относится к имевшей контакт с антигеном Т-клетке, которая не экспрессирует или имеет пониженную экспрессию CD62L на своей поверхности по

сравнению с центральными клетками памяти, и не экспрессирует или имеет пониженную экспрессию CD45RA по сравнению с наивной клеткой. В некоторых альтернативных вариантах клетка представляет собой эффекторную Т-клетку памяти. В некоторых альтернативных вариантах эффекторные клетки памяти являются отрицательными в отношении экспрессии CD62L и/или CCR7 по сравнению с наивными клетками или центральными клетками памяти и могут иметь меняющуюся экспрессию CD28 и/или CD45RA.

[0075] Зрелые Т-клетки экспрессируют поверхностный белок CD4 и называются CD4⁺ Т-клетками. CD4⁺ Т-клетки обычно рассматриваются как играющие заранее определенную роль в качестве Т-хелперов в иммунной системе. Например, когда антигенпрезентирующая клетка экспрессирует антиген на МНС класса II, CD4⁺ клетка будет помогать этим клеткам посредством комбинации межклеточных взаимодействий (например, CD40 и CD40L) и с помощью цитокинов. Тем не менее, бывают редкие исключения; например, подгруппы регуляторных Т-клеток, естественных киллеров или цитотоксических Т-клеток экспрессируют CD4. Все перечисленные группы Т-клеток, экспрессирующих CD4⁺, не считаются Т-хелперами.

[0076] В настоящем документе термин «центральная Т-клетка памяти» (или «Т_{СМ}») имеет свое простое и обычно используемое значение в контексте описания и может включать, не ограничиваясь перечисленным, например, имевший контакт с антигеном CTL, который экспрессирует CD62L, или CCR-7, или CD45RO, или любую их комбинацию на своей поверхности и не экспрессирует или имеет пониженную экспрессию CD45RA по сравнению с наивными клетками. В некоторых альтернативных вариантах центральные клетки памяти являются положительными в отношении экспрессии CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO или CD95, или любой их комбинации, и имеют пониженную экспрессию CD54RA по сравнению с наивными клетками.

[0077] В настоящем документе термин «эффекторная Т-клетка памяти» (или «Т_{ЕМ}») имеет свое простое и обычно используемое значение в контексте описания и может включать, не ограничиваясь перечисленным, например, имевшую контакт с антигеном Т-клетку, которая не экспрессирует или имеет пониженную экспрессию CD62L на своей поверхности по сравнению с центральными клетками памяти, и не экспрессирует или имеет пониженную экспрессию CD45RA по сравнению с наивной клеткой. В некоторых альтернативных вариантах эффекторные клетки памяти являются отрицательными в отношении экспрессии CD62L или CCR7, или обоих, по сравнению с наивными клетками или центральными клетками памяти, и имеют меняющуюся экспрессию CD28 или CD45RA, или обоих.

[0078] В настоящем документе термин «наивные» Т-клетки имеет свое простое и обычно используемое значение в контексте описания и может включать, не ограничиваясь перечисленным, например, не имевший контакт с антигеном Т-лимфоцит, экспрессирующий CD62L или CD45RA, или оба, или не экспрессирующий CD45RO- по сравнению с центральными или эффекторными клетками памяти. В некоторых альтернативных вариантах наивные CD8⁺ Т-лимфоциты характеризуются экспрессией фенотипических маркеров наивных Т-клеток, включающих CD62L, CCR7, CD28, CD127 или CD45RA, или любую их комбинацию.

[0079] В настоящем документе «эффекторные» «Т_Е» Т-клетки имеют свое простое и обычно используемое значение в контексте описания и могут включать, не ограничиваясь перечисленным, например, имевшие контакт с антигеном цитотоксические Т-лимфоциты, которые не экспрессируют или имеют пониженную экспрессию CD62L, CCR7 или CD28 или являются положительными в отношении гранзима В или перфорина, или любой их комбинации, по сравнению с центральными Т-клетками памяти или наивными Т-клетками.

[0080] В настоящем документе термин «Т-клетки-предшественники» имеет свое простое и обычно используемое значение в контексте описания и может включать, не ограничиваясь перечисленным, например, лимфоидные клетки-предшественники, которые могут мигрировать в тимус и становиться Т-клетками-предшественниками, которые не экспрессируют Т-клеточный рецептор. Все Т-клетки происходят из гемопоэтических стволовых клеток костного мозга. Гемопоэтические предшественники (лимфоидные клетки-предшественники) из гемопоэтических стволовых клеток заселяют тимус и размножаются путем деления клеток, образуя большую популяцию незрелых тимоцитов. Самые ранние тимоциты не экспрессируют ни CD4, ни CD8 и поэтому классифицируются как дважды отрицательные (CD4⁻CD8⁻) клетки. По мере своего развития они становятся дважды положительными тимоцитами (CD4⁺CD8⁺) и, наконец, созревают до одноположительных (CD4⁺CD8⁻ или CD4⁻CD8⁺) тимоцитов, которые затем высвобождаются из тимуса в периферические ткани.

[0081] В настоящем документе термин «фармацевтическое вспомогательное вещество» или фармацевтический носитель имеет свое простое и обычно используемое значение в контексте описания и может включать, не ограничиваясь перечисленным, например, наполнитель или инертную среду, используемую в качестве растворителя, в которой содержится и/или вводится лекарственно активный агент или Т-клетки для лечения или терапии. Носители могут включать полимерные мицеллы, липосомы, наполнители на основе липопротеинов, наполнители на основе наночастиц или дендримеры, или другие

носители для Т-клеток, известные специалисту в данной области техники. Идеальный носитель или вспомогательное вещество может быть нетоксичным, биосовместимым, неиммуногенным, биоразлагаемым, или может избегать распознавания защитными механизмами хозяина, или обладать любой комбинацией этих характеристик.

[0082] В настоящем документе термин «субъект» или «пациент» относится к любому организму, у которого могут быть применены или которому могут быть введены альтернативные варианты, описанные в настоящем документе, например, для экспериментальных, диагностических, профилактических и/или терапевтических целей. Субъекты или пациенты включают, например, животных. В некоторых альтернативных вариантах субъект представляет собой мышью, крыс, кроликов, нечеловекообразных приматов или людей. В некоторых альтернативных вариантах субъект представляет собой корову, овцу, свинью, лошадь, собаку, кошку, примата или человека.

[0083] Высокие уровни рецептора интерлейкина 13 альфа 2 (IL-13RA2) обнаружены на ряде раковых клеток, включая рак поджелудочной железы, молочной железы и яичника или злокачественные глиомы, такие как глиобластома. IL-13RA2 также может сверхэкспрессироваться у подавляющего большинства людей с астроцитомами высокой степени злокачественности (см. PLoS One. 2013 Oct 16; 8(10):e77719; настоящим в явном виде включенный посредством ссылки во всей полноте). Кроме того, снижение уровня экспрессии IL13RA2 в раковых клетках может значительно замедлять рост опухоли в моделях (Breast Cancer Research, 2015; 17 (1); настоящим в явном виде включенный посредством ссылки во всей полноте). Предполагается, что лишь единичные типы нормальных тканей экспрессируют IL-13-RA2, и при этом только на низких уровнях. В случае мультиформной глиобластомы (GBM) высокая экспрессия IL13Rα2 может быть прогностическим маркером прогрессирования опухоли и плохой выживаемости пациентов.

[0084] Некоторые варианты осуществления, предложенные в настоящем документе, включают химерные рецепторы, такие как дзетакины, включая рецепторы, направленные против солидных опухолей. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит связывающий домен, содержащий мутантную форму IL13 (например, IL13 E13Y), связанный с трансмембранным доменом рецептора через спейсерную область. В некоторых вариантах осуществления спейсерная область обычно пролегает от связывающего домена до трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит полипептид, который имеет длину более или приблизительно более, или содержит по меньшей мере или приблизительно 12, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 аминокислот в длину, например, более 50 или 100 аминокислот в длину и необязательно менее 150, 200 или 220 аминокислот в длину, например, от 50 до

220 аминокислот в длину, от 50 до 150 аминокислот в длину или 110 или приблизительно 110 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой транс-домен CD28 (CD28tm) или содержит его, за ним следует костимулирующий домен(ы), такой как костимулирующий домен, полученный из внутриклеточного сегмента человеческого 4-1BB (CD137), и первичный сигнальный домен, такой как сигнальный домен CD3-дзета (CD3ζ).

[0085] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая химерный рецептор, дополнительно включает последовательность, кодирующую маркер, необязательно функционально связанную с тем же промотором, с которым связана нуклеиновая кислота, кодирующая рецептор. В некоторых аспектах маркер представляет собой усеченную версию рецептора клеточной поверхности, такую как усеченная версия рецептора эпидермального фактора роста (EGFRt), CD19 (CD19t) или HER2 (Her2t), или другого рецептора. В некоторых аспектах нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, отделена от нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный рецептор, последовательностью проскока, такой как последовательность рибосомного проскока P2A или T2A, или IRES. В некоторых аспектах нуклеиновая кислота дополнительно включает трансген двойного мутанта дигидрофолатредуктазы (DHFRdm), который может быть добавлен для облегчения селекции метотрексатом клеток, экспрессирующих продукты конструкции, например, в терапевтических Т-клеточных продуктах.

Некоторые нуклеиновые кислоты

[0086] Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, включают нуклеиновые кислоты, кодирующие прикрепленный к мембране направленный мутеином IL-13 дзетакиновый рецептор. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит: а) первый полинуклеотид, кодирующий внеклеточный домен; b) второй полинуклеотид, кодирующий мутеин IL13; c) третий полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен; и d) четвертый полинуклеотид, кодирующий внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий маркерный полипептид, такой как EGFRt. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий селектируемый маркер, такой как DHFRdm. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает последовательность рибосомного проскока.

[0087] В некоторых вариантах осуществления мутеин IL13 содержит, состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности, обладающей

определенным процентом идентичности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16. В некоторых таких вариантах осуществления идентичность последовательности с SEQ ID NO: 16 составляет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, или процент между любыми двумя из вышеуказанных процентов. В некоторых вариантах осуществления мутеин IL13 содержит, состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16.

[0088] В некоторых альтернативных вариантах внеклеточный домен содержит по меньшей мере один пептидный спейсер. В некоторых альтернативных вариантах пептидный спейсер состоит из 15 аминокислот или менее, но не менее чем из 1 или 2 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой полипептидную цепь. В некоторых альтернативных вариантах спейсер содержит шарнир IgG4 или его часть. В некоторых альтернативных вариантах спейсер содержит шарнирную область человеческого антитела или ее часть. В некоторых альтернативных вариантах спейсер содержит шарнир IgG4 или его часть. В некоторых альтернативных вариантах шарнирная область IgG4 представляет собой модифицированный шарнир IgG4 или его часть. «Модифицированный шарнир IgG4», как описано в настоящем документе, может относиться к шарнирной области, которая может обладать по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности, или идентичностью последовательности в диапазоне, определенном любыми двумя из вышеуказанных процентов, с шарнирной областью аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 01, SEQ ID NO: 02, SEQ ID NO: 03, SEQ ID NO: 04, SEQ ID NO: 05, SEQ ID NO: 06, SEQ ID NO: 07 или SEQ ID NO: 08. В некоторых альтернативных вариантах спейсер представляет собой спейсер S, спейсер M или спейсер L. Спейсер S содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 09. Спейсер M содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10. Спейсер L содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11.

[0089] В некоторых альтернативных вариантах спейсер содержит, состоит из или по существу состоит из спейсера из шарнира IgG4 (S), спейсера из шарнира IgG4-CH3 (M) или спейсера из шарнира IgG4-CH2-CH3. В некоторых альтернативных вариантах спейсер содержит спейсер IgG4-CH3 (M).

[0090] В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности, обладающей определенным процентом идентичности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10. В некоторых таких вариантах осуществления идентичность последовательности с SEQ ID NO: 10 составляет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98%, 99% или 100%, или процент между любыми двумя из вышеуказанных процентов. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

[0091] В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности, обладающей определенным процентом идентичности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11. В некоторых таких вариантах осуществления идентичность последовательности с SEQ ID NO: 11 составляет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, или процент между любыми двумя из вышеуказанных процентов. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11.

[0092] В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит от 10 до 229 аминокислот, от 10 до 200 аминокислот, от 10 до 175 аминокислот, от 10 до 150 аминокислот, от 10 до 125 аминокислот, от 10 до 100 аминокислот, от 10 до 75 аминокислот, от 10 до 50 аминокислот, от 10 до 40 аминокислот, от 10 до 30 аминокислот, от 10 до 20 аминокислот или от 10 до 15 аминокислот, включая любое целое число между конечными точками любого из перечисленных диапазонов. В некоторых вариантах осуществления спейсерная область содержит 12 аминокислот или менее, но не ноль, 119 аминокислот или менее, но не ноль, или 229 аминокислот или менее, но не ноль. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет длину менее 250 аминокислот, но не ноль, длину менее 200 аминокислот, но не ноль, длину менее 150 аминокислот, но не ноль, длину менее 100 аминокислот, но не ноль, длину менее 75 аминокислот, но не ноль, длину менее 50 аминокислот, но не ноль, длину менее 25 аминокислот, но не ноль, длину менее 20 аминокислот, но не ноль, длину менее 15 аминокислот, но не ноль, длину менее 12 аминокислот, но не ноль или длину менее 10 аминокислот, но не ноль. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет длину от 10 до 250 аминокислот, длину от 10 до 150 аминокислот, длину от 10 до 100 аминокислот, длину от 10 до 50 аминокислот, длину от 10 до 25 аминокислот, длину от 10 до 15 аминокислот, длину от 15 до 250 аминокислот, длину от 15 до 150 аминокислот, длину от 15 до 100 аминокислот, длину от 15 до 50 аминокислот, длину от 15 до 25 аминокислот, длину от 25 до 250 аминокислот, длину от 25 до 100 аминокислот, длину от 25 до 50 аминокислот, длину от 50 до 250 аминокислот, длину от 50 до 150 аминокислот, длину от 50 до 100 аминокислот, длину от 100 до 250 аминокислот, длину от 100 до 150 аминокислот или длину от 150 до 250 аминокислот. Примеры спейсеров включают только шарнир IgG4, шарнир IgG4, связанный с доменами CH2 и CH3, или шарнир IgG4, связанный с доменом CH3. Примеры спейсеров включают,

не ограничиваясь перечисленным, описанные в Hudecek et al. *Clin. Cancer Res.*, 19:3153 (2013), публикации международной патентной заявки № WO2014031687, №8,822,647 или опубликованной заявке No.US2014/0271635, настоящим в явном виде включенных посредством ссылки во всей полноте.

