

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202191266 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.08.10

(22) Дата подачи заявки
2019.11.07

(51) Int. Cl. C07K 16/40 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C07K 14/725 (2006.01)

(54) ПРОТИВОРАКОВАЯ ТЕРАПИЯ НА ОСНОВЕ ИММУНОЦИТОВ, СВЯЗЫВАЮЩИХ
РТК7

(31) 62/756,638; 62/910,586

(32) 2018.11.07; 2019.10.04

(33) US

(86) PCT/IB2019/059585

(87) WO 2020/095248 2020.05.14

(71) Заявитель:
КРИСПР ТЕРАПЬЮТИКС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Терретт Джонатан Александр,
Сэйджерт Джейсон (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе, в некоторых вариантах осуществления, предусмотрены способы и композиции (например, композиции на основе клеток) для лечения рака, такого как РТК7⁺ злокачественные новообразования.

202191266

A1

A1

202191266

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-568463EA/045

ПРОТИВОРАКОВАЯ ТЕРАПИЯ НА ОСНОВЕ ИММУНОЦИТОВ, СВЯЗЫВАЮЩИХ РТК7

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/756638, поданной 7 ноября 2018 года, и предварительной заявки на патент США № 62/910586, поданной 4 октября 2019 года, раскрытия которых тем самым включены посредством ссылки в полном объеме.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ МАТЕРИАЛА, ПОДАННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0002] Перечень последовательностей, который является частью настоящего изобретения, подан одновременно с описанием в виде текстового файла. Текстовый файл, содержащий перечень последовательностей, имеет название "CT111_Seqlisting.txt", который был создан 7 ноября 2019 года, и имеет размер 119776 байт. Объект перечня последовательностей включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] В терапии на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR) применяют генетически модифицированные Т-клетки для более специфичного и эффективного нацеливания и уничтожения раковых клеток. После сбора Т-клеток из крови, клетки конструируют так, чтобы они предусматривали CAR на поверхности. CAR можно вводить в Т-клетки с использованием технологии редактирования генов CRISPR/Cas9. Когда эти аллогенные Т-клетки с CAR вводят путем инъекции пациенту, рецепторы позволяют Т-клеткам уничтожать раковые клетки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[0004] До стадии клинических испытаний уже дошло множество ассоциированных с опухолью антигенных мишеней, выбранных преимущественно с помощью той логики, что для того, чтобы избежать токсичности, экспрессия в раковых тканях должна быть селективной в сравнении с нормальными тканями (Morgan, R. Blood 2013; 122(2): 3392-3394). РТК7, тем не менее, не отвечает таким критериям из-за ее очевидной избыточной экспрессии в нормальных тканях, в том числе в легких, гладкой мускулатуре, желудке, почках и мочевом пузыре. Поэтому РТК7 не считается пригодной целью для Т-клеток с CAR. Тем не менее, из представленных в данном документе данных неожиданно видно, что животные на самом деле действительно переносят терапию Т-клетками с CAR к РТК7, и эти Т-клетки с CAR к РТК7 эффективно и селективно уничтожают клетки, экспрессирующие РТК7.

[0005] В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрена сконструированная Т-клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), при этом CAR содержит эктодомен, который специфически связывается с РТК7. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка

дополнительно содержит нарушенный ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC). Например, ген TRAC может быть нарушен в результате вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка дополнительно содержит нарушенный ген бета-2-микроглобулина ($\beta 2M$).

[0006] Эктодомен CAR, в некоторых вариантах осуществления, предусматривает антитело к PTK7. В некоторых вариантах осуществления антитело к PTK7 представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) к PTK7. ScFv к PTK7, в некоторых вариантах осуществления, содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 54, 68, 75 или 82. В некоторых вариантах осуществления scFv к PTK7 содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 55, 69, 76 или 83, и/или VL, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 56, 70, 77 или 84. В некоторых вариантах осуществления scFv к PTK7 содержит VH, содержащую аминокислотные последовательности CDR под SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 и/или SEQ ID NO: 59; и/или scFv к PTK7 содержит последовательность VL, содержащую аминокислотные последовательности CDR под SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61 и/или SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления scFv к PTK7 содержит VH, содержащую аминокислотные последовательности CDR под SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 и/или SEQ ID NO: 87; и/или scFv к PTK7 содержит последовательность VL, содержащую аминокислотные последовательности CDR под SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 и/или SEQ ID NO: 90.

[0007] CAR, в некоторых вариантах осуществления, содержит цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления CAR содержит костимулирующий домен CD28 или костимулирующий домен 41BB.

[0008] В некоторых вариантах осуществления ген TRAC содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую левое плечо гомологии (LHA) и/или правое плечо гомологии (RHA) в пределах любой из последовательностей под SEQ ID NO: 63, 64, 71, 78 или 91, или нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 92 или 100, и/или при этом CAR кодируется нуклеотидной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 49, 51, 65, 72, 79 или 112. В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген $\beta 2M$ содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из любой под SEQ ID NO: 9-14.

[0009] Также в данном документе, в некоторых аспектах, предусмотрена сконструированная Т-клетка, содержащая (i) нарушенный ген TRAC; (ii) нарушенный ген $\beta 2M$ и (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела к PTK7.

[0010] Также в данном документе, в некоторых аспектах, предусмотрена популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат (i) нарушенный ген TRAC; (ii) нарушенный ген $\beta 2M$ и (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела к PTK7. В

других аспектах в данном документе предусмотрена популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат (i) нарушенный ген TRAC, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, где последовательность нуклеиновой кислоты характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с последовательностями под SEQ ID NO: 49, 51, 65, 72, 79 или 112 и кодирует CAR с последовательностями под SEQ ID NO: 50, 52, 66, 73 или 80; и (ii) нарушенный ген $\beta 2M$.

[0011] Также в данном документе, в некоторых аспектах, предусмотрена популяция сконструированных Т-клеток (например, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR к РТК7), где по меньшей мере 25% или по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции экспрессируют CAR. Например, по меньшей мере 70% сконструированных Т-клеток популяции экспрессируют CAR.

[0012] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 25% сконструированных Т-клеток популяции экспрессируют CAR после по меньшей мере 7 или по меньшей мере 14 дней пролиферации *in vitro*.

[0013] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют белок Т-клеточного рецептора (TCR) на обнаруживаемом уровне. Например, по меньшей мере 90% сконструированных Т-клеток популяции могут не экспрессировать белок TCR на обнаруживаемом уровне.

[0014] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне. Например, по меньшей мере 70% сконструированных Т-клеток популяции могут не экспрессировать белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне.

[0015] В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки популяции при совместном культивировании *in vitro* с популяцией раковых клеток, которые экспрессируют РТК7, индуцируют клеточный лизис по меньшей мере 50% раковых клеток популяции. Например, сконструированные Т-клетки популяции могут индуцировать клеточный лизис по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% раковых клеток популяции. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки популяции при совместном культивировании *in vitro* с популяцией раковых клеток, которые экспрессируют РТК7, индуцируют клеточный лизис по меньшей мере 10%, по меньшей мере 25% или по меньшей мере 50% раковых клеток популяции. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки популяции при совместном культивировании *in vitro* с популяцией раковых клеток секретируют $IFN\gamma$. В некоторых вариантах осуществления соотношение сконструированных Т-клеток и раковых клеток составляет от 1:1 до 2:1. Раковые клетки могут представлять собой, например, клетки саркомы или клетки рака молочной железы. В качестве цели могут выступать и другие раковые клетки. В некоторых вариантах осуществления раковые клетки могут представлять собой клетки рака молочной железы, клетки рака яичника, клетки мелкоклеточного рака легкого и/или клетки рака толстой

кишки.

[0016] В некоторых вариантах осуществления пролиферативная способность сконструированных Т-клеток популяции находится в пределах 10% от пролиферативной способности контрольных клеток. В еще одних вариантах осуществления популяция Т-клеток при введении *in vivo* субъекту не индуцирует токсичности у субъекта.

[0017] В других аспектах настоящего изобретения предусмотрен способ, который предусматривает введение популяции сконструированных Т-клеток, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления процент массы тела субъекта через 5-10 дней после введения находится в пределах 10% от начальной массы тела субъекта, при этом исходная масса тела субъекта представляет собой массу тела субъекта в момент введения. В некоторых вариантах осуществления субъект является субъектом-человеком. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак. Рак может характеризоваться, например, экспрессией РТК7. В различных вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, рака матки, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака яичка, рака щитовидной железы, рака носоглотки, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), нейрональной глиобластомы, видов саркомы мягких тканей, лейкоза, лимфомы, меланомы, рака толстой кишки, аденокарциномы толстой кишки, глиобластомы головного мозга, гепатоклеточной карциномы, гепатохолангиокарциномы печени, остеосаркомы, рака желудка, плоскоклеточной карциномы пищевода, поздних стадий рака поджелудочной железы, аденокарциномы легкого, плоскоклеточной карциномы легкого, мелкоклеточного рака легкого, карциномы почки и рака внутрипеченочных желчных путей.

[0018] В дополнительных аспектах настоящего изобретения предусмотрен способ получения сконструированной Т-клетки, при этом способ предусматривает (а) доставку в Т-клетку РНК-направляемой нуклеазы, gRNA, нацеливающейся на ген TRAC, и вектора, содержащего донорную матрицу, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, который содержит эктодомен, который специфически связывается с РТК7, при этом нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, фланкирована левым и правым плечами гомологии к гену TRAC, и (b) получение сконструированной Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающаяся на ген TRAC, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 18 или 19 или нацелена на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 40. В одном родственном варианте осуществления предусмотрен способ, в котором нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, фланкирована левым и правым плечами гомологии к гену TRAC.

[0019] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает доставку в Т-клетку gRNA, нацеливающейся на ген $\beta 2M$. В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающаяся на ген $\beta 2M$, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 20 или 21 или нацелена на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 41.

[0020] В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9, необязательно нуклеазу Cas9 *S. pyogenes*. В некоторых вариантах осуществления эктодомен CAR представляет собой антитело к PTK7, необязательно одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) к PTK7.

[0021] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 63, 64, 71, 78, или 91.

[0022] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность под любым из SEQ ID NO: 50, 52, 66, 73, или 80.

[0023] В некоторых вариантах осуществления предусмотрен способ получения, при котором scFv к PTK7 содержит те же определяющие комплементарность области (CDR) вариабельного домена тяжелой цепи (VH), и те же CDR вариабельного домена легкой цепи (VL), что и эталонное антитело, при этом эталонное антитело содержит (i) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 55, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 56, (ii) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 69, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 70, (iii) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 76, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 77, или (iv) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 83, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 84. В одном варианте осуществления предусмотрен способ, при котором scFv к PTK7 содержит те же цепи VH и VL, что и эталонное антитело. В еще одном варианте осуществления scFv к PTK7 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 54, 68, 75, или 82.

[0024] В одном варианте осуществления предусмотрен вышеупомянутый способ получения, при котором CAR содержит костимулирующий домен CD28 или костимулирующий домен 41BB. В родственном варианте осуществления CAR дополнительно содержит цитоплазматический сигнальный домен CD3ζ.

[0025] В некоторых вариантах осуществления предусмотрен вышеупомянутый способ получения, при котором донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 63, 64, 71, 78 или 91. В еще одних вариантах осуществления CAR кодируется нуклеотидной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 49, 51, 65, 72, 79, или 112.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0026] На **фиг. 1** показана экспрессия PTK7 в нормальных тканях человека.

[0027] На **фиг. 2A** и **2B** показана экспрессия PTK7 в пораженных заболеванием и нормальных тканях человека.

[0028] На **фиг. 3** показана частота выявления PTK7 среди пациентов, выявленная с помощью иммуногистохимии (ИНС) в солидных опухолях.

[0029] На **фиг. 4** показана аффинность связывания Ab к PTK7/CTX181 в человеческих и мышинных клеточных линиях.

[0030] На **фиг. 5A** и **5B** показана экспрессия РТК7 в панелях замороженных нормальных тканей (по стандарту FDA), взятых у мыши (**фиг. 5A**) и человека (**фиг. 5B**).

[0031] На **фиг. 6** показана экспрессия РТК7 в зафиксированной матрице эмбрионального развития мыши.