[0093] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой область трансмембранного белка, который является гидрофобным, которая может находиться в бислое клетки для закрепления белка, встроенного в биологическую мембрану. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, структура трансмембранного домена может представлять собой трансмембранную альфа-спираль. В некоторых альтернативных вариантах трансмембранный домен содержит трансмембранную последовательность CD28 или ее фрагмент, например, фрагмент длиной 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 аминокислот или длиной в диапазоне, определенном любыми двумя из вышеупомянутых длин. В некоторых альтернативных вариантах трансмембранная последовательность CD28 или ее фрагмент содержит 28 аминокислот в длину.

[0094] В некоторых альтернативных вариантах внутриклеточный сигнальный домен содержит весь или часть домена CD3-дзета в комбинации с костимулирующим доменом, выбранным из группы, состоящей из CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C и B7-H3, или их комбинаций. В некоторых альтернативных вариантах внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальную функциональную часть домена CD3-дзета и костимулирующую функциональную часть домена 4-1BB.

[0095] В некоторых альтернативных вариантах нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую маркерную последовательность. В некоторых аспектах маркер представляет собой усеченную версию рецептора клеточной поверхности, такую как усеченная версия рецептора эпидермального фактора роста (EGFRt), CD19 (CD19t) или HER2 (Her2t), или другого рецептора. В некоторых альтернативных вариантах маркерная последовательность представляет собой усеченную форму рецептора клеточной поверхности, необязательно EGFRt.

[0096] В некоторых альтернативных вариантах нуклеиновая кислота дополнительно содержит трансген дигидрофолатредуктазы, обеспечивающий возможность селекции метотрексатом. В некоторых альтернативных вариантах трансген дигидрофолатредуктазы представляет собой двойной мутант дигидрофолатредуктазы (DHFRdm). В некоторых альтернативных вариантах двойной мутант дигидрофолатредуктазы содержит аминокислотные мутации L22F и F31S.

[0097] В некоторых альтернативных вариантах нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую последовательность рибосомного проскока. В некоторых альтернативных вариантах последовательность рибосомного проскока содержит Р2А или Т2А.

[0098] В некоторых альтернативных вариантах нуклеиновая кислота модифицирована для уменьшения общего соотношения GC/AT нуклеиновой кислоты. В некоторых альтернативных вариантах нуклеиновая кислота оптимизирована по кодонам для экспрессии в организме человека.

[0099] Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, включают векторы экспрессии, содержащие нуклеиновую кислоту согласно любому из альтернативных вариантов, предложенных в настоящем документе. В некоторых альтернативных вариантах вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых альтернативных вариантах вектор представляет собой лентивирусный или аденовирусный вектор. В некоторых альтернативных вариантах дзетакиновый рецептор содержит внеклеточный домен, содержащий мутеин IL-13 и спейсер; трансмембранный домен; и внутриклеточную сигнальную область, где указанный спейсер расположен между указанным мутеином и указанным трансмембранным доменом.

Некоторые химерные рецепторы

[0100] Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, включают полипептиды химерного рецептора, кодируемые нуклеиновой кислотой согласно любому из альтернативных вариантов, предложенных в настоящем документе, или вектором согласно любому из альтернативных вариантов, предложенных в настоящем документе. Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, включают прикрепленные к мембране направленные мутеином IL13 дзетакиновые рецепторы, кодируемые нуклеиновой кислотой согласно любому из альтернативных вариантов, предложенных в настоящем документе, или вектором согласно любому из альтернативных вариантов, предложенных в настоящем документе.

Некоторые клетки-хозяева

[0101] Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, включают клетки-хозяева, содержащие нуклеиновую кислоту согласно любому из альтернативных вариантов, предложенных в настоящем документе, или вектор экспрессии согласно любому из альтернативных

вариантов, предложенных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин включает генетически модифицированную клетку. В некоторых альтернативных вариантах клетка-хозяин представляет собой цитотоксический CD8⁺ Т-лимфоцит, выбранный из группы, состоящей из наивных CD8⁺ Т-клеток, CD8⁺ центральных Т-клеток памяти, CD8⁺ эффекторных Т-клеток памяти и общей популяции CD8⁺ Т-клеток. В некоторых альтернативных вариантах цитотоксический CD8⁺ Т-лимфоцит представляет собой центральную Т-клетку памяти, и при этом указанная центральная Т-клетка памяти является положительной в отношении CD45RO⁺, CD62L⁺ и CD8⁺. В некоторых альтернативных вариантах клетка-хозяин представляет собой CD4⁺ Т-хелперный лимфоцит, выбранный из группы, состоящей из наивных CD4⁺ Т-клеток, CD4⁺ центральных Т-клеток памяти, CD4⁺ эффекторных Т-клеток памяти и общей популяции CD4⁺ Т-клеток. В некоторых альтернативных вариантах CD4⁺ хелперный лимфоцит представляет собой наивную CD4⁺ Т-клетку, и при этом указанная наивная CD4⁺ Т-клетка является положительной в отношении CD45RA⁺, CD62L⁺ и CD4⁺, и отрицательной в отношении CD45RO. В некоторых альтернативных вариантах клетка-хозяин представляет собой Т-клетку-предшественника. В некоторых альтернативных вариантах клетка-хозяин представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку.

[0102] Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, включают клетку-хозяина согласно любому из альтернативных вариантов, предложенных в настоящем документе, или композицию согласно любому из альтернативных вариантов, предложенных в настоящем документе, для применения для лечения или ингибирования рака или солидной опухоли, экспрессирующих рецептор IL-13 α 2. Композиция содержит клетку-хозяина согласно любому из альтернативных вариантов, предложенных в настоящем документе, и фармацевтическое вспомогательное вещество. В некоторых альтернативных вариантах рак представляет собой глиобластому. В некоторых альтернативных вариантах рак представляет собой мультиформную глиобластому (GBM). В некоторых альтернативных вариантах рак представляет собой IL13R α -положительное злокачественное новообразование. В некоторых альтернативных вариантах рак представляет собой рак головного мозга или опухоли головного мозга. Соответственно, некоторые варианты осуществления касаются клетки-хозяина согласно любому из альтернативных вариантов, описанных в настоящем документе, для применения в лекарственном средстве или для применения для лечения или ингибирования рака, такого как рак головного мозга, включая, не ограничиваясь перечисленным, IL13R α -положительное злокачественное новообразование, GBM, глиому или глиобластому.

Некоторые композиции

[0103] Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, включают композиции, содержащие клетку-хозяина согласно любому из альтернативных вариантов, предложенных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Некоторые способы получения клеток-хозяев

[0104] Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, включают способы получения клетки-хозяина согласно любому из альтернативных вариантов, предложенных в настоящем документе. Некоторые такие варианты осуществления включают: а) введение нуклеиновой кислоты согласно любому из альтернативных вариантов, предложенных в настоящем документе, или вектора экспрессии согласно любому из альтернативных вариантов, в лимфоциты; b) культивирование указанных лимфоцитов в присутствии антител к CD3 или к CD28 и по меньшей мере одного гомеостатического цитокина; и c) отбор лимфоцитов с помощью реагента для селекции, где указанный реагент для селекции обеспечивает возможность селективного обогащения клетками, трансдуцированными указанной нуклеиновой кислотой или вектором. В некоторых альтернативных вариантах реагент для селекции представляет собой метотрексат. В некоторых альтернативных вариантах лимфоциты имеют фенотип CD45RA-, CD45RO+ или CD62L+, или любую их комбинацию. В некоторых альтернативных вариантах лимфоциты являются CD8+ или CD4+. В некоторых альтернативных вариантах цитокин представляет собой IL-15, IL-7 или IL-21, или любую их комбинацию. В некоторых альтернативных вариантах способ дополнительно включает введение второй нуклеиновой кислоты в указанную клетку-хозяина, где указанная вторая нуклеиновая кислота кодирует маркерный белок. В некоторых альтернативных вариантах маркерный белок представляет собой EGFRt. В некоторых альтернативных вариантах вектор экспрессии содержит нуклеиновую кислоту согласно любому из альтернативных вариантов, предложенных в настоящем документе. В некоторых альтернативных вариантах вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых альтернативных вариантах вектор представляет собой лентивирусный или аденовирусный вектор.

[0105] В некоторых альтернативных вариантах клетка-хозяин представляет собой цитотоксический CD8+ Т-лимфоцит, выбранный из группы, состоящей из наивных CD8+ Т-клеток, CD8+ центральных Т-клеток памяти, CD8+ эффекторных Т-клеток памяти и общей популяции CD8+ Т-клеток. В некоторых альтернативных вариантах

цитотоксический CD8⁺ Т-лимфоцит представляет собой центральную Т-клетку памяти, и при этом указанная центральная Т-клетка памяти является положительной в отношении CD45RO⁺, CD62L⁺ или CD8⁺, или любой их комбинации. В некоторых альтернативных вариантах клетка-хозяин представляет собой CD4⁺ Т-хелперный лимфоцит, выбранный из группы, состоящей из наивных CD4⁺ Т-клеток, CD4⁺ центральных Т-клеток памяти, CD4⁺ эффекторных Т-клеток памяти и общей популяции CD4⁺ Т-клеток. В некоторых альтернативных вариантах CD4⁺ хелперный лимфоцит представляет собой наивную CD4⁺ Т-клетку, и при этом указанная наивная CD4⁺ Т-клетка является положительной в отношении CD45RA⁺, CD62L⁺ или CD4⁺, или любой их комбинации, и отрицательной в отношении CD45RO. В некоторых альтернативных вариантах клетка-хозяин представляет собой Т-клетку-предшественника. В некоторых альтернативных вариантах клетка-хозяин представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку.

Некоторые методы терапии

[0106] Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, включают применение клетки-хозяина, предложенной в настоящем документе, в методах терапии. Некоторые такие варианты осуществления включают применение клетки для лечения, ингибирования или ослабления рака или солидной опухоли, экспрессирующих рецептор IL-13 α 2 (IL-13Ra2). В некоторых альтернативных вариантах рак представляет собой глиобластому. В некоторых альтернативных вариантах рак представляет собой мультиформную глиобластому (GBM). В некоторых альтернативных вариантах рак представляет собой IL13Ra α -положительное злокачественное новообразование. В некоторых альтернативных вариантах рак представляет собой рак головного мозга или опухоли головного мозга.

[0107] Некоторые варианты осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем документе, включают способы проведения клеточной иммунотерапии у субъекта, имеющего рак или опухоль, включающие: введение клетки-хозяина согласно любому из альтернативных вариантов, предложенных в настоящем документе, или композиции согласно любому из альтернативных вариантов, предложенных в настоящем документе, указанному субъекту. Предложенная композиция содержит клетку-хозяина согласно любому из альтернативных вариантов, предложенных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых альтернативных вариантах рак представляет собой глиобластому. В некоторых альтернативных вариантах рак представляет собой мультиформную глиобластому (GBM). В некоторых альтернативных вариантах рак представляет собой IL13Ra α -положительное

злокачественное новообразование. В некоторых альтернативных вариантах рак представляет собой рак головного мозга. В некоторых альтернативных вариантах субъект выбран для получения комбинированной терапии. В некоторых альтернативных вариантах комбинированная терапия включает введение химиотерапевтического препарата. В некоторых альтернативных вариантах комбинированная терапия включает проведение лучевой терапии. В некоторых альтернативных вариантах химиотерапевтический препарат включает электрохимиотерапию, алкилирующие агенты, антиметаболиты (например, 5-фторурацил (5-FU), 6-меркаптопурин (6-MP), капецитабин (Xeloda®), кладрибин, клофарабин, цитарабин (Ara-C®), флоксуридин, флударабин, гемцитабин (Gemzar®), гидроксимочевину, метотрексат, пеметрексед (Alimta®), пентостатин или тиогуанин), противоопухолевые антибиотики, ингибиторы топоизомеразы, ингибиторы митоза, кортикостероиды, интеркалирующие ДНК агенты или ингибиторы контрольной точки (киназы контрольной точки CHK1 или CHK2). В некоторых альтернативных вариантах рак представляет собой глиому.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 - Конструирование IL-13(E13Y)-дзетакиновых CAR

[0108] Были сконструированы различные IL-13(E13Y)-дзетакиновые CAR с разными спейсерными областями. Как показано на ФИГ. 1, нуклеиновые кислоты, кодирующие дзетакиновые CAR, включали: лидерную последовательность (EF1p); полинуклеотид, кодирующий мутин IL-13(E13Y); полинуклеотид, кодирующий один из трех разных спейсеров; полинуклеотид, кодирующий трансмембранную последовательность CD28tm; полинуклеотид, кодирующий сигнальный домен, включающий первичный и костимулирующий домен, которые представляли собой домен 4-1BB и домен CD3-дзета, соответственно. Спейсеры включали: короткий спейсер «S», который включал модифицированный шарнир IgG4; спейсер средней длины «M», который включал модифицированный шарнир IgG4 и область CH3 иммуноглобулина (шарнир IgG4-CH3); и длинный спейсер «L», который включал модифицированный шарнир IgG4, домен CH2 иммуноглобулина и домен CH3 иммуноглобулина (шарнир IgG4-CH2-CH3). Спейсер L содержал две мутации в домене CH2 (L235D, N297Q), которые могут смягчать потенциальные нежелательные эффекты, возникающие в результате возможных взаимодействий рецептора с Fc-рецепторами (FcR). Также были включены последовательности саморасщепляющегося пептида 2A (T2A) в качестве последовательности рибосомного пропуска. В некоторых конструкциях лентивектор также содержал трансген двойного мутанта дигидрофолатредуктазы, обеспечивающий

возможность селекции метотрексатом (DHFRdm). В SEQ ID NO: 16 приведен мутеин IL-13. Пример последовательности мутеина IL-13 приведен в Kahlon *et al.* (Kahlon KS *et al.*, Cancer Res.2004; включен в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте). Как описано в данном документе, мутация E13Y обеспечивала повышенное селективное связывание с IL-13R α 2.

Пример 2 - Сравнение CAR, включающих различные спейсеры, *in vitro*

[0109] Т-клетки, содержащие различные CAR, были созданы согласно способу, представленному на ФИГ. 2А. CD8⁺ Т-клетки отбирали из мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК) с использованием микрогранул. Отобранные клетки стимулировали микрогранулами к CD3/CD28, а затем передавали трансдуцировали лентивирусами с конструкциями. В некоторых циклах (*) CD8 Т-клетки трансдуцировали конструкцией, которая также содержала T2A-DHFRdm, который находился в пределах рамки считывания по ходу транскрипции от EGFRt, чтобы обеспечить совместную экспрессию, что позволило отобрать MTX-устойчивые Т-клетки, совместно экспрессирующие функционально релевантные уровни IL13-дзетакинового CAR. Затем клетки подвергали окрашиванию в ходе проточной цитометрии для идентификации клеток, несущих дзетакиновый CAR, и отбирали с помощью маркера EGFRt. Репрезентативные данные проточной цитометрии продемонстрировали, что CD8⁺ Т-клетки были эффективно отобраны, а затем впоследствии обогащены или отобраны (*) почти до чистоты по экспрессии суррогатного маркера (EGFRt), как показано на ФИГ. 2В.

[0110] CD8⁺ Т-клетки, содержащие дзетакиновые CAR со спейсером S, M или L, были дополнительно охарактеризованы в отношении специфического лизиса клеток-мишеней, экспрессирующих IL13R α 2, и экспрессии цитокинов CD8⁺ Т-клетками в присутствии клеток-мишеней. Клетки-мишени U87, U251T и DAOY анализировали на IL13R α 2 (ФИГ. 3А). В 4-часовом анализе цитотоксичности по ⁵¹Cr меченые линии опухолевых клеток U87, U251T и DAOY совместно культивировали с пустыми Т-клетками или Т-клетками с вариантами IL13-дзетакиновых CAR 2 поколения (ФИГ. 3В). Т-клетки с IL13-дзетакиновыми CAR как со спейсером M, так и со спейсером L вызвали специфический лизис, в то время как короткий спейсер не мог эффективно нацеливаться на IL13R α 2. Данные представляли собой среднее значение $\pm$ SD для 3 разных доноров.

[0111] В анализе высвобождения цитокинов Т-клетки, содержащие дзетакиновые CAR, культивировали с мишенями в течение 24 часов. Бесклеточные супернатанты собирали для измерения секреции TNF α , IFN γ и IL-2. CD8⁺ Т-клетки, содержащие дзетакиновые CAR со спейсером M или L, имели высокие уровни продукции

цитокинов, тогда как дзетакиновые CAR со спейсером S по существу не продуцировали цитокинов (ФИГ. 3С).

Пример 3 - Противоопухолевая активность IL13-дзетакиновых CAR *in vivo*

[0112] Была протестирована *in vivo* противоопухолевую активность IL13-дзетакиновых CAR, содержащих спейсер M либо спейсер L. Клетки глиобластомы U87, меченные ffLuc ($0,2 \times 10^6$ вводили интракраниально в передний мозг мышей NSG в 0 день. На 7 день мышам ($n=5$ на группу) вводили пустые Т-клетки или вводили различные дозы (2×10^6 , 1×10^6 Т-клеток) CD8⁺ Т-клеток, трансдуцированных IL13-дзетакиновыми CAR 2 поколения со спейсером средней длины или длинным спейсером.

[0113] Суммарный поток (фотон/сек) от клеток U87 измеряли как меру опухолевой нагрузки. Как показано на ФИГ. 4А, опухолевая нагрузка у мышей, получавших клетки, содержащие IL13-дзетакиновый CAR, содержащий спейсер L, снижалась со временем по сравнению с мышами, получавшими пустые клетки, и мышами, получавшими IL-13-дзетакиновый CAR, содержащий спейсер L. Кривая выживаемости Каплана-Мейера продемонстрировала улучшение выживаемости мышей, которым вводили различные дозы клеток, содержащих IL-13-дзетакиновый CAR, содержащий спейсер L (ФИГ. 4В).

Пример 4 – Анализ IL13-дзетакиновых CAR *in vitro*

[0114] Клетки, содержащие IL-13-дзетакиновый CAR со спейсером M либо спейсером L, получали способом, по существу аналогичным способу, приведенному на ФИГ. 5А. Вкратце, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки выделяли и совместно культивировали. По прошествии двух дней Т-клетки трансдуцировали IL-13-дзетакином со спейсером M либо IL-13-дзетакином со спейсером L. По окончании стимуляции (S1D13) клетки анализировали на соотношения CD4:CD8, экспрессию маркера и непосредственную экспрессию дзетакина при окрашивании антителом к IL-13 (ФИГ. 5В).

[0115] Клетки тестировали с помощью функционального анализа *in vitro* (ФИГ. 6). Направленные IL-13-дзетакином Т-клетки подвергали анализу высвобождения хрома для оценки степени специфического лизиса после культивирования с клетками-мишенями, экспрессирующими IL-13Ra2. В этом анализе стимулированные Т-клетки на пятнадцатый день (S1D15) совместно культивировали с различными линиями клеток-мишеней при различных соотношениях эффектора и мишени. Клетки K562-ОКТ3 использовали в качестве положительного контроля для активации Т-клеток, вызываемой комплексом TCR, в то время как все остальные линии клеток экспрессируют IL-13Ra2 на различных уровнях (см. верхнюю таблицу). В нижней таблице представлено соотношение CD4 и CD8 Т-клеток

и положительность на суррогатный маркер. Анализ проводили путем приведения к общему количеству положительных на суррогатный маркер клеток. Результаты демонстрируют, что дзетакины как со спейсером М, так и со спейсером L вызывали лизис, направленный против IL-13Ra2-положительных мишеней.

Пример 5 - Противоопухолевая активность IL13-дзетакиновых CAR *in vivo*

[0116] Как показано на ФИГ. 7, наблюдалось, что IL-13-дзетакины со спейсером М и спейсером L ингибируют рост опухоли в модели глиобластомы (GBM). Клетки из примера 4 и клетки S1D15 использовали для ортотопической ксенотрансплантатной модели опухоли. В этой модели опухолевые клетки глиобластомы U87 GFP:ffluc вводили интракраниально мышам NOD-Scid IL2yR-null. Семь дней спустя Т-клетки, направленные IL-13-дзетакином, вводили в то же место, что и опухоль U87 GFP:ffluc. Наблюдалось, что Т-клетки, экспрессирующие IL-13-дзетакин со спейсером М и L, ингибировали рост опухоли, о чем свидетельствовало снижение опухолевой нагрузки *in vivo*, исходя из потока, испускаемого опухолью U87, экспрессирующей ffluc (ФИГ. 7). Статистический анализ различий дельта-потока через 26 дней после инокуляции опухоли продемонстрировал, что спейсер М и спейсер L значительно ингибировали начало потока по сравнению с пустыми (без IL-13-дзетакина) Т-клетками.

Пример 6 - Анализ IL13-дзетакиновых CAR *in vitro*

[0117] Т-клетки, направленные IL-13-дзетакином, подвергали анализу высвобождения хрома. В этом анализе быстро размноженные Т-клетки на четырнадцатый день (S1R1D14) совместно культивировали с различными линиями клеток-мишеней при различных соотношениях эффектора и мишени. K562-ОКТ3 использовали в качестве положительного контроля для активации Т-клеток, вызываемой комплексом TCR, в то время как все остальные линии клеток экспрессируют IL-13Ra2 на различных уровнях (см. верхнюю таблицу). Пустые Т-клетки, не трансдуцированные для экспрессии какого-либо из дзетакинов, были включены в это исследование в качестве отрицательного контроля, демонстрирующего IL-13Ra2-специфический лизис. В нижней таблице представлено соотношение CD4 и CD8 Т-клеток и положительность на суррогатный маркер. Анализ проводили путем приведения к общему количеству положительных на маркер клеток. Результаты продемонстрировали, что дзетакины как со спейсером М, так и со спейсером L вызывали лизис, направленный против IL-13Ra2-положительных мишеней. (ФИГ. 8)

[0118] В еще одном исследовании Т-клетки, экспрессирующие IL-13-дзетакин, совместно культивировали в течение 24 часов с различными линиями клеток-мишеней при

соотношении эффектор-мишень 2:1. Данные продемонстрировали, что испытанные дзетакины были способны вызывать высвобождение цитокинов при связывании ^{125}I -IL-13 с мишенью-специфическим образом (ФИГ. 9).

[0119] В таблице 2 перечислены некоторые аминокислотные и нуклеотидные последовательности для вариантов осуществления, предложенных в настоящем документе.

ТАБЛИЦА 2

SEQ ID NO:	Характеристика(и)	Последовательность
SEQ ID NO: 01	Человеческий IgG1	EPKSCDKTHTCPPCP
SEQ ID NO: 02	Человеческий IgG2	ERKCCVECP
SEQ ID NO: 03	Человеческий IgG3	ELKTPGLDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP EPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP
SEQ ID NO: 04	Человеческий IgG4	ESKYGPPCPSCP
SEQ ID NO: 05	Модифицированный человеческий IgG4	ESKYGPPCPPCP
SEQ ID NO: 06	Модифицированный человеческий IgG4	YGPPCPPCP
SEQ ID NO: 07	Модифицированный человеческий IgG4	KYGPPCPPCP
SEQ ID NO: 08	Модифицированный человеческий IgG4	EVVKYGGPPCPPCP
SEQ ID NO: 09	Спейсер S	ESKYGPPCPPCP
SEQ ID NO: 10	Спейсер M	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSLGK
SEQ ID NO: 11	Спейсер L	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALH NHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO:	Характеристика(и)	Последовательность
SEQ ID NO: 12	Последовательность вектора, включающая: IL13-дзетакин-шарнир IgG4-CH3-CD28tm/4-1BB-дзета-T2A-EGFRt IL13-дзетакин подчеркнут	GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCT AACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAG CTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCCGTC TGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGA CCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGG CGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGGAAA CCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTG CTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGGCGAGGGGGCGGC GACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTACTAGCGG AGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGT CAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGA AAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAA ATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGG GAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTT AGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGA CAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAG AACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTC TATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACA CCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCA AAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGC AGCTGACACAGGACACAGCAATCAGGTCAGCCAA AATTACCTATAGTGACAGAACATCCAGGGGGCAA TGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAAT GCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTTCA GCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTTCAGCATTATCA GAAGGAGCCACCCACAAAGATTTAAACACCATGC TAAACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCA AATGTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCA GGCAAAGAGAAGAGTGGTGACAGAGAGAAAAAAG AGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTTCTTGGGTCT TGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTC AATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTG TCTGGTATAGTGACAGCAGCAGAAACAATTTGCTGA GGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACT CACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGA ATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAAC AGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACTC ATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGATCTACAAATG GCAGTATTCATCCACAATTTTAAAGAAAAAGGGG GGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGT AGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAA TTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTC GGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTG GGGATCAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTA GGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGAGGATCTGCGATCG CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCG CCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCG GCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGG GGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTC

SEQ ID NO:	Характеристика(и)	Последовательность
		CGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATAT AAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCA ACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGCTGGGCTAGCG TTTAAACGGGCCCTCTAGAGCCGCCACCATGCTTC TCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCA CACCCAGCATTCCTCCTGATCCCAGGCCCTGTGCC TCCCTCTACAGCCCTCAGGTACCTCATTGAGGAGC TGGTCAACATCACCCAGAACCAGAAGGCTCCGCT CTGCAATGGCAGCATGGTATGGAGCATCAACCTG ACAGCTGGCATGTACTGTGCAGCCCTGGAATCCCT GATCAACGTGTCAGGCTGCAGTGCCATCGAGAAG ACCCAGAGGATGCTGAGCGGATTCTGCCCGCACA AGGTCTCAGCTGGGCAGTTTTCCAGCTTGCATGTC CGAGACACCAAAATCGAGGTGGCCCAGTTTGTA AGGACCTGCTCTTACATTTAAAGAACTTTTTTCGC GAGGGACGGTTCAAGAATCTAAGTACCGGACCGC CCTGCCCCCCTTGCCCTGGCCAGCCTAGAGAACCC CAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCAGGAAGAGA TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAAT GGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACA AGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAG CTTCTTCCTGTACTCCCGGCTGACCGTGGACAAGA GCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTCAGCTGCAG CGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC CAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAGATGT TCTGGGTGCTGGTGGTGGTCGGAGGCGTGCTGGC CTGCTACAGCCTGCTGGTCACCGTGGCCTTCATCA TCTTTTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAACTCCT GTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTAC AACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCG ATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG CGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCTG CCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGA GCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGACGTC CTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGG GCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGG CCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCC GAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGC GGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCA GGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGAC GCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAAGGCTCG AGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAAC ATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGG ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGA GTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCA AAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAA AGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAAC ACTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTC

SEQ ID NO:	Характеристика(и)	Последовательность
		CACATCCTGCCGGTGGCATTAGGGGTGACTCCTT CACACATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGAAGTGG ATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTT TTTGCTGATTACAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACG GACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACG CGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTG CAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTA CGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGA TAATTTACAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAAT ACAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCG GTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGA AAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCAT GCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCCG AGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAG CCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTT CTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACT CTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCT CAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGAC CAGACAACTGTATCCAGTGTGCCCCTACATTGAC GGCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGAG TCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTA CGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATC CAAACCTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCT TGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCG TCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTT GCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCA TGTGAGCGGCCGCTCTAGACCCGGGCTGCAGGAA TTCGATATCAAGCTTATCGATAATCAACCTCTGGA TTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTA ACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCT GCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGT ATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGG TTGCTGTCTCTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGT CAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTG ACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCAC CTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCT CCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCCTGCC TTGCCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGC ACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATC GTCCTTTCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTG GATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTT CGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCTTCCCGCGGC CTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCG CCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGG CCGCCTCCCCGCATCGATACCGTCGACTAGCCGTA CCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAG ATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACT GGAAGGGCTAATCACTCCCAAAGAAGACAAGAT CTGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGAC

SEQ ID NO:	Характеристика(и)	Последовательность
		CAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAG GGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCT TGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTG TGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTT AGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGAATTCGATA TCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGG GCCCCGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGT GGTGGAAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGCGG CCACTCAAGTCTGGAGGGGCACGTAAAACCCGCT GATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCA TCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACC CTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATA AAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGG TGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGG ACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCA GGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCT ACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCGBA ATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGG AAGCCCTGCAAAGTAACTGGATGGCTTTCCTCGCC GCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGCTCT GATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGA TTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGC CGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGG GCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCG TGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTT TTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGA ACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTG GCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGA CGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTA TTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCAT CTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATG GCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCC GGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACAT CGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCG GTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCA TCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTGTTCGCCAGG CTCAAGGCGAGCATGCCCCGACGGCGAGGATCTCG TCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATC ATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGA CTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCAGACCGCTATCAG GACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAG AGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTG CTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCAT CGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAAT TATTAACGCTTACAATTCCTGATGCGGTATTTTCT CCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATAC AGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACC CCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATG TATCCGCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTT

SEQ ID NO:	Характеристика(и)	Последовательность
		TTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAG ATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCG CGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCG CTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCT ACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCA GAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAG CCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC ACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTAC CAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTT ACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATA AGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTG CACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACC GAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAA GCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAG GTATCCGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAG CGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGT ATCTTTATAGTCCTGTTCGGGTTTCGCCACCTCTGA CTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGG GCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCC TTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCT CACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTG GATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATAC CGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAG TCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATAC GCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAT TAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGA AAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAG TTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACT TTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTG AGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATG ACCATGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCCCTCAC TAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTG GCGGCCTCGAGGTCGAGATCCGGTCGACCAGCAA CCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCC CTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCA TGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCG AGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTA GTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCA AAAAGCTTCGACGGTATCGATTGGCTCATGTCCAA CATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGT TATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCA TAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTA CGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGA CCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTT CCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGT CAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTT GGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACG CCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGC CTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACT

SEQ ID NO:	Характеристика(и)	Последовательность
		TTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC GCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACAT CAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGA TTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAG TTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAA AATGTTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAAT GGGCGGTAGGCGTGTACGGAATTCGGAGTGGCGA GCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTG CCTGTACTGGGTCTCTCTG
SEQ ID NO: 13	Последовательность вектора, включающая: IL13-дзетакин- шарнир IgG4- CH3-CD28tm/4- 1BB-дзета-T2A- EGFRt IL13-дзетакин подчеркнут	GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCT AACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAG CTTGCCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTC TGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGA CCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGG CGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAA CCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTG CTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGGCGAGGGGCGGC GACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGG AGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGT CAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGA AAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAA ATATAAATTAACATATAGTATGGGCAAGCAGG GAGCTAGAACGATTTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTT AGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGA CAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAG AACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTC TATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACA CCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCA AAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGC AGCTGACACAGGACACAGCAATCAGGTCAGCCAA AATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGGCAAA TGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAAT GCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTTCA GCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTTCAGCATTATCA GAAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACACCATGC TAAACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCA AATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCA GGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAG AGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCT TGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTC AATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTG TCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTTGCTGA GGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACT CACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGA ATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAAC AGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTC ATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGATCTACAAATG GCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGG GGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGT

SEQ ID NO:	Характеристика(и)	Последовательность
		AGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAA TTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTC GGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTG GGGATCAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTA GGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGAGGATCTGCGATCG CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCG CCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCTG GCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGG GGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTC CGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATAT AAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCA ACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGCTGGGCTAGCG TTTAAACGGGCCCTCTAGAGCCGCCACCATGCTTC TCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCA CACCAGCATTCCTCCTGATCCCAGGCCCTGTGCC TCCCTCTACAGCCCTCAGGTACCTCATTGAGGAGC TGGTCAACATCACCCAGAACCAGAAGGCTCCGCT CTGCAATGGCAGCATGGTATGGAGCATCAACCTG ACAGCTGGCATGTACTGTGCAGCCCTGGAATCCCT GATCAACGTGTCAGGCTGCAGTGCCATCGAGAAG ACCCAGAGGATGCTGAGCGGATTCTGCCCCGACA AGGTCTCAGCTGGGCAGTTTTCCAGCTTGCATGTC CGAGACACCAAAATCGAGGTGGCCCAGTTTGTA AGGACCTGCTCTTACATTTAAAGAACTTTTTTCGC GAGGGACGGTTCAAGAATCTAAGTACCGGACCGC CCTGCCCCCCTTGCCCTGGCCAGCCTAGAGAACCC CAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCAGGAAGAGA TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAAT GGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACA AGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAG CTTCTTCCTGTACTCCCGGCTGACCGTGGACAAGA GCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTCAGCTGCAG CGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC CAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAGATGT TCTGGGTGCTGGTGGTGGTCGGAGGCGTGCTGGC CTGCTACAGCCTGCTGGTCACCGTGGCCTTCATCA TCTTTTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAACTCCT GTATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTAC AACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCG ATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACCTG CGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCTG CCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGA GCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGACGTC CTGGATAAGCGGAGAGGGCCGGGACCCTGAGATGG GCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCAAGGAAGG CCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCC GAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGC GGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCA

SEQ ID NO:	Характеристика(и)	Последовательность
		GGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGAC GCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAAGGCTCG AGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAAC ATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGG ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGA GTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCA AAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTAA AGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAAC ACTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTC CACATCCTGCCGGTGGCATTAGGGGTGACTCCTT CACACATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGAACTGG ATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTT TTTGCTGATTGAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACG GACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACG CGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTG CAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTA CGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGA TAATTTGAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAAT ACAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCG GTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGA AAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCAT GCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGG AGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAG CCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTT CTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACT CTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCT CAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGAC CAGACAACTGTATCCAGTGTGCCCCTACATTGAC GGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGAG TCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTA CGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATC CAAACCTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCT TGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCG TCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTT GCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCA TGTGAGCGGCCGCTCTAGACCCGGGCTGCAGGAA TTCGATATCAAGCTTATCGATAATCAACCTCTGGA TTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTA ACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCT GCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGT ATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGG TTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGT CAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTG ACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCAC CTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTCCCCCT CCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCCTGCC TTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGC ACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATC GTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTG

SEQ ID NO:	Характеристика(и)	Последовательность
		GATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTT CGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCCTCCCGCGGC CTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCG CCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGG CCGCCTCCCCGCATCGATAACCGTCGACTAGCCGTA CCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAG ATCTTAGCCACTTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACT GGAAGGGGCTAATTCACCTCCCAAAGAAGACAAGAT CTGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGAC CAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAG GGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCT TGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTG TGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTT AGTCAGTGTGGAATAATCTCTAGCAGAATTCGATA TCAAGCTTATCGATAACCGTCGACCTCGAGGGGGG GCCCGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGT GGTGGAAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGG CCACTCAAGTCTGGAGGGGCACGTAAAACCCGCT GATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCA TCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACC CTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATA AAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGG TGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGG ACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCA GGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCT ACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCGBA ATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGG AAGCCCTGCAAAGTAACTGGATGGCTTCTCAGCC GCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGCTCT GATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGA TTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGC CGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGG GCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCG TGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTT TTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGA ACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTG GCCACGACGGGCGTTCTTGCAGCTGTGCTCGA CGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTA TTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTAT CTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATG GCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCC GGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACAT CGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCG GTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCA TCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTGTTCGCCAGG CTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCG TCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATC ATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGA CTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCAGACCGCTATCAG

SEQ ID NO:	Характеристика(и)	Последовательность
		GACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAG AGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTG CTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCAT CGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAAT TATTAACGCTTACAATTCCTGATGCGGTATTTTCT CCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATAC AGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACC CCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATG TATCCGCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTT TTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAG ATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCG CGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCG CTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCT ACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCA GAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAG CCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC ACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTAC CAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTT ACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATA AGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTG CACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACC GAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAA GCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAG GTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAG CGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGT ATCTTTATAGTCCTGTTCGGGTTTCGCCACCTCTGA CTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGG GCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCC TTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCT CACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTG GATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATAC CGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAG TCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATAC GCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAT TAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGA AAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAG TTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACT TTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTG AGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATG ACCATGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCTCAC TAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTG GCGGCCTCGAGGTCGAGATCCGGTCGACCAGCAA CCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCC CTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCA TGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCG AGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTA GTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCA AAAAGCTTCGACGGTATCGATTGGCTCATGTCCAA CATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGT

SEQ ID NO:	Характеристика(и)	Последовательность
		TATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCA TAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTA CGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGA CCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTC CCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGT CAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTT GGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACG CCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGC CTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACT TTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC GCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACAT CAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGA TTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAG TTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAA AATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAAT GGGCGGTAGGCGTGTACGGAATTCGGAGTGGCGA GCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTG CCTGTACTGGGTCTCTCTG
SEQ ID NO: 14	DHFRdm	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDFWPPLRNESRYF QRMTTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGR INLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELAN KVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQD FESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYK FEVYEKND
SEQ ID NO: 15	DHFRdm	ATGGTTGGTTCGCTAAACTGCATCGTCGCTGTGTC CCAGAACATGGGCATCGGCAAGAACGGGGACTTC CCCTGGCCACCGCTCAGGAATGAATCCAGATATTT CCAGAGAATGACCACAACCTCTTCAGTAGAAGGT AAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAAAGAAGACCT GGTTCTCCATTCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAG GGTAGAATTAATTTAGTTCTCAGCAGAGAACTCA AGGAACCTCCACAAGGAGCTCATTTTCTTTCCAGA AGTCTAGATGATGCCTTAAAACTTACTGAACAACC AGAATTAGCAAATAAAGTAGACATGGTCTGGATA GTTGGTGGCAGTTCTGTTTATAAGGAAGCCATGAA TCACCCAGGCCATCTTAAACTATTTGTGACAAGGA TCATGCAAGACTTTGAAAGTGACACGTTTTTTCCA GAAATTGATTTGGAGAAATATAAACTTCTGCCAG AATACCCAGGTGTTCTCTCTGATGTCCAGGAGGAG AAAGGCATTAAGTACAAATTTGAAGTATATGAGA AGAATGATTAA
SEQ ID NO: 16	IL-13-дзетакин	ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGA GTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCAGGCC CTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTCAGGTACCTCATT GAGGAGCTGGTCAACATCACCCAGAACCAGAAGG CTCCGCTCTGCAATGGCAGCATGGTATGGAGCATC AACCTGACAGCTGGCATGTACTGTGCAGCCCTGG AATCCCTGATCAACGTGTCAGGCTGCAGTGCCATC

SEQ ID NO:	Характеристика(и)	Последовательность
		GAGAAGACCCAGAGGATGCTGAGCGGATTCTGCC CGCACAAGGTCTCAGCTGGGCAGTTTTCCAGCTTG CATGTCCGAGACACCAAAATCGAGGTGGCCCACT TTGTAAAGGACCTGCTCTTACATTTAAAGAACTT TTTCGCGAGGGACGGTTCAAG
SEQ ID NO: 17	IL-13-дзетакин	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPGPVPPSTALRYLIEEL VNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLIN VSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKI EVAQFVKDLLLHLKCLFREGRFK
SEQ ID NO: 18	CD28tm	MFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV
SEQ ID NO: 19	Лидерная последовательность GMCSFss	ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGA GTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCA
SEQ ID NO: 20	CD28tm	ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTCGGAGGCGTGCT GGCCTGCTACAGCCTGCTGGTCACCGTGGCCTTCA TCATCTTTTGGGTG
SEQ ID NO: 21	41-BB	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCA AACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCA AGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAA GAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG
SEQ ID NO: 22	CD3ζ	CGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCCTG CCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGA GCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGACGTC CTGGATAAGCGGAGAGGGCCGGGACCCTGAGATGG GCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGG CCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCC GAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGC GGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCA GGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGAC GCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAAGG
SEQ ID NO: 23	T2A	CTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTC TAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCC TAGG
SEQ ID NO: 24	EGFRt	CGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAAT TTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATATT AAACACTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGGCG ATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGAC TCCTTCACACATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGA ACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACA GGGTTTTTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAG GACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAGAAATC ATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTT CTCTTGCAAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTG GGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAG ATGTGATAATTTCAAGGAAACAAAATTTGTGCTAT

SEQ ID NO:	Характеристика(и)	Последовательность
		GCAAATACAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGA CCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAACAG AGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTC TGCCATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGG CCCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAAT GTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCA ACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGA GAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGC CTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGAC GGGGACCAGACAACCTGTATCCAGTGTGCCCACTA CATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCCG GCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCT GGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCACCT GTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCACTGGG CCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTA AGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGC CCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCG GCCTCTTCATG
SEQ ID NO: 25	Спейсер S	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCCTTGCCC T
SEQ ID NO: 26	Спейсер M	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCCTTGCCC TGGCCAGCCTAGAGAACCCAGGTGTACACCCTG CCTCCCAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG TGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCC AGCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCC AGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGT GCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCC GGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGG CAACGTCTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCC CTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCC TGAGCCTGGGCAAG
SEQ ID NO: 27	Спейсер L	ATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCCTTGCCCTG CCCCCGAGTTCGACGGCGGACCCAGCGTGTTCTG TTCCCCCACAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA GCCGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGG CGTGAGCCAGGAAGATCCCGAGGTCCAGTTCAAT TGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCAACAACGCCA AGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCCAGAGCAC CTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACC AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATAACAAGTGCAA GGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAA AAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCG AGCCCCAGGTGTACACCCTGCCTCCCTCCCAGGAA GAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCC TGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAA CTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACAGCGAC GGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGG

SEQ ID NO:	Характеристика(и)	Последовательность
		CAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTAGC TGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT ACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAA G

[0120] Термин «содержащий» в настоящем документе является синонимом терминов «включающий», «содержащий» или «характеризующийся» и является включительным или открытым и не исключает дополнительных, не перечисленных элементов или стадий способа.

[0121] В приведенном выше описании раскрыто несколько способов и средств согласно настоящему изобретению. Данное изобретение допускает модификации методов и материалов, а также изменения способов изготовления и оборудования. Такие модификации будут очевидны специалистам в данной области техники после прочтения данного описания или практического осуществления изобретения, раскрытого в настоящем документе. Следовательно, предполагается, что данное изобретение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в настоящем документе, но охватывает все модификации и альтернативные варианты, входящие в истинный объем и сущность изобретения.