[0032] На **фиг. 7** представлены графики, на которых видно высокоэффективное редактирование нескольких генов в Т-клетках TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ к РТК7. Показаны результаты редактирования фенотипов, измеряемые с помощью FACS (левый график), и экспрессия CAR⁺ к РТК7, измеряемая с помощью иммуногистохимии (правый график), для четырех различных конструкций CAR⁺ к РТК7 (РТК7-4, РТК7-7, РТК7-13 и РТК7-17).

[0033] На **фиг. 8** представлен график, на котором видно, что Т-клетка с CAR к РТК7 и с костимулирующим доменом CD28 (РТК7-4) была более эффективной, чем Т-клетка с CAR к РТК7 и с костимулирующим доменом 4-1BB (РТК7-4b).

[0034] На **фиг. 9A-9C** представлены графики, на которых видны цитолитические эффекты, оказываемые Т-клетками TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ к РТК7 на линиях прикрепленных клеток саркомы A-204 (**фиг. 9A**) и Saos-2 (**фиг. 9B**), а также на линии клеток рака молочной железы MCF7 (**фиг. 9C**). Были использованы соотношения клеток (Т-клетка с CAR:целевая раковая клетка) 2:1 и 1:1.

[0035] На **фиг. 10A-10C** показана специфичность Т-клеток с CAR к РТК7 на РТК7-КО клетках линии Saos2 (**фиг. 10A**) и РТК7-сверхэкспрессирующих клетках линии A498 (**фиг. 10B**). На **фиг. 10C** показана экспрессия РТК7 на поверхности клеток у клеток линии Saos2, РТК7-КО клеток линии Saos2, клеток линии A498 и РТК7-сверхэкспрессирующих клеток линии A498.

[0036] На **фиг. 11A-11C** показано, что *in vitro* эффективность Т-клеток с CAR к РТК7 имела схожий характер с паттерном экспрессии у следующих линий клеток солидной опухоли: рака молочной железы (**фиг. 11A**), рака поджелудочной железы (**фиг. 11B**) и рака легкого (NSCLC) (**фиг. 11C**).

[0037] На **фиг. 12** представлен график, на котором видна клеточная пролиферация Т-клеток TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ к РТК7 после генного редактирования в сравнении с контролями.

[0038] На **фиг. 13A-13B** представлены графики, на которых видно сохранение результатов редактирования нескольких генов в Т-клетках. Результаты редактирования фенотипов, измеряемые с помощью FACS, оставались неизменными с 7 дня (**фиг. 13A**) по 14 день (**фиг. 13B**) после редактирования. На **фиг. 13C-13D** показаны результаты редактирования фенотипа Т-клеток с CAR до РТК7-4, измеряемые с помощью FACS, на 7 сутки после редактирования, представленные в виде диаграммы FACS (**фиг. 13C**) и графика (**фиг. 13D**).

[0039] На **фиг. 14A-14F** представлены графики, на которых видно, что Т-клетки TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ к РТК7 более эффективны в цитолизе и секретируют более высокие уровни IFN_γ, чем Т-клетки TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ к CD19 при их контакте с клетками линий MCF7 (**фиг. 14A-14C**) и Saos-2 (**фиг. 14D-14F**).

[0040] На **фиг. 15** показано, что Т-клетки с CAR к РТК7 были одинаково эффективны *in vitro* на человеческих и мышинных клеточных линиях.

[0041] На **фиг. 16** представлен график, на котором видно, что мыши, обработанные Т-клетками TRAC⁺/β2M/ CAR⁺ к РТК7, демонстрировали минимальную потерю массы тела в течение периода до 10 дней после обработки/инъекции.

[0042] На **фиг. 17** показаны уровни экспрессии РТК7 на клеточной поверхности у линий раковых клеток человека.

[0043] На **фиг. 18А-18С** показана эффективность Т-клеток с CAR к РТК7 на различных ксенотрансплантатных моделях *in vivo*.

[0044] На **фиг. 19А-19С** показаны результаты слепых последующих исследований *in vivo* по оценке эффективности Т-клеток с CAR к РТК7 на различных формах рака яичника (**фиг. 19А**), толстой кишки и SCLC (**фиг. 19В**), а также молочной железы (**фиг. 19С**).

[0045] На **фиг. 20** показано влияние обработки Т-клетками с CAR к РТК7 на массу тела на мышинной ксенотрансплантатной модели опухоли поджелудочной железы Hs-766Т.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Раковый антиген РТК7

[0046] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением конструируют с химерным антигенным рецептором (CAR), разработанным для нацеливания на РТК7. Протеин-тирозинкиназа 7 (РТК7), также известная как киназа 4 карциномы толстой кишки (ССК4), представляет собой рецепторную протеин-тирозинкиназу, которая принимает участие в неканонической передаче сигналов Wnt и содержит внеклеточный домен. РТК7 не обладает выявляемой каталитической тирозинкиназной активностью; однако она действительно обладает передающей сигнал активностью и, согласно предположениям, участвует в клеточной адгезии. Дополнительно считается, что РТК7 является маркером прогрессирования опухоли при раке, поскольку она экспрессируется в линиях раковых клеток (например, в линиях клеток рака толстой кишки и молочной железы).

[0047] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением конструируют для экспрессии CAR, предусматривающего антитело к РТК7 (например, scFv к РТК7). В некоторых вариантах осуществления антитело к РТК7 представляет собой scFv к РТК7, кодируемый последовательностью под любым из SEQ ID NO: 53, 67, 74 или 81. В некоторых вариантах осуществления антитело к РТК7 представляет собой scFv к РТК7, кодируемый последовательностью под любым из SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления антитело к РТК7 представляет собой scFv к РТК7, содержащий последовательность под любым из SEQ ID NO: 54, 68, 75 или 82. В некоторых вариантах осуществления антитело к РТК7 представляет собой scFv к РТК7, содержащий VH, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 55, 69, 76

или 83. В некоторых вариантах осуществления антитело к РТК7 представляет собой scFv к РТК7, содержащий VL, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 56, 70, 77 или 84. В некоторых вариантах осуществления CAR, предусматривающий антитело к РТК7, кодируется последовательностью под любым из SEQ ID NO: 49, 51, 65, 72 или 79. В некоторых вариантах осуществления CAR, предусматривающий антитело к РТК7, кодируется последовательностью, предусматривающей нуклеиновую кислоту, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности под SEQ ID NO: 49, 51, 65, 72, 79 или 112. В некоторых вариантах осуществления CAR, предусматривающий антитело к РТК7, кодируется последовательностью под любым из SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления CAR, предусматривающий антитело к РТК7, содержит последовательность под любым из SEQ ID NO: 50, 52, 66, 73 или 80. В некоторых вариантах осуществления CAR, предусматривающий антитело к РТК7, предусматривает антитело к РТК7, которое описано в US 9102738 или US 9409995.

Редактирование нескольких генов

[0048] Сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением, в некоторых вариантах осуществления, включают более одного отредактированного гена, например, в более чем одном гене. Например, сконструированная Т-клетка может содержать нарушенный ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC), нарушенный ген бета-2-микроглобулина ($\beta 2M$), нарушенный ген программируемой гибели клеток-1 (PD-1 или PDCD1), нарушенный ген CD70 или любую комбинацию двух или более из вышеупомянутых нарушенных генов. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит нарушенный ген TRAC, нарушенный ген $\beta 2M$ и нарушенный ген CD70. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит нарушенный ген TRAC, нарушенный ген $\beta 2M$ и нарушенный ген PD-1. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит нарушенный ген TRAC, нарушенный ген $\beta 2M$, нарушенный ген CD70 и нарушенный ген PD-1.

[0049] Следует учитывать, что нарушение гена охватывает генную модификацию посредством редактирования генов (например, использование редактирования генов с помощью CRISPR/Cas для вставки или удаления одного или нескольких нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген представляет собой ген, который не кодирует функциональный белок. В некоторых вариантах осуществления клетка, которая содержит нарушенный ген, не экспрессирует (например, на клеточной поверхности) на обнаруживаемом уровне (например, с помощью антитела, например, посредством проточной цитометрии) белок, кодируемый геном. Клетка, которая не экспрессирует белок на обнаруживаемом уровне, может называться нокаутной клеткой. Например, клетка с отредактированным геном $\beta 2M$ может считаться клеткой, нокаутной по $\beta 2M$, если белок $\beta 2M$ не обнаруживается на клеточной поверхности с использованием антитела, которое специфически связывает белок $\beta 2M$.

[0050] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены популяции клеток, в которых определенный процент клеток был отредактирован (например, отредактированный ген $\beta 2M$), что привело к отсутствию экспрессии конкретного гена и/или белка у определенного процента клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% (например, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, или 85%) клеток популяции клеток с отредактированными генами представляют собой клетки, нокаутные по $\beta 2M$. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% клеток (например, Т-клеток) популяции не экспрессируют белок $\beta 2M$ на обнаруживаемых уровнях. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% клеток в популяции клеток с отредактированным геном могут быть клетками, нокаутными по $\beta 2M$.

[0051] Известны способы применения технологии редактирования гена CRISPR-Cas для получения геномной делеции в клетке (например, для нокаута гена в клетке) (Bauer DE et al. Vis. Exp. 2015;95:e52118).

Редактирование гена TRAC

[0052] В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит нарушенный ген TRAC. Это нарушение приводит к потере функции TCR и делает сконструированную Т-клетку неаллореактивной и пригодной для аллогенной трансплантации, сводя к минимуму риск развития заболевания "трансплантат против хозяина". В некоторых вариантах осуществления экспрессия эндогенного гена TRAC элиминируется для предупреждения реакции "трансплантат против хозяина". В некоторых вариантах осуществления нарушение экспрессии гена TRAC вызывают путем нокина химерного антигенного рецептора (CAR) в ген TRAC (например, с использованием вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV) и донорной матрицы). В некоторых вариантах осуществления нарушение экспрессии гена TRAC вызывают с помощью gRNA, нацеливающих на геномную область TRAC. В некоторых вариантах осуществления геномную делецию гена TRAC вызывают путем нокина химерного антигенного рецептора (CAR) в ген TRAC (например, с использованием AAV-вектора и донорной матрицы). В некоторых вариантах осуществления нарушение экспрессии гена TRAC вызывают с помощью gRNA, нацеливающих на геномную область TRAC, и нокина химерного антигенного рецептора (CAR) в ген TRAC.

[0053] Неограничивающие примеры модифицированных и немодифицированных последовательностей gRNA TRAC, которые могут быть использованы, как предусмотрено в данном документе, для получения геномного нарушения в гене TRAC, приведены в **таблице 4** (например, SEQ ID NO: 18 и 19). См. также международную заявку № PCT/US2018/032334, поданную 11 мая 2018 года, включенную в данный документ посредством ссылки. Другие последовательности gRNA могут быть разработаны с использованием последовательности гена TRAC, расположенной на хромосоме 14

(GRCh38: хромосома 14: 22,547,506-22,552,154; Ensembl; ENSG00000277734). В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область TRAC, обуславливают возникновение инсерционно-делеционных мутаций в гене TRAC, нарушая экспрессию mRNA или белка.

[0054] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют поверхностный белок Т-клеточного рецептора (TCR) на обнаруживаемом уровне. Например, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% популяции могут не экспрессировать поверхностный белок TCR на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, или 90%-100% популяции сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок TCR на обнаруживаемом уровне.

[0055] В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область TRAC, обуславливают возникновение инсерционно-делеционных мутаций в гене TRAC, содержащем по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из представленных в **таблице 1** последовательностей.

Таблица 1

Последовательность	SEQ ID NO:
AAGAGCAACAAATCTGACT	1
AAGAGCAACAGTGCTGTGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	2
AAGAGCAACAGTGCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	3
AAGAGCAACAGTGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	4
AAGAGCAACAGTGCTGACTAAGAGCAACAAATCTGACT	5
AAGAGCAACAGTGCTGTGGGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	6
AAGAGCAACAGTGCTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	7
AAGAGCAACAGTGCTGTGTGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	8

[0056] В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка предусматривает делецию в гене TRAC по сравнению с немодифицированными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка

предусматривает делецию из 15-30 пар оснований в гене TRAC по сравнению с немодифицированными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка предусматривает делецию из 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 пар оснований в гене TRAC по сравнению с немодифицированными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка предусматривает делецию из более чем 30 пар оснований в гене TRAC по сравнению с немодифицированными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка предусматривает делецию из 20 пар оснований в гене TRAC по сравнению с немодифицированными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка предусматривает делецию, представляющую собой SEQ ID NO: 104 (AGAGCAACAGTGCTGTGGCC), в гене TRAC по сравнению с немодифицированными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка предусматривает делецию, представляющую собой SEQ ID NO: 104 (AGAGCAACAGTGCTGTGGCC), в гене TRAC по сравнению с немодифицированными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка предусматривает делецию, представляющую собой SEQ ID NO: 40, в гене TRAC по сравнению с немодифицированными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка предусматривает делецию, представляющую собой SEQ ID NO: 40, в гене TRAC по сравнению с немодифицированными Т-клетками.