[0122] Все цитируемые в настоящем документе источники, включая, не ограничиваясь перечисленным, опубликованные и неопубликованные заявки, патенты и литературные ссылки, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки и, таким образом, являются частью данного описания. В той степени, в которой публикации и патенты или патентные заявки, включенные посредством ссылки, противоречат раскрытию, содержащемуся в описании, данное описание заменяет и/или имеет преимущественную силу над любым таким противоречащим материалом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нуклеиновая кислота, кодирующая прикрепленный к мембране направленный мутеином IL-13 дзетакиновый рецептор, содержащий:
внеклеточный домен, содержащий мутеин IL-13 и спейсер;
трансмембранный домен; и
внутриклеточную сигнальную область,
где указанный спейсер расположен между указанным мутеином и указанным трансмембранным доменом.

2. Нуклеиновая кислота по п. 1, где мутеин IL-13 содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16.

3. Нуклеиновая кислота по п. 1 или п. 2, где мутеин IL-13 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

4. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-3, где спейсер представляет собой пептидный спейсер.

5. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-4, где спейсер содержит, состоит из или по существу состоит из спейсера из шарнира IgG4 (S), спейсера из шарнира IgG4-CH3 (M) или спейсера из шарнира IgG4-CH2-CH3 (L).

6. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-5, где спейсер содержит, состоит из или по существу состоит из спейсера из шарнира IgG4-CH3 (M).

7. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-6, где спейсер содержит, состоит из или по существу состоит из спейсера из шарнира IgG4-CH2-CH3 (L).

8. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-7, где спейсер содержит, состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

9. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-8, где спейсер содержит, состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

10. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-9, где спейсер содержит, состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11.

11. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-10, где спейсер содержит, состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11.

12. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-11, где трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD28 (CD28tm).

13. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-12, где внутриклеточный сигнальный домен содержит весь или часть домена CD3-дзета в комбинации с костимулирующим доменом, выбранным из группы, состоящей из CD27, CD28, 4-1BB, OX-40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, NKG2C и B7-H3, или их комбинации.
14. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-13, где внутриклеточная сигнальная область содержит сигнальную функциональную часть домена CD3-дзета и костимулирующую функциональную часть домена 4-1BB.
15. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-14, дополнительно содержащая последовательность, кодирующую маркер.
16. Нуклеиновая кислота по п. 15, где маркер содержит усеченную форму рецептора клеточной поверхности, необязательно EGFRt.
17. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-16, дополнительно содержащая трансген дигидрофолатредуктазы, обеспечивающий возможность селекции метотрексатом.
18. Нуклеиновая кислота по п. 17, где трансген дигидрофолатредуктазы представляет собой двойной мутант дигидрофолатредуктазы (DHFRdm).
19. Нуклеиновая кислота по п. 17 или п. 18, где двойной мутант дигидрофолатредуктазы содержит аминокислотные мутации L22F и F31S.
20. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-19, дополнительно содержащая последовательность, кодирующую последовательность рибосомного проскока.
21. Нуклеиновая кислота по п. 20, где последовательность рибосомного проскока содержит P2A или T2A.
22. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-21.
23. Вектор экспрессии по п. 22, где вектор представляет собой вирусный вектор.
24. Вектор экспрессии по п. 22 или п. 23, где вектор представляет собой лентивирусный или аденовирусный вектор.
25. Полипептид химерного рецептора, кодируемый нуклеиновой кислотой по любому из пп. 1-21.
26. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-21.
27. Клетка-хозяин по п. 26, где клетка-хозяин представляет собой Т-клетку или предшественника Т-клетки.
28. Клетка-хозяин по п. 26 или п. 27, где клетка-хозяин представляет собой цитотоксический CD8⁺ Т-лимфоцит, выбранный из группы, состоящей из наивных CD8⁺ Т-клеток, CD8⁺ центральных Т-клеток памяти, CD8⁺ эффекторных Т-клеток памяти и общей популяции CD8⁺ Т-клеток.

29. Клетка-хозяин по п. 28, где цитотоксический CD8+ Т-лимфоцит представляет собой центральную Т-клетку памяти, и при этом указанная центральная Т-клетка памяти является положительной в отношении CD45RO+, CD62L+ и CD8+.

30. Клетка-хозяин по п. 26 или п. 27, где клетка-хозяин представляет собой CD4+ Т-хелперный лимфоцит, выбранный из группы, состоящей из наивных CD4+ Т-клеток, CD4+ центральных Т-клеток памяти, CD4+ эффекторных Т-клеток памяти и общей популяции CD4+ Т-клеток.

31. Клетка-хозяин по п. 30, где CD4+ хелперный лимфоцит представляет собой наивную CD4+ Т-клетку, и при этом указанная наивная CD4+ Т-клетка является положительной в отношении CD45RA+, CD62L+ и CD4+, и отрицательной в отношении CD45RO.

32. Клетка-хозяин по любому из пп. 26-31, где клетка-хозяин представляет собой Т-клетку-предшественника.

33. Клетка-хозяин по любому из пп. 26-32, где клетка-хозяин представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку.

34. Композиция, содержащая клетку-хозяина по любому из пп. 26-32 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

35. Способ получения клетки-хозяина по любому из пп. 26-32, включающий:
введение нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-21 в лимфоцит;
культивирование указанного лимфоцита в присутствии антител к CD3 и/или к CD28 и по меньшей мере одного гомеостатического цитокина; и
отбор лимфоцита с помощью реагента для селекции, где указанный реагент для селекции обеспечивает возможность селективного обогащения клетками, трансдуцированными указанной нуклеиновой кислотой или вектором.

36. Способ получения клетки-хозяина, включающий:
введение нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-21 в лимфоцит;
культивирование указанного лимфоцита в присутствии антител к CD3 и/или к CD28 и по меньшей мере одного гомеостатического цитокина; и
отбор лимфоцита с помощью реагента для селекции, где указанный реагент для селекции обеспечивает возможность селективного обогащения клетками, трансдуцированными указанной нуклеиновой кислотой или вектором.

37. Способ по п. 35 или 36, где реагент для селекции представляет собой метотрексат.

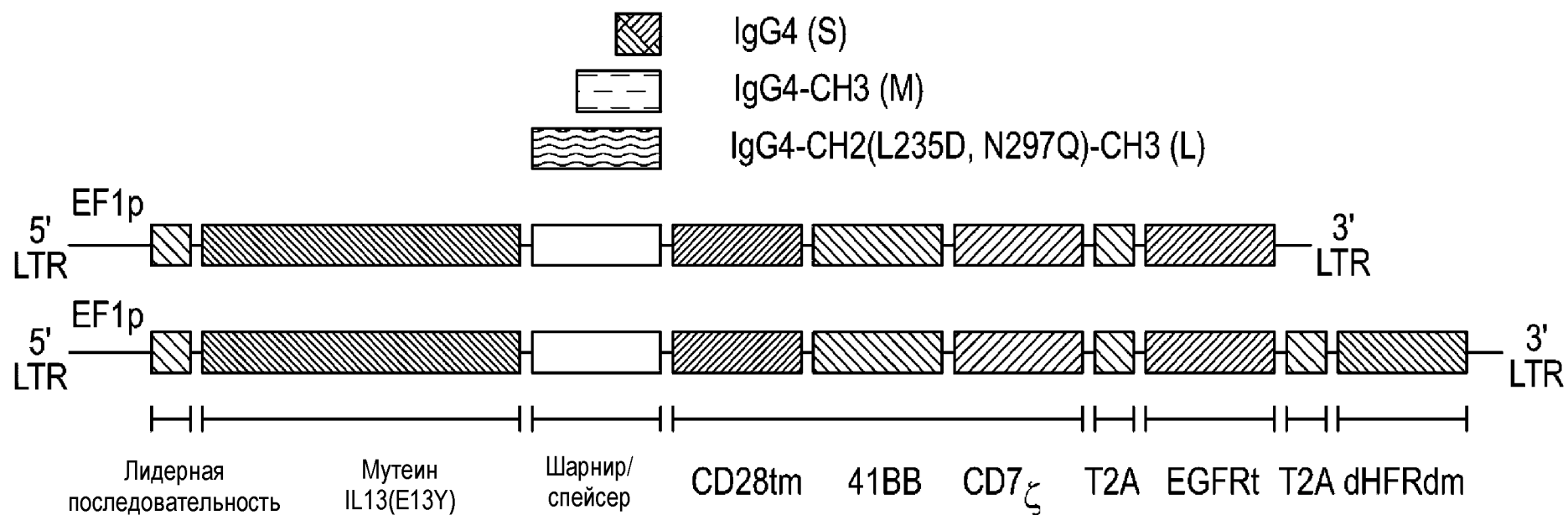
38. Способ по любому из пп. 35-37, где лимфоцит имеет фенотип CD45RA-, CD45RO+ и CD62L+.

39. Способ по любому из пп. 35-38, где лимфоцит является CD8⁺ или CD4⁺.
40. Способ по любому из пп. 35-39, где цитокин представляет собой IL-15, IL-7 и/или IL-21.
41. Способ по любому из пп. 35-40, дополнительно включающий введение второй нуклеиновой кислоты в указанную клетку-хозяина, где указанная вторая нуклеиновая кислота кодирует маркерный белок.
42. Способ по п. 41, где маркерный белок представляет собой EGFRt.
43. Клетка-хозяин по любому из пп. 26-32 для применения в лекарственном средстве или для применения при лечении или ингибировании рака или солидной опухоли, экспрессирующих рецептор IL-13 α 2 (IL-13Ra2).
44. Применение по п. 43, где рак представляет собой рак головного мозга.
45. Применение по п. 43 или п. 44, где рак представляет собой IL-13Ra-положительное злокачественное новообразование.
46. Применение по любому из пп. 43-45, где рак представляет собой глиобластому.
47. Применение по любому из пп. 43-46, где рак представляет собой мультиформную глиобластому (GBM).
48. Способ лечения, ингибирования или ослабления рака у субъекта, включающий введение клетки-хозяина по любому из пп. 26-32 указанному нуждающемуся в этом субъекту.
49. Способ по п. 48, где рак представляет собой IL13Ra-положительное злокачественное новообразование.
50. Способ по п. 48 или п. 49, где рак представляет собой рак головного мозга.
51. Способ по любому из пп. 48-50, где рак представляет собой глиому или глиобластому.
52. Способ по любому из пп. 48-51, где рак представляет собой глиому.
53. Способ по любому из пп. 48-51, где рак представляет собой мультиформную глиобластому (GBM).
54. Способ по любому из пп. 48-53, дополнительно включающий введение дополнительной терапии, выбранной из химиотерапии и лучевой терапии.
55. Способ по п. 54, где химиотерапевтическое средство включает электрохимиотерапию, алкилирующий агент, антиметаболит (например, 5-фторурацил (5-FU), 6-меркаптопурин (6-MP), капецитабин (Xeloda®), кладрибин, клофарабин, цитарабин (Ara-C®), флоксуридин, флударабин, гемцитабин (Gemzar®), гидроксимочевину, метотрексат, пеметрексед (Alimta®), пентостатин и тиогуанин), противоопухолевый

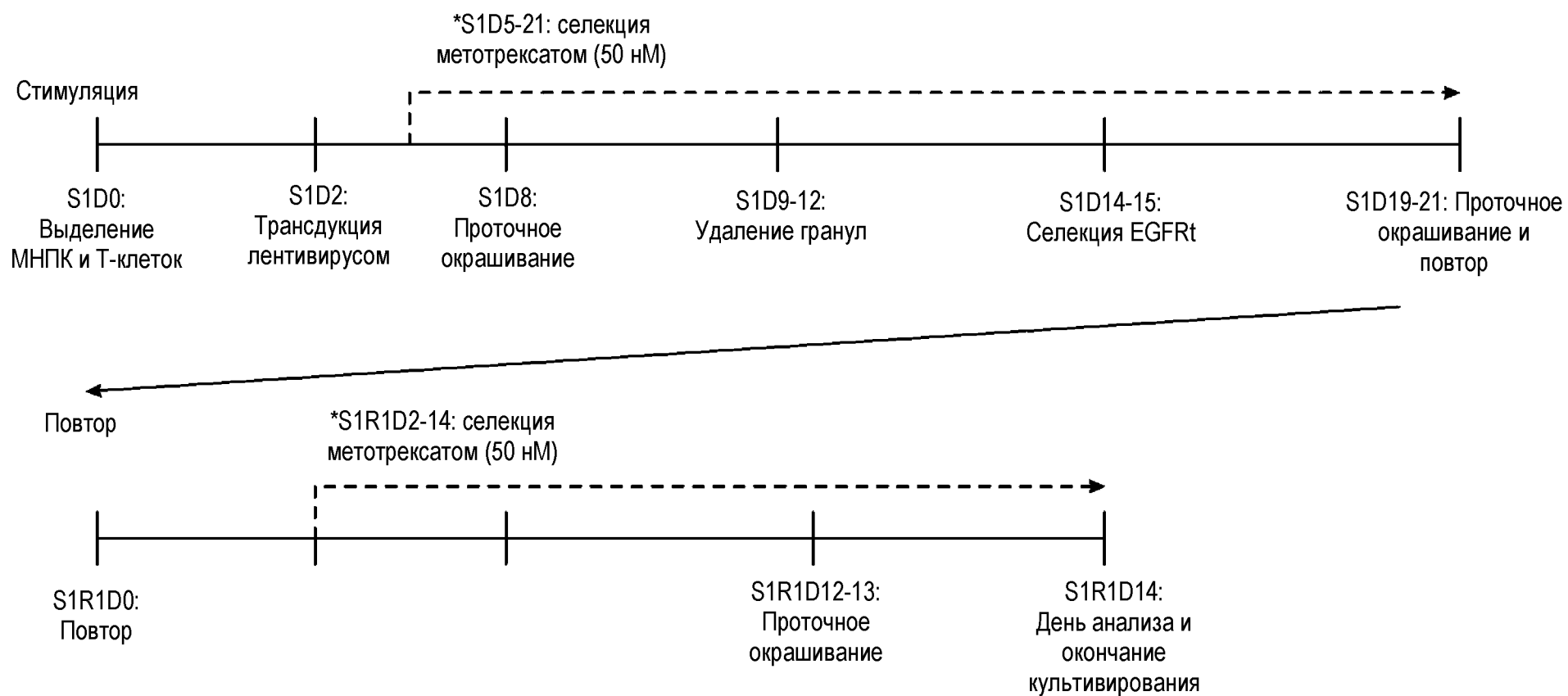
антибиотик, ингибитор топоизомеразы, ингибитор митоза, кортикостероид, интеркалирующий ДНК агент или ингибитор контрольной точки (киназа контрольной точки CHK1, CHK2).

56. Способ по любому из пп. 48-55, где субъект представляет собой млекопитающее.

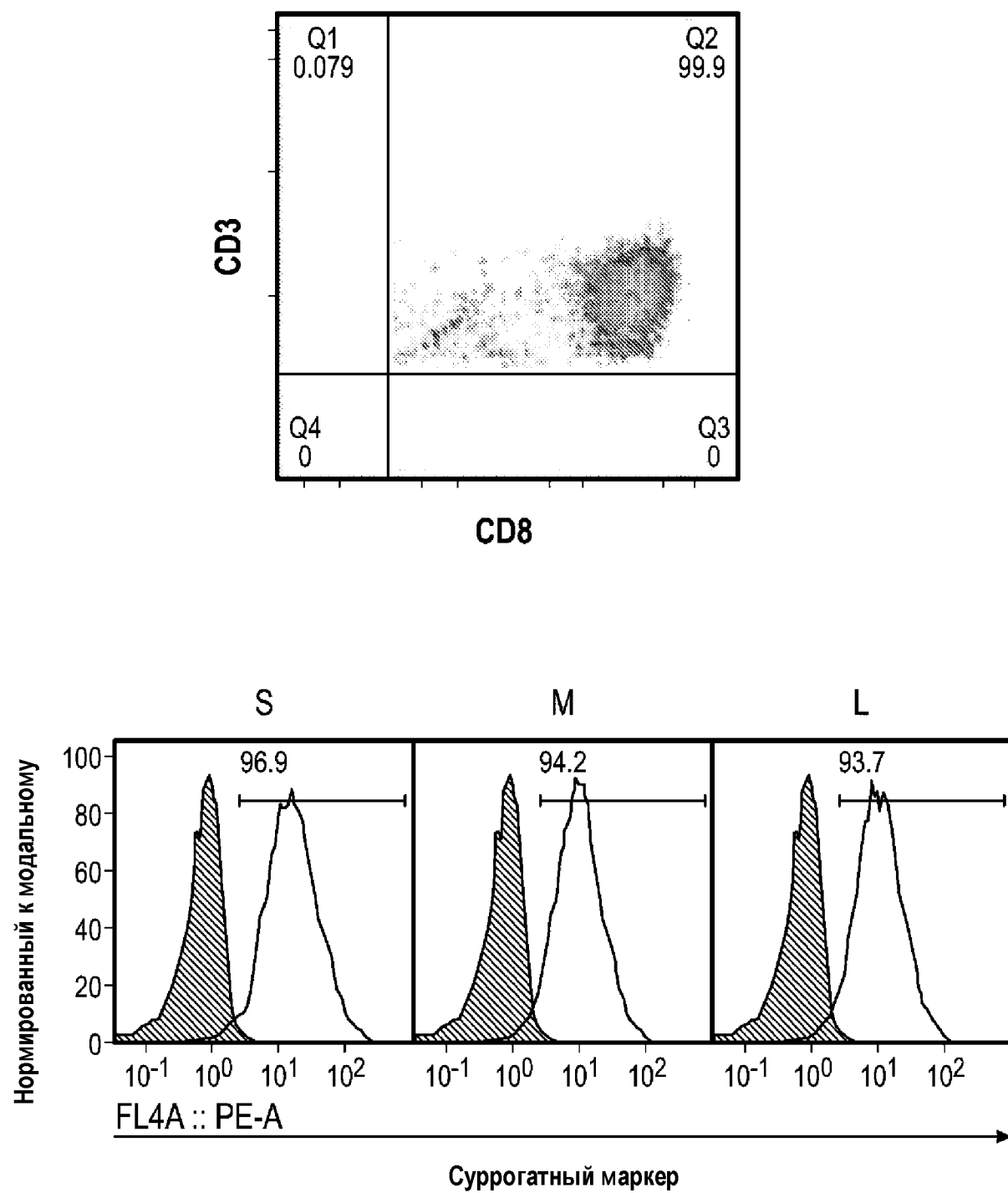
57. Способ по любому из пп. 48-56, где субъект представляет собой человека.