Редактирование гена $\beta 2M$

[0057] В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит нарушенный ген $\beta 2M$. $\beta 2M$ является общим (инвариантным) компонентом комплексов МНС I. Нарушение его экспрессии вследствие редактирования генов будет предупреждать развитие реакций "хозяин против терапевтических аллогенных Т-клеток", что приведет к увеличению персистенции аллогенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления экспрессия эндогенного гена $\beta 2M$ элиминируется для предупреждения реакции "хозяин против трансплантата".

[0058] Неограничивающие примеры модифицированных и немодифицированных последовательностей gRNA для $\beta 2M$, которые можно применять, как предусмотрено в данном документе, для получения геномного нарушения в гене $\beta 2M$, приведены в **таблице 4** (например, SEQ ID NO: 20 и 21). См. также международную заявку № PCT/US2018/032334, поданную 11 мая 2018 года, включенную в данный документ посредством ссылки. Другие последовательности gRNA могут быть разработаны с использованием последовательности гена $\beta 2M$, расположенной на хромосоме 15 (координаты GRCh38: хромосома 15: 44,711,477-44,718,877 ; Ensembl: ENSG00000166710).

[0059] В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область $\beta 2M$, обуславливают возникновение инсерционно-делеционных мутаций в гене $\beta 2M$, нарушая экспрессию mRNA или белка.

[0060] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне. Например, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% сконструированных Т-клеток популяции могут не экспрессировать поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, или 90%-100% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне.

[0061] В некоторых вариантах осуществления отредактированный ген $\beta 2M$ содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из представленных в **таблице 2** последовательностей.

Таблица 2

Последовательности	SEQ ID NO:
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGCCTGGAGG CTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	9
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCGCCTGGAGGC TATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	10
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGAGGCTAT CCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	11
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGATAGCCT GGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	12
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTAC CCTCCCGCT	13
CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGTGGCCTGG AGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	14

Редактирование гена PD-1

[0062] PD-1 представляет собой молекулу иммунной контрольной точки, экспрессия которой повышена в активированных Т-клетках, и она служит для ослабления или остановки Т-клеточных ответов. Нарушение PD-1 вследствие редактирования гена может привести к более устойчивым и/или сильным терапевтическим Т-клеточным ответам и/или к снижению иммуносупрессии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит нарушенный ген PD-1. В некоторых вариантах осуществления экспрессию эндогенного гена PD-1 элиминируют для усиления противоопухолевой эффективности Т-клеток с CAR в соответствии с настоящим изобретением.

[0063] Неограничивающие примеры модифицированных и немодифицированных

последовательностей gRNA для PD-1, которые можно применять, как предусмотрено в данном документе, для получения геномной делеции в гене PD-1, приведены в **таблице 4** (например, SEQ ID NO: 22 и 23). См. также международную заявку № PCT/US2018/032334, поданную 11 мая 2018 года, включенную в данный документ посредством ссылки. Другие последовательности gRNA могут быть разработаны с использованием последовательности гена PD-1, расположенной на хромосоме 2 (координаты GRCh38: хромосома 2: 241,849,881-241,858,908; Ensembl: ENSG00000188389).

[0064] В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область PD-1, обуславливают возникновение инсерционно-делеционных мутаций в гене PD-1, нарушая экспрессию mRNA или белка PD-1.

[0065] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют поверхностный белок PD-1 на обнаруживаемом уровне. Например, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% сконструированных Т-клеток популяции могут не экспрессировать поверхностный белок PD-1 на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, или 90%-100% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют поверхностный белок PD-1 на обнаруживаемом уровне.

Редактирование гена CD70

[0066] Кластер дифференцировки 70 (CD70) является представителем суперсемейства факторов некроза опухоли, и его экспрессия ограничена активированными Т- и В-лимфоцитами и зрелыми дендритными клетками. CD70 также был обнаружен в гематологических опухолях и в карциномах. CD70 участвует в выживаемости опухолевых клеток и регуляторных Т-клеток посредством взаимодействия со своим лигандом CD27. Нарушение CD70 путем генного редактирования усиливает размножение клеток и снижает их истощение. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка содержит нарушенный ген CD70. В некоторых вариантах осуществления экспрессию эндогенного гена CD70 элиминируют для усиления противоопухолевой эффективности Т-клеток с CAR в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область CD70, обуславливают возникновение инсерционно-делеционных мутаций в гене CD70 или вокруг него, нарушая экспрессию mRNA или белка CD70.

[0067] Неограничивающие примеры модифицированных и немодифицированных последовательностей gRNA для CD70, которые можно применять, как предусмотрено в данном документе, для получения геномного нарушения в гене CD70, приведены в **таблице 4** (например, SEQ ID NO: 24-27). Другие последовательности gRNA могут быть разработаны с использованием последовательности гена CD70, расположенной на

хромосоме 19 (координаты GRCh38: хромосома 19: 6,583,183-6,604,103; Ensembl: ENSG00000125726).

[0068] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют поверхностный белок CD70 на обнаруживаемом уровне. Например, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% сконструированных Т-клеток популяции могут не экспрессировать поверхностный белок CD70 на обнаруживаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, или 90%-100% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют поверхностный белок CD70 на обнаруживаемом уровне.

Клеточные фенотипы

[0069] В некоторых вариантах осуществления случаи редактирования одного или нескольких генов в популяции клеток обуславливают фенотип, связанный с изменениями клеточного пролиферативного потенциала, клеточным истощением, жизнеспособностью клеток, способностью к клеточному лизису (например, увеличением продуцирования и/или высвобождения цитокинов) или любой их комбинацией.

[0070] В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением характеризуются клеточным пролиферативным потенциалом, который на по меньшей мере 20% выше, чем у контрольных Т-клеток. Например, сконструированные Т-клетки могут характеризоваться клеточным пролиферативным потенциалом, который на по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% выше, чем у контрольных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением характеризуются клеточным пролиферативным потенциалом, который на 20%-100%, 20%-90%, 20%-80%, 20%-70%, 20%-60%, 20%-50%, 30%-100%, 30%-90%, 30%-80%, 30%-70%, 30%-60%, 30%-50%, 40%-100%, 40%-90%, 40%-80%, 40%-70%, 40%-60%, 40%-50%, 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, или 50%-60% выше, чем у контрольных Т-клеток.

[0071] В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением характеризуются по меньшей мере 20% повышением клеточной жизнеспособности по сравнению с контрольными клетками. Например, сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением могут характеризоваться по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% повышением клеточной

жизнеспособности по сравнению с контрольными клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением характеризуются 20%-100%, 20%-90%, 20%-80%, 20%-70%, 20%-60%, 20%-50%, 30%-100%, 30%-90%, 30%-80%, 30%-70%, 30%-60%, 30%-50%, 40%-100%, 40%-90%, 40%-80%, 40%-70%, 40%-60%, 40%-50%, 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, или 50%-60% повышением клеточной жизнеспособности по сравнению с контрольными клетками.

[0072] В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением характеризуются по меньшей мере 20% повышением способности к клеточному лизису (уничтожают на по меньшей мере 20% больше целевых клеток) по сравнению с контрольными клетками. Например, сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением могут характеризоваться по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% повышением способности к клеточному лизису по сравнению с контрольными клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением характеризуются 20%-100%, 20%-90%, 20%-80%, 20%-70%, 20%-60%, 20%-50%, 30%-100%, 30%-90%, 30%-80%, 30%-70%, 30%-60%, 30%-50%, 40%-100%, 40%-90%, 40%-80%, 40%-70%, 40%-60%, 40%-50%, 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, или 50%-60% повышением способности к клеточному лизису по сравнению с контрольными клетками. Например, уровень цитокинов (например, IL-2 и/или IFN-гамма), секретируемых сконструированными Т-клетками, может быть по меньшей мере в 2 раза (например, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза или по меньшей мере в 5 раз) больше уровня цитокинов, секретируемых контрольными Т-клетками.

[0073] Контрольные Т-клетки, в некоторых вариантах осуществления, представляют собой сконструированные Т-клетки (например, Т-клетки с отредактированными генами). В некоторых вариантах осуществления контрольные Т-клетки представляют собой сконструированные Т-клетки, которые содержат нарушенный ген TRAC, нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR (например, CAR к PTK7), вставленную в ген TRAC, и/или нарушенный ген $\beta 2M$. В некоторых вариантах осуществления контрольные Т-клетки представляют собой неотредактированные Т-клетки.

Способы редактирования гена

[0074] Редактирование генов (включая редактирование генома) представляет собой тип генной инженерии, при котором нуклеотид(-ы)/нуклеиновую(-ые) кислоту(-ы) вставляют, удаляют и/или замещают в последовательности ДНК, как, например, в геноме целевой клетки. Целевое редактирование гена позволяет осуществлять вставку, делецию и/или замену в предварительно выбранных сайтах в геноме целевой клетки (например, в целевом гене или целевой последовательности ДНК). При редактировании

последовательности эндогенного гена, например, путем делеции, вставки или замены нуклеотида(-ов)/нуклеиновой(-ых) кислоты(-от) эндогенный ген, содержащий затронутую последовательность, может быть подвергнут нокауту или нокдауну вследствие перестройки последовательности. Следовательно, целевое редактирование может использоваться для нарушения экспрессии эндогенных генов. "Целевая интеграция" относится к процессу, предусматривающему вставку одной или нескольких экзогенных последовательностей с или без делеции эндогенной последовательности в сайте вставки. Целевая интеграция может быть результатом целевого редактирования гена, если присутствует донорная матрица, содержащая экзогенную последовательность.

[0075] Целевое редактирование может быть достигнуто либо с помощью независимого от нуклеазы подхода, либо с помощью зависимого от нуклеазы подхода. В подходе независимого от нуклеазы целевого редактирования гомологичная рекомбинация управляется гомологичными последовательностями, фланкирующими экзогенный полинуклеотид, который вводится в эндогенную последовательность посредством ферментативного механизма клетки-хозяина. С помощью экзогенного полинуклеотида можно осуществлять введение делеции, вставки или замены нуклеотидов в эндогенную последовательность.

[0076] В качестве альтернативы, зависимый от нуклеазы подход может обеспечить целевое редактирование с более высокой частотой за счет специфического введения двухнитевых разрывов (DSB) с помощью определенных редкощепящих нуклеаз (например, эндонуклеаз). В таком зависимом от нуклеазы целевом редактировании также используются механизмы репарации ДНК, например, нехомологичное соединение концов (NHEJ), которое происходит в ответ на DSB. Репарация ДНК с помощью NHEJ часто приводит к случайным вставкам или делециям (инсерционно-делеционным мутациям) небольшого числа эндогенных нуклеотидов. В отличие от опосредованной NHEJ репарации репарация также может представлять собой репарацию, направляемую гомологией (HDR). Если присутствует донорная матрица, содержащая экзогенный генетический материал, фланкированный парой плеч гомологии, то экзогенный генетический материал может быть введен в геном с помощью HDR, что приводит к целевой интеграции экзогенного генетического материала.

[0077] Доступные эндонуклеазы, способные вводить специфические и нацеленные DSB, включают без ограничения нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN), и нуклеазу CRISPR-Cas9, направляемую РНК (CRISPR/Cas9; нуклеаза 9, ассоциированная с кластеризованными регулярно-расположенными короткими палиндромными повторами). Кроме того, для целевой интеграции также может использоваться система DICE (обмен кассетами с помощью двойной интегразы), использующая интегразы *phiC31* и *Bxb1*.