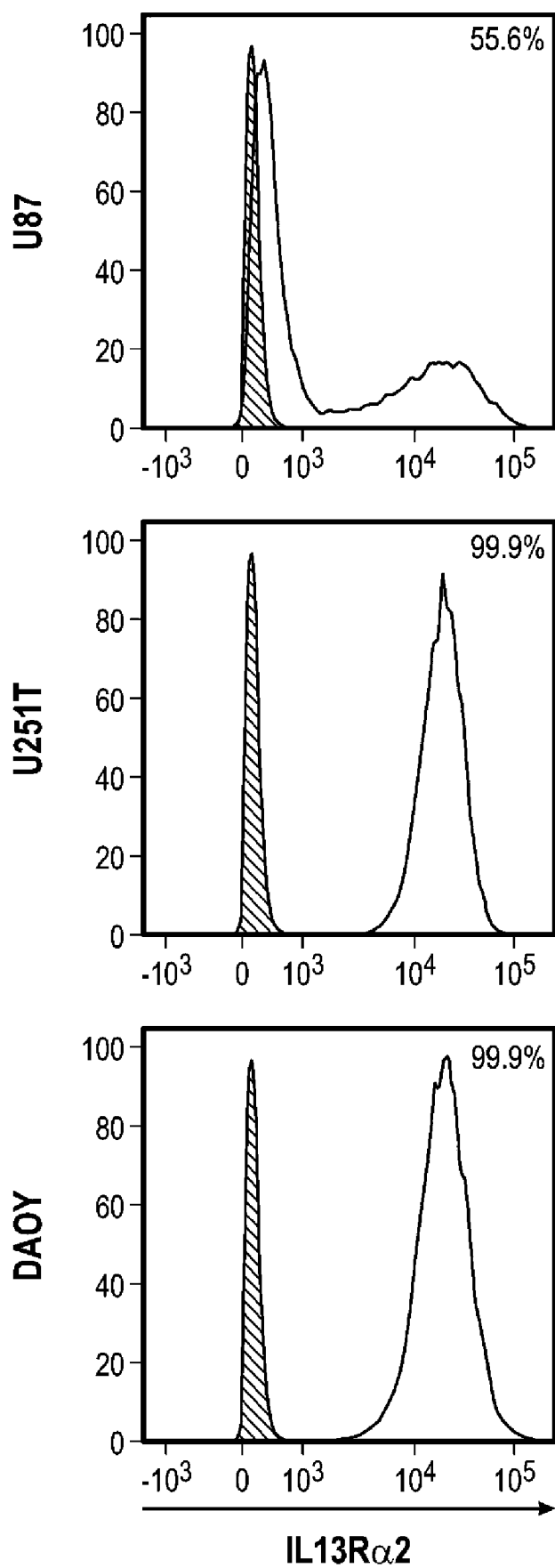
ФИГ. 1



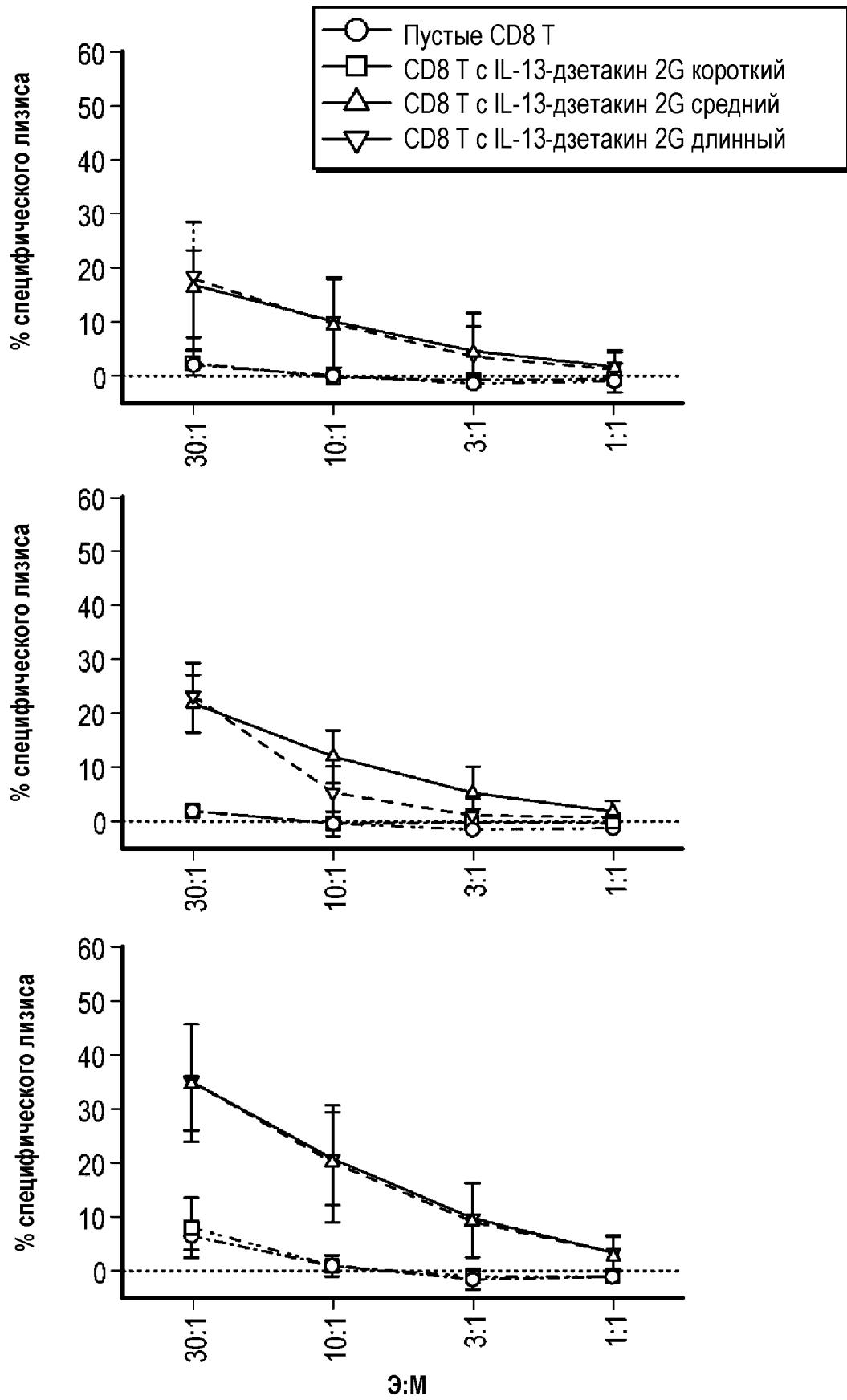
ФИГ. 2А

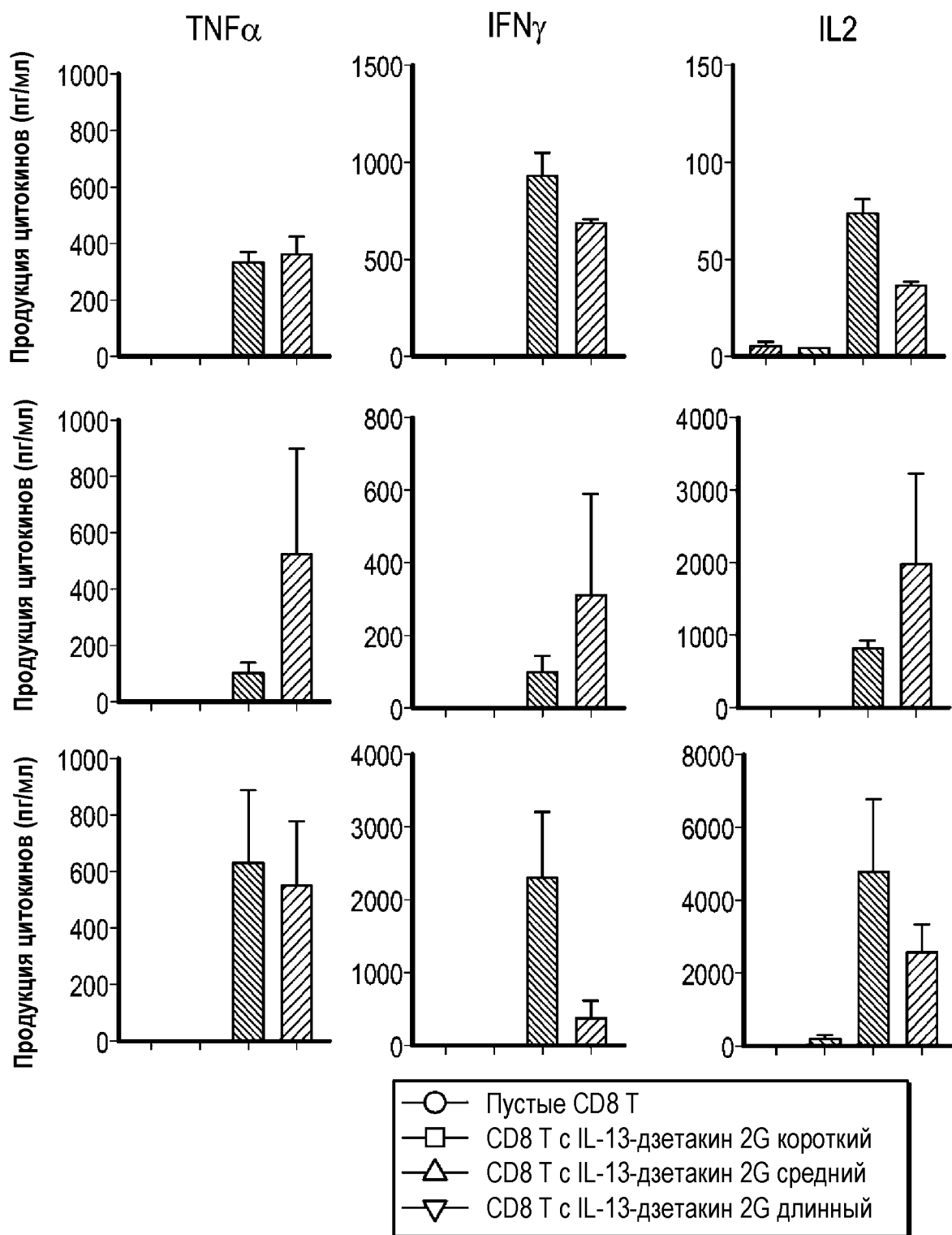


ФИГ. 2В

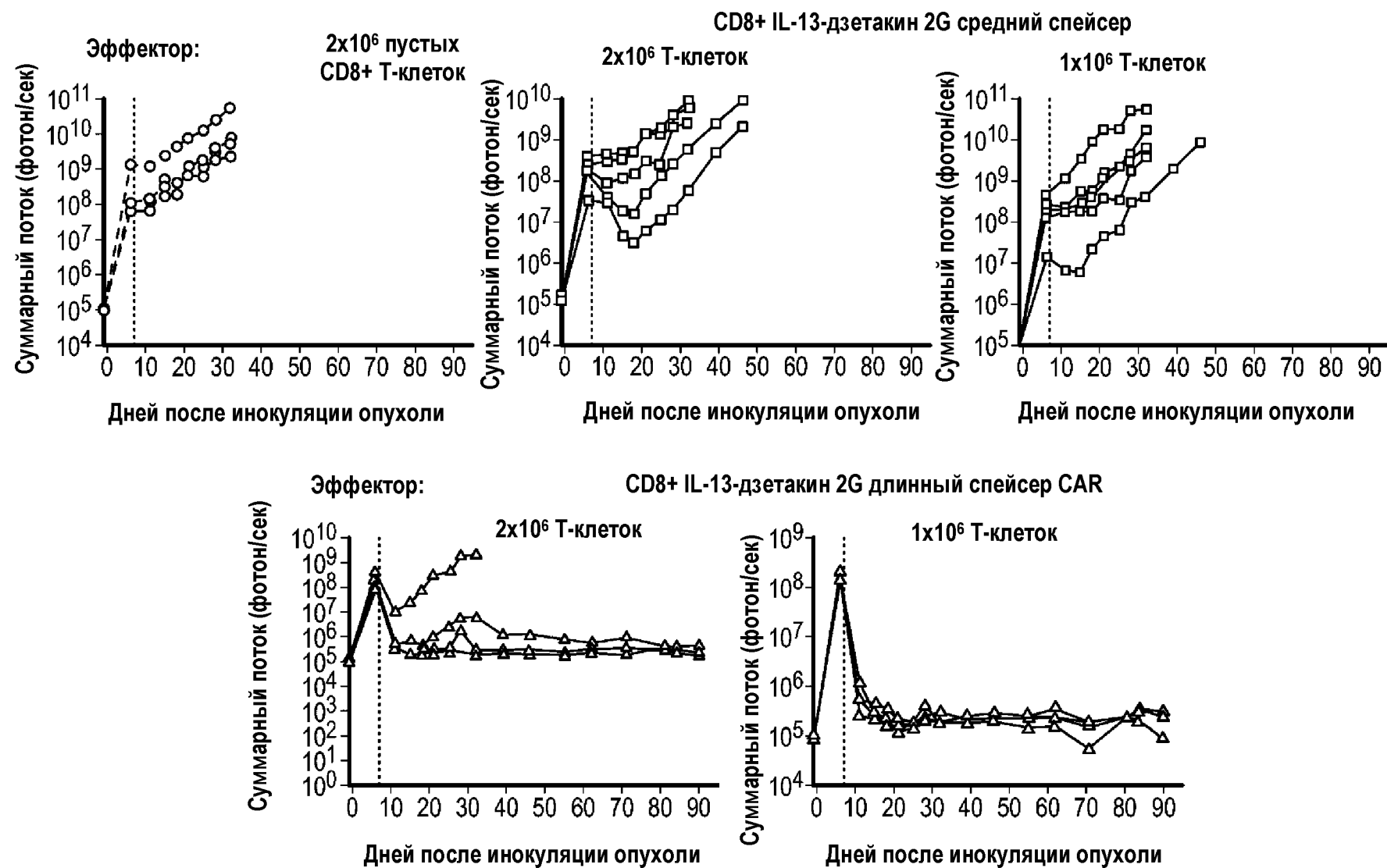


ФИГ. 3А

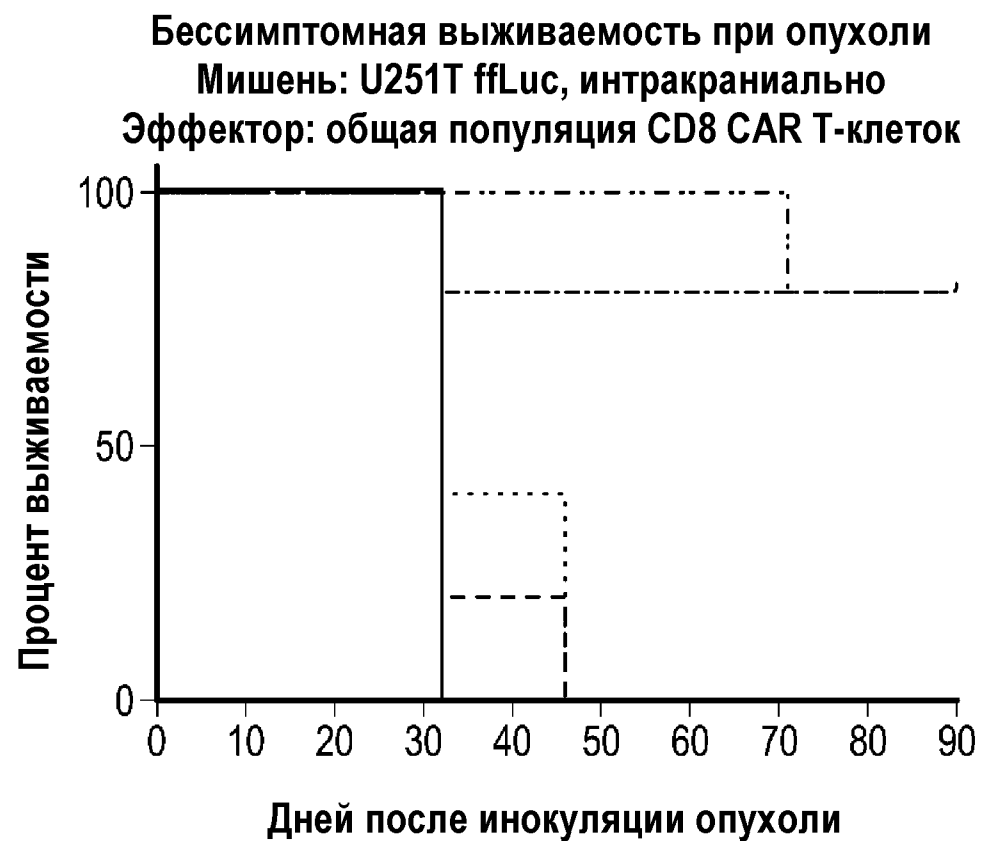




ФИГ. 3С



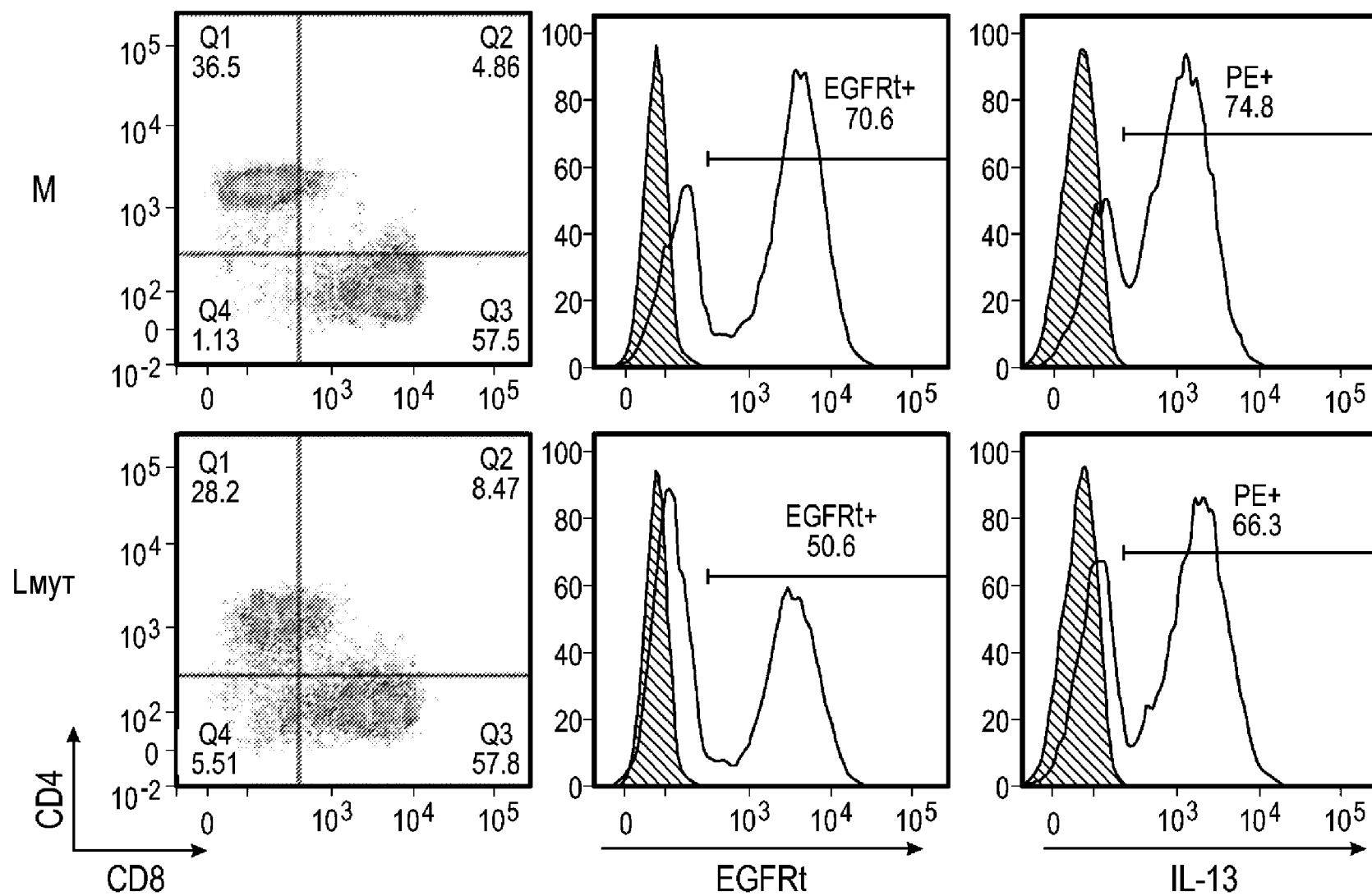
ФИГ. 4А



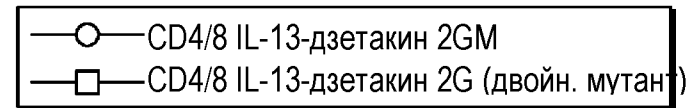
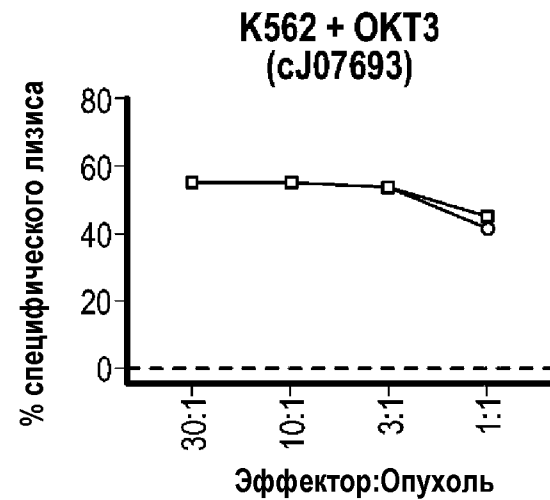
ФИГ. 4В



ФИГ. 5А



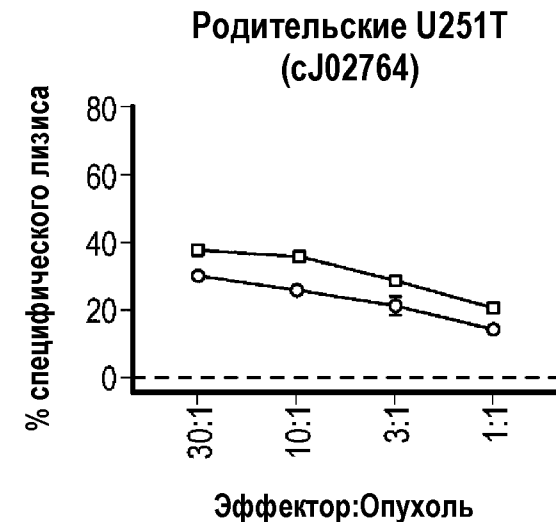
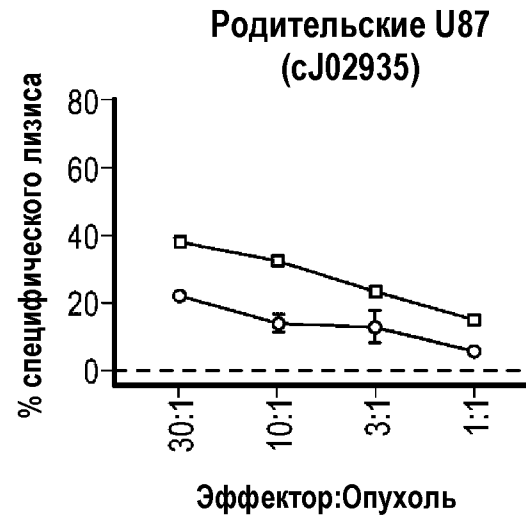
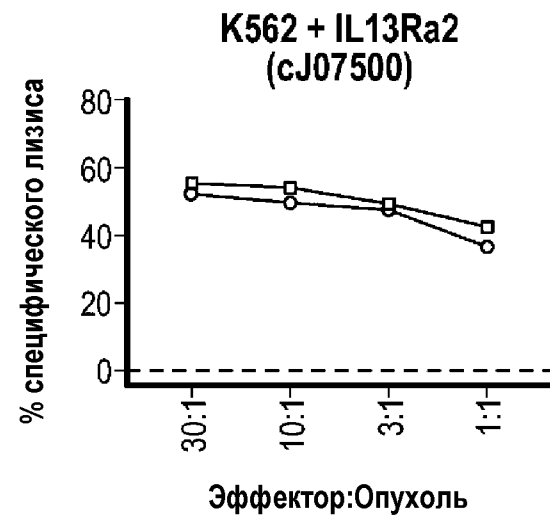
ФИГ. 5В