[0078] ZFN представляют собой целевые нуклеазы, включающие нуклеазу, слитую с ДНК-связывающим доменом "цинковый палец" (ZFBD), представляющим собой полипептидный домен, который связывает ДНК специфическим для последовательности

образом через один или несколько "цинковых пальцев". "Цинковый палец" представляет собой домен из приблизительно 30 аминокислот в связывающем домене "цинковый палец", структура которого стабилизируется за счет координации иона цинка. Примеры "цинковых пальцев" включают без ограничения "цинковые пальцы" C2H2, "цинковые пальцы" C3H и "цинковые пальцы" C4. Сконструированный домен "цинковый палец" представляет собой домен, не встречающийся в природе, конструкция/состав которого является главным образом результатом рациональных критериев, например, применения правил замещения и компьютеризированных алгоритмов для обработки информации в базе данных, хранящей информацию о существующих конструкциях ZFP и данных связывания. См., например, патенты США №№ 6140081, 6453242 и 6534261, см. также WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 и WO 03/016496. Выбранный домен "цинковый палец" представляет собой домен, не встречающийся в природе, получение которого в основном является результатом эмпирического процесса, такого как фаговый дисплей, интерактивная ловушка или гибридный отбор. ZFN более подробно описаны в патенте США № 7888121 и в патенте США № 7972854. Наиболее известным примером ZFN является результат слияния нуклеазы FokI с ДНК-связывающим доменом "цинковый палец".

[0079] TALEN представляет собой целевую нуклеазу, содержащую нуклеазу, слитую с эффекторным ДНК-связывающим доменом TAL. "Подобный активатору транскрипции эффекторный ДНК-связывающий домен", "эффекторный ДНК-связывающий домен TAL" или "ДНК-связывающий домен TALE" представляет собой полипептидный домен эффекторных белков TAL, который отвечает за связывание эффекторного белка TAL с ДНК. Эффекторные белки TAL секретируются растительными патогенами рода *Xanthomonas* во время инфицирования. Эти белки проникают в ядро растительной клетки, связывают специфические в отношении эффектора последовательности ДНК через свой ДНК-связывающий домен и активируют транскрипцию генов на этих последовательностях через их трансактивирующие домены. Специфичность эффекторного ДНК-связывающего домена TAL зависит от вариативного среди эффекторов количества несовершенных повторов 34 аминокислот, которые содержат полиморфизмы в выбранных положениях повторов, называемые повторами, содержащими вариативные последовательности из двух остатков (RVD). Более подробно TALEN описаны в заявке на патент США № 2011/0145940. Наиболее известным примером TALEN в уровне техники является полипептид, образующийся в результате слияния нуклеазы FokI с эффекторным ДНК-связывающим доменом TAL.

[0080] Дополнительные примеры целевых нуклеаз, подходящих для применения, как предусмотрено в данном документе, включают без ограничения Vxb1, phiC31, R4, PhiBT1 и Wβ/SPBc/TP901-1, независимо от того, используются они по отдельности или в комбинации.

[0081] Другие неограничивающие примеры целевых нуклеаз включают встречающиеся в природе и рекомбинантные нуклеазы, например CRISPR/Cas9,

рестрикционные эндонуклеазы, мегануклеазы, хоуминг-эндонуклеазы и т. п.

Редактирование гена с помощью CRISPR-Cas9

[0082] Система CRISPR-Cas9 представляет собой встречающийся в природе защитный механизм у прокариот, который был переориентирован в направляемую РНК платформу для нацеливания на ДНК, применяемую для редактирования гена. Она основана на ДНК-нуклеазе Cas9 и двух некодирующих РНК-crRNA (crRNA) и транс-активирующей РНК (tracrRNA) для нацеливания на расщепление ДНК.

[0083] CrRNA управляет распознаванием последовательности и специфичностью комплекса CRISPR-Cas9 посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику, как правило, с 20-нуклеотидной (нукл.) последовательностью в целевой ДНК. Изменение последовательности из 20 нуклеотидов на 5'-конце в crRNA позволяет нацеливать комплекс CRISPR-Cas9 на конкретные локусы. Комплекс CRISPR-Cas9 связывает только последовательности ДНК, которые содержат последовательность, соответствующую первым 20 нуклеотидам crRNA, одиночной направляющей РНК (sgRNA), если за целевой последовательностью следует определенный короткий мотив ДНК (с последовательностью NGG), называемый мотивом, примыкающим к протоспейсеру (PAM).

[0084] TracrRNA гибридизируется с 3'-концом crRNA с образованием структуры РНК-дуплекса, которая связывается эндонуклеазой Cas9 с образованием каталитически активного комплекса CRISPR-Cas9, который затем может расщеплять целевую ДНК.

[0085] Как только комплекс CRISPR-Cas9 связывается с ДНК в целевом сайте, каждый из двух независимых нуклеазных доменов в ферменте Cas9 расщепляет одну из нитей ДНК выше сайта PAM, оставляя двухнитевый разрыв (DSB), при этом обе нити ДНК заканчиваются парой оснований (тупым концом).

[0086] После связывания комплекса CRISPR-Cas9 с ДНК в определенном целевом сайте и образования сайт-специфического DSB следующим ключевым шагом является репарация DSB. Клетки используют два основных пути репарации ДНК для репарации DSB: нехомологичное соединение концов (NHEJ) и направляемая гомологией репарация (HDR).

[0087] NHEJ представляет собой надежный механизм репарации, который проявляет высокую активность в большинстве типов клеток, включая неделящиеся клетки. NHEJ подвержен ошибкам и часто может приводить к удалению или добавлению от одного до нескольких сотен нуклеотидов в сайте DSB, хотя такие модификации обычно составляют < 20 нуклеотидов. Полученные в результате вставки и делеции (инсерционно-делеционные мутации) могут нарушать кодирующие или некодирующие области генов. В качестве альтернативы, HDR использует длинный отрезок гомологичной донорной ДНК, представленной эндогенно или экзогенно, для репарации DSB с высокой точностью. HDR активна только в делящихся клетках и происходит с относительно низкой частотой в большинстве типов клеток. Во многих вариантах осуществления настоящего изобретения NHEJ используется в качестве операнта репарации.

[0088] В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза Cas9 (CRISPR-ассоциированный белок 9) происходит из *Streptococcus pyogenes*, хотя могут быть использованы другие гомологи Cas9. Следует учитывать, что могут быть использованы Cas9 дикого типа или могут быть использованы модифицированные версии Cas9 (например, развитые версии Cas9, или ортологи, или варианты Cas9), представленные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления Cas9 может быть замещена другой РНК-направляемой эндонуклеазой, такой как Cpf1 (из системы CRISPR/Cas II класса).

Направляющие РНК

[0089] В настоящем изобретении предусмотрена нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, которая может направлять виды активности ассоциированного с ней полипептида (например, сайт-направленного полипептида) на конкретную целевую последовательность в целевой нуклеиновой кислоте. Нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, может представлять собой РНК. РНК, нацеливающаяся на геном, в данном документе называется "направляющей РНК" или "gRNA". Направляющая РНК содержит по меньшей мере спейсерную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, и последовательность повтора CRISPR. В системах типа II gRNA также содержит вторую РНК, называемую последовательностью tracrRNA. В направляющей РНК (gRNA) типа II последовательность повтора CRISPR и последовательность tracrRNA гибридизируются друг с другом с образованием дуплекса. В направляющей РНК (gRNA) типа V crRNA образует дуплекс. В обеих системах дуплекс связывает сайт-направленный полипептид таким образом, что направляющая РНК и сайт-направленный полипептид образуют комплекс. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, обеспечивает специфичность комплекса к мишени благодаря его ассоциации с сайт-направленным полипептидом. Таким образом, нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, направляет активность сайт-направленного полипептида.

[0090] Как понятно специалисту в данной области, каждая направляющая РНК сконструирована таким образом, что она содержит спейсерную последовательность, которая комплементарна ее геномной целевой последовательности. См. Jinek et al., *Science*, 337, 816-821 (2012) и Deltcheva et al., *Nature*, 471, 602-607 (2011).

[0091] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, представляет собой направляющую РНК, состоящую из двух молекул. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, представляет собой направляющую РНК, состоящую из одной молекулы.

[0092] Направляющая РНК, состоящая из двух молекул, содержит две нити РНК. Первая нить содержит в направлении 5'-3' необязательную последовательность, удлиняющую спейсер, спейсерную последовательность и минимальную последовательность повтора CRISPR. Вторая нить содержит минимальную

последовательность tracrRNA (комплементарную минимальной последовательности повтора CRISPR), 3'-последовательность tracrRNA и необязательную последовательность, удлиняющую tracrRNA.

[0093] Направляющая РНК, состоящая из одной молекулы (sgRNA), в системе типа II содержит в направлении 5'-3' необязательную последовательность, удлиняющую спейсер, спейсерную последовательность, минимальную последовательность повтора CRISPR, линкер направляющей молекулы нуклеиновой кислоты, состоящей из одной молекулы, минимальную последовательность tracrRNA, 3'-последовательность tracrRNA и необязательную последовательность, удлиняющую tracrRNA. Необязательная последовательность, удлиняющая tracrRNA, может содержать элементы, которые придают направляющей РНК дополнительные функциональные свойства (например, стабильность). Линкер направляющей нуклеиновой кислоты, состоящей из одной молекулы, связывает минимальный повтор CRISPR и минимальную последовательность tracrRNA с образованием шпильчатой структуры. Необязательная последовательность, удлиняющая tracrRNA, содержит одну или несколько шпилек.

[0094] Направляющая РНК, состоящая из одной молекулы (называемая "sgRNA" или "gRNA"), в системе типа V содержит в направлении 5'-3' минимальную последовательность повтора CRISPR и спейсерную последовательность.

[0095] sgRNA может содержать спейсерную последовательность из 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать спейсерную последовательность из менее чем 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать спейсерную последовательность из более чем 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать спейсерную последовательность переменной длины с 17-30 нуклеотидами на 5'-конце последовательности sgRNA (см. **таблицу 3**).

[0096] sgRNA может не содержать ни одного остатка урацила на 3'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать один или несколько остатков урацила на 3'-конце последовательности sgRNA. Например, sgRNA может содержать 1 остаток урацила (U) на 3'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать 2 остатка урацила (UU) на 3'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать 3 остатка урацила (UUU) на 3'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать 4 остатка урацила (UUUU) на 3'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать 5 остатков урацила (UUUUU) на 3'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать 6 остатков урацила (UUUUUU) на 3'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать 7 остатков урацила (UUUUUUU) на 3'-конце последовательности sgRNA. sgRNA может содержать 8 остатков урацила (UUUUUUUU) на 3'-конце последовательности sgRNA.

[0097] sgRNA может быть немодифицированной или модифицированной. Например, модифицированные sgRNA могут содержать один или несколько 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов с фосфотиоатными связями.

содержащей PAM", а другая комплементарная нить называется "нитью, не содержащей PAM". Специалист в данной области поймет, что спейсерная последовательность gRNA гибридизируется с последовательностью, обратную комплементарной целевой последовательности, которая расположена в нити, не содержащей PAM, целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. Таким образом, спейсерная последовательность gRNA представляет собой РНК-эквивалент целевой последовательности. Например, если целевая последовательность представляет собой 5'-AGAGCAACAGTGCTGTGGCC-3' (SEQ ID NO: 104), то спейсерная последовательность gRNA представляет собой 5'-AGAGCAACAGUGCUGUGGCC-3' (SEQ ID NO: 105). Спейсер gRNA взаимодействует с целевой нуклеиновой кислотой, представляющей интерес, специфичным в отношении последовательности образом посредством гибридизации (т. е. спаривания оснований). Таким образом, нуклеотидная последовательность спейсера варьируется в зависимости от целевой последовательности целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес.

[00101] В системе CRISPR/Cas, описанной в данном документе, спейсерная последовательность предназначена для гибридизации с участком целевой нуклеиновой кислоты, который расположен в 5'-направлении от PAM для фермента Cas9, используемого в системе. Спейсер может полностью соответствовать целевой последовательности или может иметь несоответствия. Для каждого фермента Cas9 имеется конкретная последовательность PAM, которую он распознает в целевой ДНК. Например, *S. pyogenes* распознает в целевой нуклеиновой кислоте PAM, который содержит последовательность 5'-NRG-3', где R представляет собой A либо G, где N представляет собой любой нуклеотид, и при этом N находится непосредственно рядом с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, на которую нацеливается спейсерная последовательность, в 3'-направлении от нее.

[00102] В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты содержит 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты содержит менее чем 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты содержит более чем 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или больше нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты содержит не более 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или больше нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты содержит 20 оснований непосредственно рядом с первым нуклеотидом PAM в 5'-направлении от него. Например, в последовательности, содержащей 5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRG-3', целевая нуклеиновая кислота содержит последовательность, которая соответствует множеству N, где N представляет собой любой нуклеотид, а подчеркнутая последовательность NRG представляет собой PAM *S. pyogenes*.

[00103] Неограничивающие примеры gRNA, которые могут быть использованы, как представлено в данном документе, представлены в **таблице 4** и в PCT/US2018/032334, поданной 11 мая 2018 года.

Таблица 4. Последовательности gRNA/целевые последовательности

Последовательность gRNA		
Название	Немодифицированная последовательность	Модифицированная последовательность
sgRNA TRAC	AGAGCAACAGUGCUGU GGCCguuuuagagcuagaaauag caaguuaaaaaaaggcuaguccguu aucaacuugaaaaaguggcaccgag ucggugcUUUU (SEQ ID NO: 18)	A*G*A*GCAACAGUGC GUGGCCguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaaaaaggcuagucc guuaucuacuugaaaaaguggcacc gagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 28)
Спейсер sgRNA TRAC	AGAGCAACAGUGCUGU GGCC (SEQ ID NO: 19)	A*G*A*GCAACAGUGC GUGGCC (SEQ ID NO: 29)
sgRNA β 2M	GCUACUCUCUCUUUCUG GCCguuuuagagcuagaaauagca aguuaaaaaaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgaguc ggugcUUUU (SEQ ID NO: 20)	G*C*U*ACUCUCUCUUUC UGGCCguuuuagagcuagaaaua gcaaguuaaaaaaaggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcaccga gucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 30)
Спейсер sgRNA β 2M	GCUACUCUCUCUUUCUG GCC (SEQ ID NO: 21)	G*C*U*ACUCUCUCUUUC UGGCC (SEQ ID NO: 31)
sgRNA PD-1	CUGCAGCUUCUCCAACA CAUguuuuagagcuagaaauagca aguuaaaaaaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgaguc ggugcUUUU (SEQ ID NO: 22)	C*U*G*CAGCUUCUCCAA CACAUguuuuagagcuagaaaua gcaaguuaaaaaaaggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcaccga gucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 32)
Спейсер sgRNA PD-1	CUGCAGCUUCUCCAACA CAU (SEQ ID NO: 23)	C*U*G*CAGCUUCUCCAA CACAU (SEQ ID NO: 33)
sgRNA CD70 (E1_T7)	GCUUUGGUCCCAUUGGU CGCguuuuagagcuagaaauagca aguuaaaaaaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgaguc	G*C*U*UUGGUCCCAUU GGUCGCguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaaaaaggcuagucc guuaucuacuugaaaaaguggcacc

	ggugcUUUU (SEQ ID NO: 24)	gagucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 34), T7
Спейсер sgRNA CD70 (E1_T7)	GCUUUGGUCCCAUUGGU CGC (SEQ ID NO: 25)	G*C*U*UUGGUCCCAU GGUCGC (SEQ ID NO: 35)
sgRNA CD70 (E1_T8)	GCCCCGACGACGCACCC AUAguuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaaaaaggcuaguccguua ucaacuugaaaaaguggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 26)	G*C*C*CGCAGGACGCAC CCAUAguuuuagagcuagaaaua gcaaguuaaaaaaaggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcaccga gucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 36), T8
Спейсер sgRNA CD70 (E1_T8)	GCCCCGACGACGCACCC AUA (SEQ ID NO: 27)	G*C*C*CGCAGGACGCAC CCAUA (SEQ ID NO: 37)
Целевые последовательности		
Название направляющей РНК	Целевая последовательность (PAM)	
sgRNA CD70 (E1_T7)	GCTTTGGTCCCATTGGTCGC (GGG) (SEQ ID NO: 38)	
sgRNA CD70 (E1_T8)	GCCCCGACGACGCACCCATA (GGG) (SEQ ID NO: 39)	
sgRNA TRAC	AGAGCAACAGTGCTGTGGCC (TGG) (SEQ ID NO: 40)	
sgRNA β 2M	GCTACTCTCTCTTTCTGGCC (TGG) (SEQ ID NO: 41)	
sgRNA PD-1	CTGCAGCTTCTCCAACACAT (CGG) (SEQ ID NO: 42)	

*: 2'-О-метилфосфотиоатный остаток

Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR)

[00104] Химерный антигенный рецептор относится к искусственному рецептору иммунных клеток, который сконструирован для распознавания и связывания антигена, экспрессируемого опухолевыми клетками. Обычно CAR разрабатывается для Т-клетки, и он представляет собой химеру из сигнального домена комплекса Т-клеточного рецептора (TcR) и антигенраспознающего домена (например, одноцепочечного фрагмента (scFv) антитела или другого фрагмента антитела) (Enblad et al., Human Gene Therapy. 2015; 26(8):498-505). Т-клетка, которая экспрессирует CAR, называется Т-клеткой с CAR. CAR обладают способностью перенаправлять специфичность и реактивность Т-клеток в направлении выбранной мишени без рестриктирования по МНС. Распознавание антигена без рестриктирования по МНС придает Т-клеткам, экспрессирующим CAR, способность распознавать антиген независимо от процессинга антигена, тем самым обходя основной механизм ускользания опухоли. Более того, при экспрессии в Т-клетках CAR преимущественно не димеризуются с альфа- и бета-цепями эндогенного Т-клеточного рецептора (TCR).

[00105] Существует четыре поколения CAR, каждое из которых содержит

различные компоненты. В CAR первого поколения соединены scFv, полученный из антитела, и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета (ζ или z) Т-клеточного рецептора через шарнирный и трансмембранный домены. В CAR второго поколения включен дополнительный домен, например CD28, 4-1BB (41BB) или ICOS, для обеспечения костимулирующего сигнала. В CAR третьего поколения содержатся два костимулирующих домена, слитых с цепью CD3- ζ TCR. Костимулирующие домены в молекулах третьего поколения могут включать, например, комбинацию CD3 ζ , CD27, CD28, 4-1BB, ICOS или OX40. В некоторых вариантах осуществления CAR содержат эктодомен (например, CD3 ζ), обычно полученный из одноцепочечного фрагмента из переменных доменов (scFv), шарнирный участок, трансмембранный домен и эндодомен с одним (первое поколение), двумя (второе поколение) или тремя (третье поколение) сигнальными доменами, происходящими из CD3Z и/или костимулирующих молекул (Maude et al., Blood. 2015; 125(26):4017-4023; Kakarla and Gottschalk, Cancer J. 2014; 20(2):151-155).

[00106] Как правило, CAR отличаются по своим функциональным свойствам. Сигнальный домен CD3 ζ Т-клеточного рецептора, когда он задействован, будет активировать и индуцировать пролиферацию Т-клеток, но может приводить к анергии (отсутствие реакции со стороны защитных механизмов организма, что приводит к прямой индукции толерантности периферических лимфоцитов). Лимфоциты считаются анергическими, когда они не отвечают на специфический антиген. Добавление костимулирующего домена в CAR второго поколения улучшило его репликативную способность и персистенцию модифицированных Т-клеток. Аналогичные противоопухолевые эффекты наблюдаются *in vitro* в случае CAR с CD28 или 4-1BB, но доклинические *in vivo* исследования позволяют предположить, что CAR с 4-1BB могут обуславливать превосходную пролиферацию и/или персистенцию. Клинические испытания позволяют предположить, что оба этих CAR второго поколения способны индуцировать значительную пролиферацию Т-клеток *in vivo*, но CAR, содержащие костимулирующий домен 4-1BB, по-видимому, персистируют дольше. В CAR третьего поколения объединено несколько сигнальных (костимулирующих) доменов для усиления эффективности.

[00107] В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор представляет собой CAR первого поколения. В других вариантах осуществления химерный антигенный рецептор представляет собой CAR второго поколения. В еще одних вариантах осуществления химерный антигенный рецептор представляет собой CAR третьего поколения.

[00108] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный (экто) домен, предусматривающий антигенсвязывающий домен (например, антитело, такое как scFv), трансмембранный домен и цитоплазматический (эндо) домен.

Эктодомен

[00109] Эктодомен представляет собой участок CAR, который подвергается

воздействию внеклеточной жидкости, и, в некоторых вариантах осуществления, он включает антигенсвязывающий домен и необязательно сигнальный пептид, спейсерный домен и/или шарнирный домен. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), который включает VL и VH иммуноглобулинов, соединенные коротким линкерным пептидом. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидрофильные остатки с фрагментами из глицина и серина для гибкости, а также фрагментами из глутамата и лизина для дополнительной растворимости. Одноцепочечный фрагмент из переменных доменов (scFv) в действительности не является фрагментом антитела, а представляет собой слитый белок из переменных областей тяжелой цепи (VH) и легкой цепи (VL) иммуноглобулинов, соединенных коротким линкерным пептидом длиной от десяти до примерно 25 аминокислот. Обычно линкер богат глицином для придания гибкости, а также серином или треонином для обеспечения растворимости и может соединять либо N-конец VH с C-концом VL, либо наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкера. Неограничивающие примеры белковых последовательностей VH и VL, которые можно использовать для создания scFv к PTK7, могут включать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 55, 69, 76 или 83 (VH) и под SEQ ID NO: 56, 70, 77 или 83 (VL). В некоторых вариантах осуществления scFv по настоящему изобретению является гуманизированным. В других вариантах осуществления scFv является полностью человеческим. В других вариантах осуществления scFv представляет собой химеру (например, из мышиной и человеческой последовательности). В некоторых вариантах осуществления scFv представляет собой scFv к PTK7 (специфически связывается с PTK7). Неограничивающие примеры белков scFv к PTK7, которые могут быть использованы, как представлено в данном документе, могут включать аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 54, 68, 75, 82. Могут быть использованы другие белки scFv.

[00110] Сигнальный пептид может усиливать антигенную специфичность связывания CAR. Сигнальные пептиды могут быть получены из антител, таких как без ограничения CD8, а также эпитопных меток, таких как без ограничения GST или FLAG. Примеры сигнальных пептидов включают MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP (SEQ ID NO: 106) и MALPVTALLPLALLHAARP (SEQ ID NO: 93). Могут применяться другие сигнальные пептиды.

[00111] В некоторых вариантах осуществления спейсерный домен или шарнирный домен расположены между внеклеточным доменом (содержащим антигенсвязывающий домен) и трансмембранным доменом CAR или между цитоплазматическим доменом и трансмембранным доменом CAR. Спейсерный домен представляет собой любой олигопептид или полипептид, функции которого заключаются в связывании трансмембранного домена с внеклеточным доменом и/или цитоплазматическим доменом в полипептидной цепи. Шарнирный домен представляет собой любой олигопептид или

полипептид, функции которого заключаются в обеспечении гибкости CAR или его доменов или в предупреждении стерических затруднений у CAR или его доменов. В некоторых вариантах осуществления спейсерный домен или шарнирный домен могут содержать не более 300 аминокислот (например, от 10 до 100 аминокислот или от 5 до 20 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления один или несколько спейсерных доменов могут быть включены в другие участки CAR. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой шарнирный домен CD8. Могут применяться другие шарнирные домены.

Трансмембранный домен

[00112] Трансмембранный домен представляет собой гидрофобную альфа-спираль, которая пронизывает мембрану. Трансмембранный домен обеспечивает стабильность CAR. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR, представленный в данном документе, представляет собой трансмембранный домен CD8. В других вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28. В еще одних вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой химеру из трансмембранного домена CD8 и CD28. Могут применяться другие трансмембранные домены, представленные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD8a

FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG
AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR (SEQ ID NO: 107). Могут применяться другие трансмембранные домены.