Линия клеток	% IL13Ra2+
K562 + IL13Ra2	99.10%
U251T	100.0%
U87	55.6%

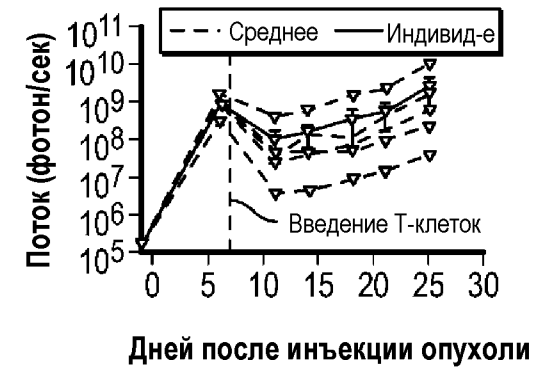
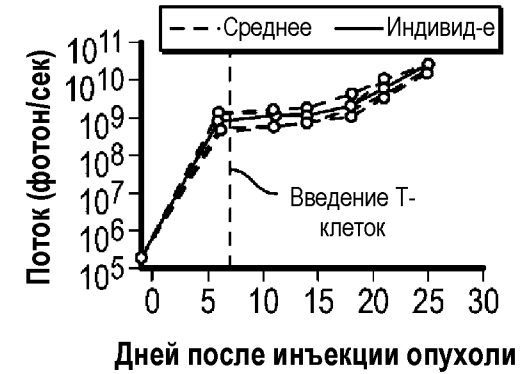
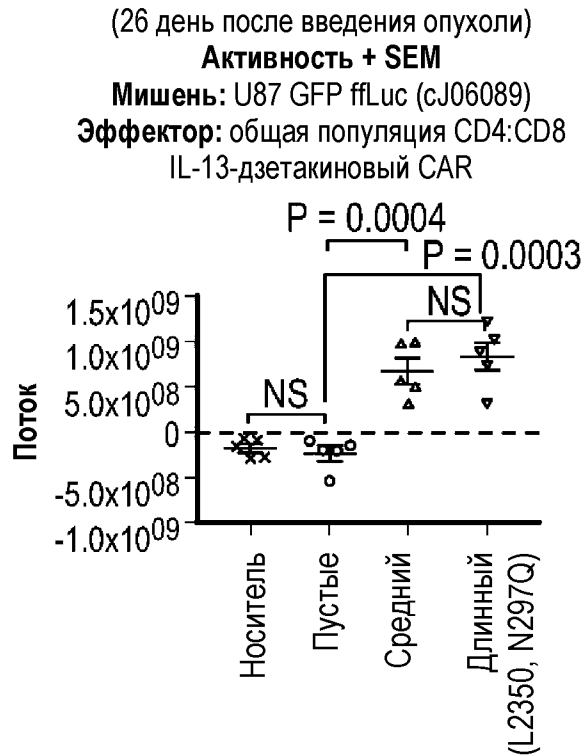
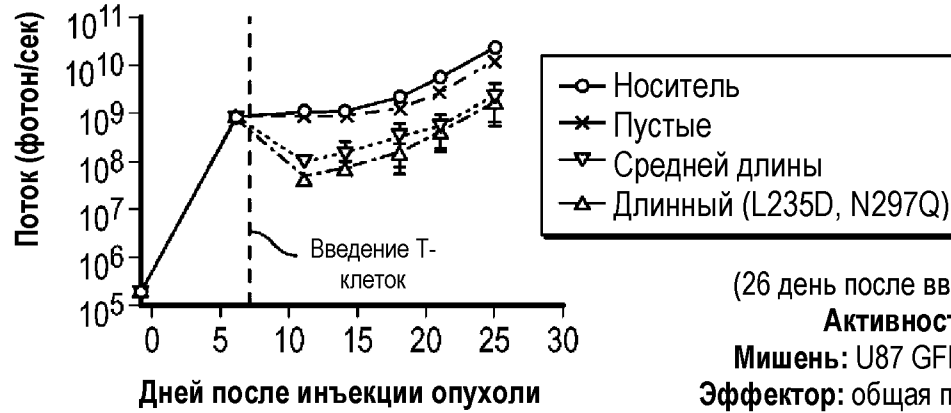
Линия клеток	CD4 от общего	CD8 от общего	EGFRt от общего
2GM	36.5%	57.5%	83.5%
2GL (дв. мут)	28.2%	57.8%	64.2%

Число эффекторных клеток увеличено, чтобы оно составляло 100% клеток EGFRt

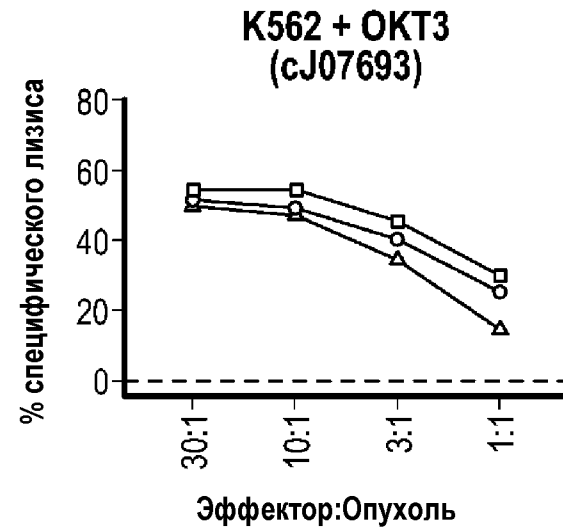


ФИГ. 6

Среднее прогрессирование опухоли + SEM
Мишень: U87 GFP ffLuc (сJ06289)
Эффектор: общая популяция пустых CD4:CD8, IL-13-дзетакиновый CAR



ФИГ. 7



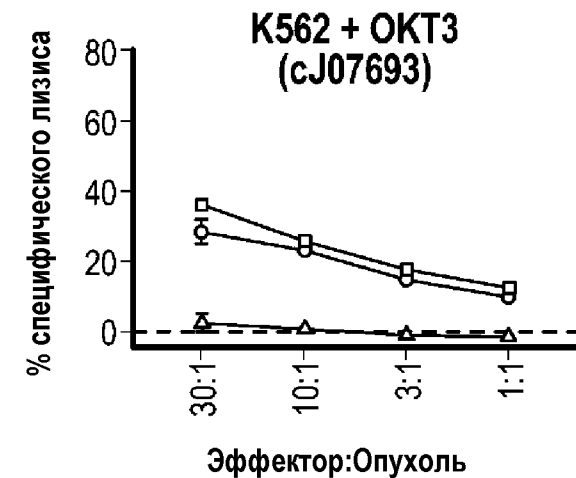
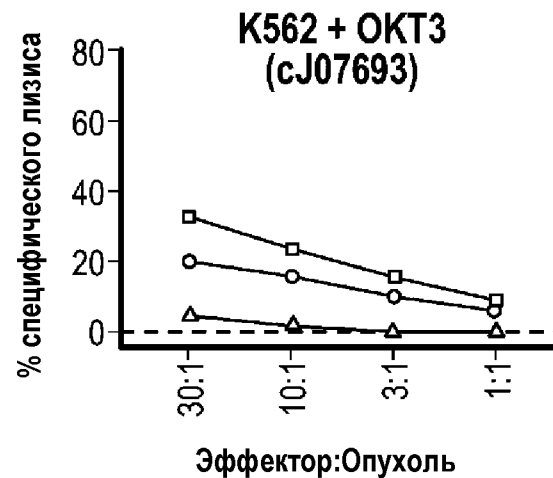
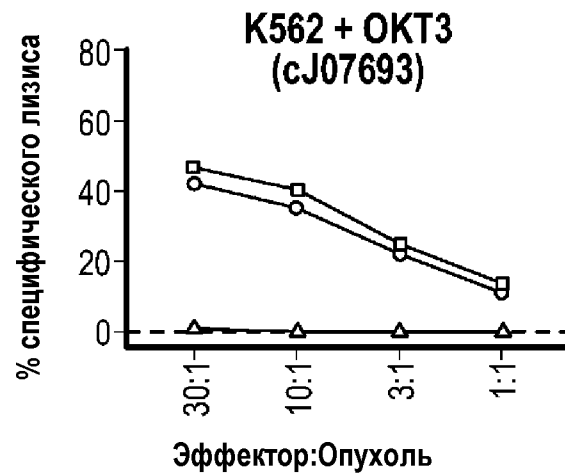
S1R1D14

—△—	Пустые
—○—	CD4/8 IL-13-дзетакин 2GM
—□—	CD4/8 IL-13-дзетакин 2G (двойн. мутант)

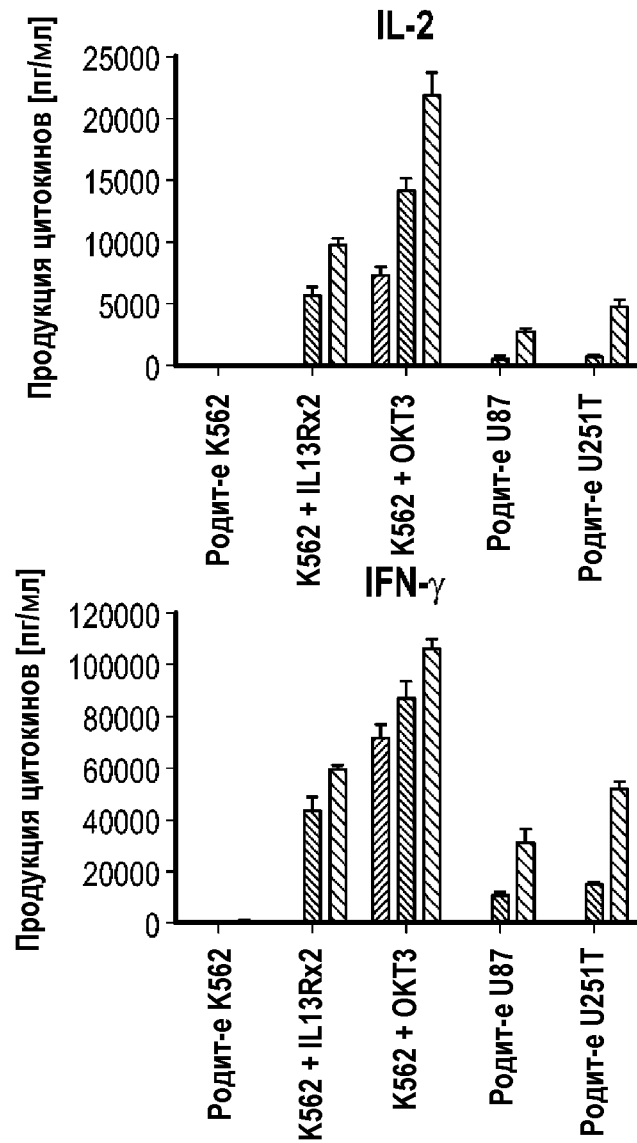
Линия клеток	% IL13Ra2+
K562 + IL13Ra2	99.10%
U251T	100.0%
U87	55.6%

Линия клеток	CD4 от общего	CD8 от общего	EGFRt от общего
Пустые	13.5%	58.9%	0.54%
2GM	32.5%	62.3%	82.5%
2GL (дв. мут)	36.7%	56.6%	57.9%

Число эффе́кторных клеток увеличено, чтобы оно составляло 100% клеток EGFRt



ФИГ. 8

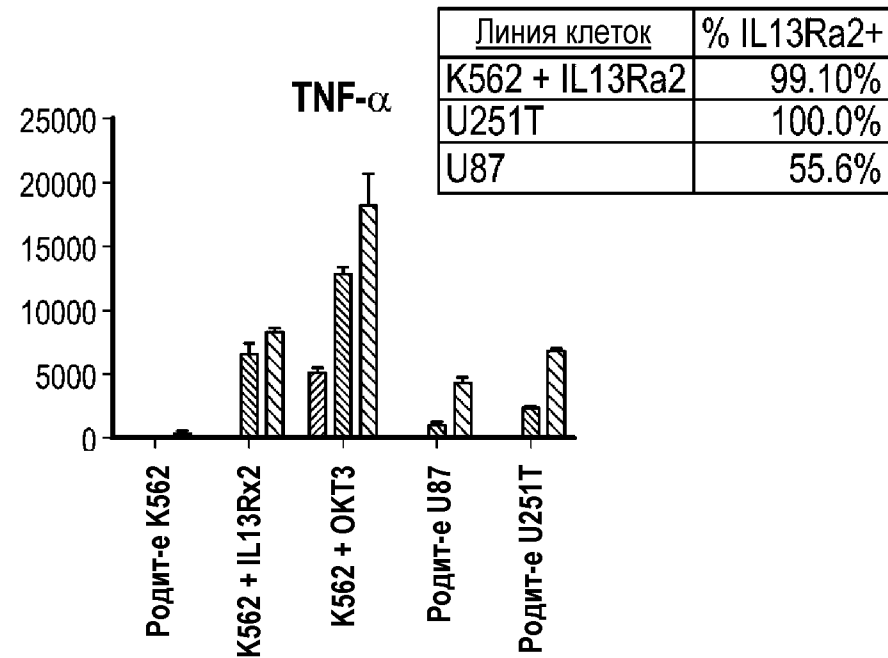


S1R1C14

	Пустые CD4/8
	CD4/8 IL-13-дзетакин 2GM
	CD4/8 IL-13-дзетакин 2G (дв. мут.)

Линия клеток	CD4 от общего	CD8 от общего	EGFRt от общего
Пустые	13.5%	58.9%	0.54%
2GM	32.5%	62.3%	82.5%
2GL (дв. мут)	36.7%	56.6%	57.9%

Число эффекторных клеток увеличено, чтобы оно составляло 100% клеток EGFRt



ФИГ. 9