Эндодомен

[00113] Эндодомен представляет собой функциональный конец рецептора. После распознавания антигена рецепторы образуют кластер и сигнал передается в клетку. Наиболее часто используемым компонентом эндодомена является CD3-дзета, который содержит три (3) иммунорецепторных мотива активации на основе тирозина (ITAM). Он передает сигнал активации Т-клетке после связывания антигена. Во многих случаях CD3-дзета не может обеспечить полностью компетентный сигнал активации и, таким образом, применяется костимулирующая передача сигнала. Например, для передачи пролиферативного сигнала/сигнала выживания с CD3-дзета (CD3ζ) можно применять CD28 и/или 4-1BB. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления костимулирующая молекула CAR, представленного в данном документе, представляет собой костимулирующую молекулу CD28. В других вариантах осуществления костимулирующая молекула представляет собой костимулирующую молекулу 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления CAR включает CD3ζ и CD28. В других вариантах осуществления CAR включает CD3-дзета и 4-1BB. В других вариантах осуществления CAR включает CD3ζ, CD28 и 4-1BB. В таблице 5 приведены примеры сигнальных молекул, которые можно использовать согласно настоящему раскрытию.

Таблица 5

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
4-1BB	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAAC AACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGA AGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAA GGAGGATGTGAACTG	43
	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC EL	44
CD28	TCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATGAA TATGACTCCTCGCCGGCCTGGGCCGACAAGAAAACATT ACCAACCCTATGCCCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTAC AGGTCC	45
	SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYR S	46
CD3- дзета	CGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCAT ATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAA TTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAA CGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGTAAACCCC GAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACT CCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATA GGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCAC GATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAG ATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCC AGA	47
	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	48

Антитела

[00114] Антитело (взаимозаменяемо используется в форме множественного числа) представляет собой молекулу иммуноглобулина, способную к специфическому связыванию с целью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид и т. д., по меньшей мере через один сайт распознавания антигена, расположенный в вариабельной области молекулы иммуноглобулина. Используемый в данном документе термин "антитело" охватывает не только интактные (т. е. полноразмерные) моноклональные антитела, но также антигенсвязывающие фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), их мутанты, слитые белки, содержащие часть антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, диатела, линейные

антитела, одноцепочечные антитела, однодоменные антитела (например, антитела с VHH верблюда или ламы), мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая включает сайт распознавания антигена с необходимой специфичностью, в том числе варианты гликозилирования антител, варианты аминокислотных последовательностей антител и ковалентно модифицированные антитела.

[00115] Типичная молекула антитела включает переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), которые обычно участвуют в связывании антигена. Эти области/остатки, которые отвечают за связывание антигена, могут быть идентифицированы по аминокислотным последовательностям последовательностей VH/VL эталонного антитела (например, антитела к РТК7, как описано в данном документе) с помощью способов, известных из уровня техники. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, также известные как "определяющие комплементарность области" ("CDR"), перемежающиеся с более консервативными областями, которые известны как "каркасные области" ("FR"). Каждая VH и VL обычно состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Протяженность каркасной области и CDR может быть точно идентифицирована с использованием метода, известного из уровня техники, например, по определению Кабата, по определению Chothia, по определению AbM и/или по контактному определению, все из которых хорошо известны из уровня техники. Как и используется в данном документе, CDR может относиться к CDR, определяемой любым способом, известным из уровня техники. Два антитела, имеющие одинаковые CDR, означают, что эти два антитела имеют одинаковую аминокислотную последовательность этой CDR, как определено одним и тем же способом. См., например, Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, Chothia et al., (1989) *Nature* 342:877; Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917, Al-lazikani et al (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948; и Almagro, *J. Mol. Recognit.* 17:132-143 (2004). См. также hgmp.mrc.ac.uk и bioinf.org.uk/abs.

[00116] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой scFv, такой как scFv к РТК7. Антитело включает антитело любого класса, такого как IgD, IgE, IgG, IgA или IgM (или их подкласса), и антитело не должно относиться к какому-либо конкретному классу. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена его тяжелых цепей антитела иммуноглобулины можно отнести к разным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются альфа,

дельта, эпсилон, гамма и мю соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

[00117] Антитела, подлежащие применению, как представлено в данном документе, могут быть мышинового, крысиного, человеческого или любого другого происхождения (в том числе химерные или гуманизированные антитела). В некоторых примерах антитело содержит модифицированную константную область, такую как константная область, которая является иммунологически инертной, например не запускает опосредованный комплементом лизис или не стимулирует зависимость от антитела цитотоксичность (ADCC).

[00118] В некоторых вариантах осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением представляет собой гуманизированное антитело. Гуманизированные антитела относятся к формам, отличным от человеческих (например, мышинных) антител, которые представляют собой специфические химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулина или его антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат минимальную последовательность, происходящую из отличного от человеческого иммуноглобулина. По большей части гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (реципиентные антитела), в которых остатки из определяющей комплементарности области (CDR) реципиента, заменены остатками из CDR отличных от человеческих видов (донорное антитело), таких как мышь, крыса или кролик, обладающими необходимыми специфичностью, аффинностью и потенциалом. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека заменяются соответствующими отличными от человеческих остатками. Кроме того, гуманизированное антитело может содержать остатки, которых нет ни в реципиентном антителе, ни во вставленных последовательностях CDR или каркасной области, но которые включены для дальнейшего улучшения и оптимизации характеристик антитела. В общем, гуманизированное антитело будет включать по сути все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или по сути все области CDR соответствуют таковым отличного от человеческого иммуноглобулина и все или по сути все области FR являются таковыми из консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело оптимально также будет включать по меньшей мере часть константной области или домена иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина. Другие формы гуманизированных антител имеют одну или несколько CDR (одну, две, три, четыре, пять, шесть), которые изменены по отношению к исходному антителу и которые также называются одной или несколькими CDR, "производными" одной или нескольких CDR из исходного антитела. Гуманизированные антитела могут также быть вовлечены в созревание аффинности.

[00119] В некоторых вариантах осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением представляет собой химерное антитело, которое может включать тяжелую константную область и легкую константную область человеческого антитела. Химерные антитела относятся к антителам, имеющим переменную область

или часть вариабельной области от первого вида и константную область от второго вида. Обычно в этих химерных антителах вариабельная область как легкой, так и тяжелой цепей имитирует вариабельные области антител, происходящих от одного вида млекопитающих (например, отличного от человека млекопитающего, такого как мышь, кролик и крыса), в то время как константные части гомологичны последовательностям в антителах, полученных от другого млекопитающего, такого как человек. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные модификации могут быть сделаны в вариабельной области и/или константной области.

[00120] В некоторых вариантах осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением специфически связывает целевой антиген, такой как человеческий РТК7. Антитело, которое "специфически связывается" (используется в данном документе взаимозаменяемо) с целью или эпитопом, подразумевает термин, хорошо известный из уровня техники, и способы определения такого специфического связывания также хорошо известны из уровня техники. Говорят, что молекула характеризуется "специфическим связыванием", если она реагирует или связывается чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с конкретным целевым антигеном, чем с альтернативными целями. Антитело "специфически связывается" с целевым антигеном, если оно связывается с большей аффинностью, авидностью, легче и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими веществами. Например, антитело, которое специфически (или предпочтительно) связывается с эпитопом РТК7, представляет собой антитело, которое связывает этот эпитоп РТК7 с большей аффинностью, авидностью, легче и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими эпитопами РТК7 или эпитопами, отличными от РТК7. При прочтении этого определения также понятно, что, например, антитело, которое специфически связывается с первым целевым антигеном, может или не может специфически или преимущественно связываться со вторым целевым антигеном. Соответственно, "специфическое связывание" или "преимущественное связывание" не обязательно требует (хотя оно может предусматривать) исключительное связывание. Обычно, но не обязательно, упоминание связывания означает преимущественное связывание.

[00121] В некоторых вариантах осуществления равновесная константа диссоциации (K_D) между антителом и РТК7 составляет от 100 пМ до 1 мкМ. В некоторых вариантах осуществления K_D между антителом и РТК7 составляет от 1 нМ до 100 нМ.

[00122] Также в объем настоящего изобретения входят функциональные варианты любого из иллюстративных антител, раскрытых в данном документе. Функциональный вариант может содержать один или несколько вариантов аминокислотных остатков в VH и/или VL, или в одной или нескольких CDR VH и/или одной или нескольких CDR VL по сравнению с эталонным антителом, сохраняя при этом по сути аналогичное связывание и формы биологической активности (например, практически такую же аффинность связывания, специфичность связывания, ингибирующую активность, противоопухолевую

активность или их комбинацию), как и у эталонного антитела.

[00123] В некоторых примерах раскрытое в данном документе антитело содержит CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, которые в совокупности содержат не более 10 аминокислотных вариаций (например, не более 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной вариации) по сравнению с CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH эталонного антитела, такого как антитело А (VH: SEQ ID NO: 55; VL: SEQ ID NO: 56). "В совокупности" означает, что общее число аминокислотных вариаций во всех из трех CDR VH попадает в определяемый диапазон. В качестве альтернативы или дополнения, антитело может содержать CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, которые в совокупности содержат не более 10 аминокислотных вариаций (например, не более 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной вариации) по сравнению с CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL эталонного антитела.

[00124] В некоторых примерах раскрытое в данном документе антитело может содержать CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, по меньшей мере одна из которых содержит не более 5 аминокислотных вариаций (например, не более 4, 3, 2 или 1 аминокислотной вариации), как у аналогичной CDR VH эталонного антитела, такого как антитело А (VH: SEQ ID NO: 55; VL: SEQ ID NO: 56). В определенных примерах антитело содержит CDR3 VH, которая содержит не более 5 аминокислотных вариаций (например, не более 4, 3, 2 или 1 аминокислотной вариации), как CDR3 VH эталонного антитела, такого как антитело А (VH: SEQ ID NO: 55; VL: SEQ ID NO: 56). В качестве альтернативы или дополнения, антитело может содержать CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, по меньшей мере одна из которых содержит не более 5 аминокислотных вариаций (например, не более 4, 3, 2 или 1 аминокислотной вариации), как у аналогичной CDR VL эталонного антитела. В определенных примерах антитело содержит CDR3 VL, которая содержит не более 5 аминокислотных вариаций (например, не более 4, 3, 2 или 1 аминокислотной вариации), как CDR3 VL эталонного антитела.

[00125] В некоторых случаях вариации аминокислотных остатков могут быть консервативными заменами аминокислотных остатков. Как и используется в данном документе, "консервативная аминокислотная замена" относится к аминокислотной замене, которая не изменяет характеристики относительного заряда или размера белка, в котором выполнена аминокислотная замена. Варианты могут быть получены согласно способам изменения полипептидной последовательности, известным специалисту в данной области, таким как указанные в ссылках, в которых собраны такие способы, например Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 или Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Консервативные замены аминокислот включают замены, выполняемые среди аминокислот в следующих группах: (a) A $\square$ G, S; (b) R $\square$ K, H; (c) N $\square$ Q, H; (d) D $\square$ E, N; (e) C $\square$ S, A; (f) Q $\square$ N; (g) E $\square$ D, Q; (h) G $\square$ A; (i) H $\square$ N, Q; (j) I $\square$ L, V; (k) L $\square$ I, V; (l) K $\square$ R, H; (m) M $\square$ L, I, Y; (n) F $\square$ Y, M, L; (o) P $\square$ A; (p) S $\square$ T; (q) T $\square$ S; (r) W $\square$ Y, F; (s) Y $\square$ W, F и (t) V $\square$ I, L.

[00126] В некоторых вариантах осуществления антитело, раскрытое в данном

документе, может содержать CDR VH, которые в совокупности характеризуются по меньшей мере 80% (например, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичностью с CDR VH эталонного антитела, такого как антитело A (VH: SEQ ID NO: 55; VL: SEQ ID NO: 56). В качестве альтернативы или дополнения, антитело может содержать CDR VL, которые совместно являются на по меньшей мере 80% (например, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичными с CDR VL эталонного антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать VH, которая характеризуется по меньшей мере 80% (например, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичностью с VH эталонного антитела, такого как антитело A (VH: SEQ ID NO: 55; VL: SEQ ID NO: 56), и/или VL, которая характеризуется по меньшей мере 80% (например, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичностью с VL эталонного антитела.

Донорная матрица

[00127] Нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, может быть доставлена в Т-клетку, которая содержит то, что в данном документе называется донорной матрицей (также называемой донорным полинуклеотидом). Донорная матрица может содержать негомологичную последовательность, такую как нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, фланкированную двумя областями гомологии, чтобы обеспечить эффективную HDR в местоположении генома, представляющем интерес. В некоторых вариантах осуществления область гомологии может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 92 или 100. В некоторых вариантах осуществления негомологичная последовательность фланкирована нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 92 и нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 100. В качестве альтернативы, донорная матрица может не иметь областей гомологии с целевым местоположением в ДНК и может быть интегрирована посредством NHEJ-зависимого соединения концов после расщепления в целевом сайте.

[00128] Донорная матрица может представлять собой ДНК или РНК, быть одонитевой и/или двухнитевой, и может быть введена в клетку в линейной или кольцевой форме. При введении в линейной форме концы донорной последовательности можно защитить (например, от экзонуклеолитического разрушения) с помощью способов, известных специалистам в данной области. Например, один или несколько дидезоксинуклеотидных остатков добавляют к 3'-концу линейной молекулы и/или самокомплементарные олигонуклеотиды лигируют с одним или обоими концами. См., например, Chang et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls et al., (1996) Science 272:886-889. Дополнительные способы защиты экзогенных полинуклеотидов от разрушения включают без ограничения добавление концевой(ых) аминокислоты(групп) и использование модифицированных межнуклеотидных связей, таких как, например, фосфоротриатные, фосфорамидатные, и остатки О-метилрибозы или дезоксирибозы.

[00129] Донорная матрица может быть введена в клетку как часть векторной молекулы, имеющей дополнительные последовательности, такие как, например, точки начала репликации, промоторы и гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам. Более

того, донорная матрица может быть введена в виде депротеинизированной нуклеиновой кислоты, в виде комплекса нуклеиновой кислоты со средством, таким как липосома или полксамер, или может быть доставлена вирусами (например, аденовирусом, AAV, вирусом герпеса, ретровирусом, лентивирусом и лентивирусом с дефектом интегразы (IDLV)).

[00130] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица вставляется так, что ее экспрессия управляется эндогенным промотором в сайте интеграции, а именно промотором, который управляет экспрессией эндогенного гена, в который вставлен донор. Однако, в некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит экзогенный промотор и/или энхансер, например конститутивный промотор, индуцируемый промотор или тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления экзогенный промотор представляет собой промотор EF1 α , содержащий последовательность под SEQ ID NO: 101. Могут быть использованы другие промоторы.

[00131] Кроме того, экзогенные последовательности также могут включать транскрипционные или трансляционные регуляторные последовательности, например, промоторы, энхансеры, инсуляторы, внутренние участки посадки рибосомы, последовательности, кодирующие пептиды 2A и/или сигналы полиаденилирования.

[00132] В некоторых вариантах осуществления донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 63, 64, 71, 78 или 91.

Способы доставки и конструкции

[00133] Нуклеазы и/или донорные матрицы могут быть доставлены с использованием векторной системы, включающей без ограничения плазмидные векторы, миникольцевые ДНК, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, поксвирусные векторы, герпесвирусные векторы и аденоассоциированные вирусные векторы и их комбинации.

[00134] Для введения нуклеиновых кислот, кодирующих нуклеазы и донорные матрицы, в клетки (например, Т-клетки) можно использовать традиционные способы переноса генов с участием вирусов и без них. Невирусные векторные системы доставки включают ДНК-плазмиды, миникольцевые ДНК, депротеинизированную нуклеиновую кислоту и нуклеиновую кислоту в комплексе с носителем для доставки, таким как липосома или полксамер. Вирусные векторные системы доставки включают ДНК- и РНК-вирусы, которые после доставки в клетку имеют либо эписомальные, либо интегрированные геномы.

[00135] Способы невирусной доставки нуклеиновых кислот включают электропорацию, липофекцию, микроинъекцию, биолистику, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, поликатион или конъюгаты липида и нуклеиновой кислоты, депротеинизированную ДНК, депротеинизированную РНК, кэпированную РНК, искусственные вирионы и усиленный средством захват ДНК. Сонопорация с использованием, например, системы Sonitron 2000 (Rich-Mar) также может быть использована для доставки нуклеиновых кислот.

Доставка с помощью аденоассоциированного вируса

[00136] Донорная нуклеиновая кислота, кодирующая конструкцию CAR, может быть доставлена в клетку с использованием аденоассоциированного вируса (AAV). AAV представляют собой небольшие вирусы, которые сайтспецифическим образом интегрируются в геном хозяина и поэтому могут доставлять трансген, такой как CAR. Инвертированные концевые повторы (ITR) присутствуют, фланкируя геном AAV и/или представляющий интерес трансген, и служат точками начала репликации. В геноме AAV также присутствуют белки гер и сар, которые при транскрибировании образуют капсиды, которые инкапсулируют геном AAV для доставки в целевые клетки. Поверхностные рецепторы на этих капсидах обеспечивают серотип AAV, который определяет, с какими целевыми органами капсиды будут в первую очередь связываться, и, таким образом, какие клетки будут наиболее эффективно заражаться AAV. В настоящее время известно двенадцать серотипов AAV человека. В некоторых вариантах осуществления AAV представляет собой AAV серотипа 6 (AAV6).

[00137] Аденоассоциированные вирусы входят в число наиболее часто используемых вирусов для генной терапии по нескольким причинам. Во-первых, AAV не вызывают иммунного ответа при введении млекопитающим, включая людей. Во-вторых, AAV эффективно доставляют в целевые клетки, особенно при рассмотрении выбора подходящего серотипа AAV. Наконец, AAV обладают способностью инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, поскольку геном может сохраняться в клетке-хозяине без интеграции. Эта особенность делает их идеальным кандидатом для генной терапии.

Направляемая гомологией репарация (HDR)

[00138] Донорная нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, вставляется путем репарации, направляемой гомологией (HDR), в локус целевого гена. Обе нити ДНК в целевом локусе разрезаются ферментом CRISPR Cas9. Затем происходит HDR для репарации двухнитевого разрыва (DSB) и вставки донорной ДНК. Для того чтобы это происходило правильно, донорная последовательность конструируется с фланкирующими остатками, которые комплементарны последовательности, окружающей сайт DSB в целевом гене (далее "плечи гомологии"). Эти плечи гомологии служат матрицей для репарации DSB и позволяют HDR быть практически безошибочным механизмом. Скорость репарации, направляемой гомологией (HDR), зависит от расстояния между мутацией и сайтом разрезания, поэтому важно выбрать перекрывающиеся или близлежащие сайты-мишени. Матрицы могут включать дополнительные последовательности, фланкированные гомологичными областями, или могут содержать последовательность, которая отличается от геномной последовательности, тем самым обеспечивая возможность ее редактирования.

[00139] Целевой ген может быть ассоциирован с иммунным ответом у субъекта, при этом необратимое удаление по меньшей мере части целевого гена будет модулировать иммунный ответ. Например, для получения Т-клетки с CAR целевой ген может

представлять собой константную область TCR α (TRAC). Нарушение TRAC приводит к потере функции эндогенного TCR.

[00140] В некоторых вариантах осуществления целевой ген находится в локусе "безопасной гавани".

Сконструированные Т-клетки

[00141] Сконструированные (с отредактированным геном) Т-клетки с CAR в соответствии с настоящим изобретением могут быть аутологичными ("своими") или неаутологичными ("чужими", например, аллогенными, сингенными или ксеногенными). Термин "аутологичный" относится к клеткам одного и того же субъекта. Термин "аллогенный" относится к клеткам того же вида, что и субъект, но генетически отличающимся от клеток субъекта. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки получают от субъекта-млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки получают от субъекта-человека.

[00142] Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая без ограничения мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, тимус, ткань из очага инфекции, асциты, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В определенных вариантах осуществления Т-клетки могут быть получены из единицы крови, взятой у субъекта с использованием любого числа способов, известных специалисту в данной области, таких как осаждение, например разделение с помощью FICOLL™.

[00143] В некоторых вариантах осуществления используют выделенную популяцию Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления после выделения мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) как цитотоксические, так и хелперные Т-лимфоциты могут быть отсортированы на субпопуляции необученных, Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток либо до, либо после активации, увеличения количества и/или генетической модификации.

[00144] Специфическая субпопуляция Т-клеток, экспрессирующая один или несколько из следующих маркеров клеточной поверхности: TCR α , CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD38, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD127, CD122, CD95, CD197, CCR7, KLRG1, белки MCH-I и/или белки MCH-II, может быть дополнительно выделена с помощью методик положительного или отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления конкретную субпопуляцию Т-клеток, экспрессирующую один или несколько из маркеров, выбранных из группы, состоящей из TCR α , CD4 и/или CD8, дополнительно выделяют с помощью методик положительного или отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления популяции сконструированных Т-клеток не экспрессируют или по сути не экспрессируют один или несколько из следующих маркеров: CD70, CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, HM3 и LAG3. В некоторых вариантах осуществления субпопуляции Т-клеток могут быть выделены путем положительного или отрицательного отбора до процедуры генной инженерии и/или после процедуры генной инженерии.

[00145] В некоторых вариантах осуществления выделенная популяция Т-клеток экспрессирует один или несколько из маркеров, включающих без ограничения CD3+, CD4+, CD8+ или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки выделяют у субъекта и сначала активируют и стимулируют для пролиферации *in vitro* перед редактированием гена.

[00146] Для достижения достаточных терапевтических доз композиций на основе Т-клеток Т-клетки часто подвергают одному или нескольким циклам стимуляции, активации и/или увеличения количества. Т-клетки могут быть активированы и увеличены в количестве, как правило, с использованием способов, описанных, например, в патентах США 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; и 6,867,041. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют и увеличивают в количестве в течение от приблизительно 1 дня до приблизительно 4 дней, от приблизительно 1 дня до приблизительно 3 дней, от приблизительно 1 дня до приблизительно 2 дней, от приблизительно 2 дней до приблизительно 3 дней, от приблизительно 2 дней до приблизительно 4 дней, от приблизительно 3 дней до приблизительно 4 дней или приблизительно 1 дня, приблизительно 2 дней, приблизительно 3 дней или приблизительно 4 дней до введения редактирующих геном композиций в Т-клетки.

[00147] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют и увеличивают в количестве в течение приблизительно 4 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 24 часов, приблизительно 36 часов, приблизительно 48 часов, приблизительно 60 часов или приблизительно 72 часов до введения редактирующих геном композиций в Т-клетки.

[00148] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют одновременно с введением редактирующих геном композиций в Т-клетки.

[00149] Также предусмотрены популяции сконструированных Т-клеток, которые описаны в данном документе. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере от 25% до 100% сконструированных Т-клеток популяции экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 25% или по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 70% сконструированных Т-клеток популяции экспрессируют CAR. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 25% сконструированных Т-клеток популяции экспрессируют CAR после по меньшей мере 7 или по меньшей мере 14 дней пролиферации *in vitro*.

Способы лечения и композиции

[00150] В некоторых вариантах осуществления представлены способы лечения рака (например, солидных опухолей). Неограничивающие примеры солидных опухолей, которые можно лечить, как предусмотрено в данном документе, включают рак поджелудочной железы, рак желудка, рак яичника, рак матки, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, носоглоточный рак,

немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), нейрональную глиобластому, виды саркомы мягких тканей и/или меланому. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, рака матки, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака яичка, рака щитовидной железы, рака носоглотки, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), нейрональной глиобластомы, видов саркомы мягких тканей, лейкоза, лимфомы, меланомы, рака толстой кишки, аденокарциномы толстой кишки, глиобластомы головного мозга, гепатоклеточной карциномы, гепатохолангиокарциномы печени, остеосаркомы, рака желудка, плоскоклеточной карциномы пищевода, поздних стадий рака поджелудочной железы, аденокарциномы легкого, плоскоклеточной карциномы легкого, мелкоклеточного рака легкого, карциномы почки и рака внутрипеченочных желчных путей. В некоторых вариантах осуществления способы предусматривают доставку Т-клеток с CAR (например, Т-клеток с CAR к Ptk7) согласно настоящему изобретению субъекту с раковым заболеванием (например, солидными опухолями), в том числе раком поджелудочной железы, раком желудка, раком яичника, раком шейки матки, раком молочной железы, раком предстательной железы, раком яичка, раком щитовидной железы, раком носоглотки, немелкоклеточным раком легкого (NSCLC), глиобластомой и/или меланомой. В некоторых вариантах осуществления способы предусматривают доставку Т-клеток с CAR (например, Т-клеток с CAR к PTK7) согласно настоящему изобретению субъекту с лейкозом или лимфомой, например лейкозом или лимфомами Т-клеток, В-клеток, NK-клеток, дендритных клеток. Неограничивающие примеры типов лейкоза включают острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и хронический миелоидный лейкоз (CML).

[00151] Стадия введения может включать размещение (например, трансплантацию) клеток, например, сконструированных Т-клеток, в организме субъекта посредством способа или пути, который приводит к по меньшей мере частичной локализации введенных клеток в необходимом сайте, таком как опухоль, таким образом, что достигается(ются) требуемый(ые) эффект(ы). Сконструированные Т-клетки можно вводить любым подходящим путем, который приводит к доставке в необходимое местоположение в организме субъекта, где по меньшей мере часть имплантированных клеток или компонентов клеток остаются жизнеспособными. Период жизнеспособности клеток после введения субъекту может составлять от такого короткого, как от нескольких часов, например двадцати четырех часов, до нескольких дней, до такого длинного, как несколько лет или даже вся продолжительность жизни субъекта, т. е. при долговременном приживлении. Например, в некоторых аспектах, описанных в данном документе, эффективное количество сконструированных Т-клеток вводят с помощью системного пути введения, такого как внутрибрюшинный или внутривенный путь.

[00152] Субъектом может быть любой субъект, для которого необходим диагноз, лечение или терапия. В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком.

[00153] Донор представляет собой индивидуума, который не является подлежащим лечению субъектом. Донор представляет собой индивидуума, который не является пациентом. В некоторых вариантах осуществления донор является индивидуумом, у которого отсутствует рак, подлежащий лечению, или не имеется подозрение на него. В некоторых вариантах осуществления используют несколько доноров, например два или более доноров.

[00154] В некоторых вариантах осуществления популяция сконструированных Т-клеток, вводимая согласно способам, описанным в данном документе, содержит аллогенные Т-клетки, полученные от одного или нескольких доноров. Термин "аллогенный" означает клетку, популяцию клеток или биологические образцы, содержащие клетки, полученные от одного или нескольких разных доноров из одного и того же вида, в которых гены в одном или нескольких локусах не являются идентичными генам реципиента. Например, популяция сконструированных Т-клеток, вводимая субъекту, может быть получена от одного или нескольких неродственных доноров или от одного или нескольких неидентичных сиблингов. В некоторых вариантах осуществления могут использоваться популяции сингенных клеток, такие как популяции, полученные от генетически идентичных доноров (например, идентичных близнецов). В некоторых вариантах осуществления клетки являются аутологичными клетками; то есть сконструированные Т-клетки получают или выделяют от субъекта и вводят этому же субъекту, т. е. донором и реципиентом является один и тот же субъект.

[00155] В некоторых вариантах осуществления популяция сконструированных Т-клеток, вводимая в соответствии с описанными в данном документе способами, не индуцирует токсичности у субъекта, например, сконструированные Т-клетки не индуцируют токсичность у нераковых клеток. В некоторых вариантах осуществления вводимая популяция сконструированных Т-клеток не запускает опосредованный комплементом лизис или не стимулирует антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC).

[00156] Термин "эффективное количество" означает количество сконструированных Т-клеток в популяции, необходимое для предупреждения или облегчения по меньшей мере одного или нескольких признаков или симптомов медицинского состояния (например, рака), и относится к количеству композиции, достаточному для обеспечения необходимого эффекта, например для лечения субъекта, имеющего медицинское состояние. Эффективное количество также включает количество, достаточное для предупреждения или задержки развития симптома заболевания, изменения хода развития симптома заболевания (например, без ограничения, замедления прогрессирования симптома заболевания) или устранения симптома заболевания. Понятно, что для любого данного случая подходящее эффективное количество может быть определено специалистом в данной области посредством проведения стандартных экспериментов.

[00157] Для применения в различных аспектах, описанных в данном документе,

эффективное количество клеток (например, сконструированных Т-клеток) составляет по меньшей мере 10^2 клеток, по меньшей мере 5×10^2 клеток, по меньшей мере 10^3 клеток, по меньшей мере 5×10^3 клеток, по меньшей мере 10^4 клеток, по меньшей мере 5×10^4 клеток, по меньшей мере 10^5 клеток, по меньшей мере 2×10^5 клеток, по меньшей мере 3×10^5 клеток, по меньшей мере 4×10^5 клеток, по меньшей мере 5×10^5 клеток, по меньшей мере 6×10^5 клеток, по меньшей мере 7×10^5 клеток, по меньшей мере 8×10^5 клеток, по меньшей мере 9×10^5 клеток, по меньшей мере 1×10^6 клеток, по меньшей мере 2×10^6 клеток, по меньшей мере 3×10^6 клеток, по меньшей мере 4×10^6 клеток, по меньшей мере 5×10^6 клеток, по меньшей мере 6×10^6 клеток, по меньшей мере 7×10^6 клеток, по меньшей мере 8×10^6 клеток, по меньшей мере 9×10^6 клеток или имеет величину, кратную этим значениям. Клетки получают от одного или нескольких доноров или получают из аутологичного источника. В некоторых примерах, описанных в данном документе, увеличивают количество клеток в культуре перед введением субъекту, нуждающемуся в этом.

[00158] Способы введения включают инъекцию, инфузию, вкапывание или проглатывание. Инъекция включает без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрижелудочковую, внутрикапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, внутриспинномозговую и внутригрудинную инъекцию и инфузию. В некоторых вариантах осуществления путь является внутривенным.

[00159] В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т-клетки вводят системно, что относится к введению популяции клеток не напрямую в целевой участок, ткань или орган, а таким образом, что вместо этого они достигают кровеносной системы субъекта и, следовательно, подвергаются метаболизму и другим подобным процессам.

[00160] Эффективность лечения, включающего применение композиции для лечения медицинского состояния, может определить квалифицированный врач. Лечение считается "эффективным лечением", если какой-либо один или все признаки или симптомы, в качестве лишь одного примера, уровни функциональной мишени, изменяются благоприятным образом (например, повышаются на по меньшей мере 10%), или происходит облегчение или снижение тяжести других клинически приемлемых симптомов или маркеров заболевания (например, рака). Эффективность также можно измерить по отсутствию ухудшения состояния субъекта, что оценивается по госпитализации или необходимости в медицинских вмешательствах (например, прогрессирование заболевания останавливается или по меньшей мере замедляется). Способы измерения этих показателей известны специалистам в данной области и описаны в данном документе. Лечение включает любое лечение заболевания у субъекта и включает: (1) ингибирование заболевания, например, остановку или замедление

прогрессирования симптомов; или (2) снижение степени проявления заболевания, например вызывание регрессии симптомов; и (3) предупреждение или снижение вероятности развития симптомов.

[00161] Настоящее изобретение проиллюстрировано приведенными ниже вариантами осуществления.

[00162] Вариант осуществления 1. Сконструированная Т-клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), при этом CAR содержит эктодомен, который специфически связывается с РТК7.

[00163] Вариант осуществления 2. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 1, дополнительно содержащая нарушенный ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC).

[00164] Вариант осуществления 3. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 2, где нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, вставлена в нарушенный ген TRAC.

[00165] Вариант осуществления 4. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-3, дополнительно содержащая нарушенный ген бета-2-микроглобулина ($\beta 2M$).

[00166] Вариант осуществления 5. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-4, где эктодомен CAR предусматривает антитело к РТК7.

[00167] Вариант осуществления 6. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 5, где антитело к РТК7 представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) к РТК7.

[00168] Вариант осуществления 7. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 6, где scFv к РТК7 содержит те же определяющие комплементарность области (CDR) вариабельного домена тяжелой (VH) цепи и те же CDR вариабельного домена легкой (VL) цепи, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит (i) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 55, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 56, (ii) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 69, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 70, (iii) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 76, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 77, или (iv) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 83, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 84.

[00169] Вариант осуществления 8. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 7, где scFv к РТК7 содержит те же VH- и VL-цепи, что и эталонное антитело.

[00170] Вариант осуществления 9. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 7, где scFv к РТК7 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 54, 68, 75 или 82.

[00171] Вариант осуществления 10. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 1-9, где CAR содержит костимулирующий домен CD28 или

костимулирующий домен 41BB.

[00172] Вариант осуществления 11. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления 10, где CAR дополнительно содержит цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ .

[00173] Вариант осуществления 12. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 3-11, где ген TRAC содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую LHA и/или RHA в пределах последовательности под любым из SEQ ID NO: 63, 64, 71, 78 или 91, или нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 92 или 100, и/или при этом CAR кодируется нуклеотидной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 49, 51, 65, 72, 79 или 112.

[00174] Вариант осуществления 13. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления 4-12, где нарушенный ген $\beta 2M$ содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательности под любым из SEQ ID NO: 9-14.

[00175] Вариант осуществления 14. Популяция сконструированных Т-клеток по любому из вариантов осуществления 1-13, где по меньшей мере 25% или по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции экспрессируют CAR.

[00176] Вариант осуществления 15. Популяция по варианту осуществления 14, где по меньшей мере 70% сконструированных Т-клеток популяции экспрессируют CAR.

[00177] Вариант осуществления 16. Популяция по вариантам осуществления 14 или 15, где по меньшей мере 25% сконструированных Т-клеток популяции экспрессируют CAR после по меньшей мере 7 или по меньшей мере 14 дней пролиферации *in vitro*.

[00178] Вариант осуществления 17. Популяция по любому из вариантов осуществления 14-16, где по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют белок Т-клеточного рецептора (TCR) на обнаруживаемом уровне.

[00179] Вариант осуществления 18. Популяция по варианту осуществления 17, где по меньшей мере 90% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют белок TCR на обнаруживаемом уровне.

[00180] Вариант осуществления 19. Популяция по любому из вариантов осуществления 14-18, где по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне.

[00181] Вариант осуществления 20. Популяция по варианту осуществления 19, где по меньшей мере 70% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне.

[00182] Вариант осуществления 21. Популяция по любому из вариантов осуществления 14-20, где сконструированные Т-клетки популяции при совместном культивировании *in vitro* с популяцией раковых клеток, которые экспрессируют РТК7, индуцируют клеточный лизис по меньшей мере 10%, по меньшей мере 25% или по меньшей мере 50% раковых клеток популяции.

[00183] Вариант осуществления 22. Популяция по варианту осуществления 21, где

сконструированные Т-клетки популяции при совместном культивировании *in vitro* с популяцией раковых клеток, которые экспрессируют РТК7, индуцируют клеточный лизис по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% популяции раковых клеток.

[00184] Вариант осуществления 23. Популяция по вариантам осуществления 21 или 22, где сконструированные Т-клетки популяции при совместном культивировании *in vitro* с популяцией раковых клеток секретируют IFN γ .

[00185] Вариант осуществления 24. Популяция по любому из вариантов осуществления 21-23, где соотношение сконструированных Т-клеток и раковых клеток составляет от 1:1 до 2:1.

[00186] Вариант осуществления 25. Популяция по любому из вариантов осуществления 21-24, где раковые клетки предусматривают клетки саркомы.

[00187] Вариант осуществления 26. Популяция по любому из вариантов осуществления 21-24, где раковые клетки предусматривают клетки рака молочной железы, клетки рака яичника, клетки мелкоклеточного рака легкого и/или клетки рака толстой кишки.

[00188] Вариант осуществления 28. Популяция по любому из вариантов осуществления 14-27, которая при введении *in vivo* субъекту не индуцирует токсичности у субъекта.

[00189] Вариант осуществления 29. Способ, предусматривающий введение субъекту популяции сконструированных Т-клеток по любому из вариантов осуществления 14-28.

[00190] Вариант осуществления 30. Способ по варианту осуществления 29, где субъект является субъектом-человеком.

[00191] Вариант осуществления 31. Способ по варианту осуществления 30, где у субъекта имеется рак.

[00192] Вариант осуществления 32. Способ по варианту осуществления 31, где рак выбран из группы, состоящей из рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, рака матки, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака яичка, рака щитовидной железы, рака носоглотки, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), нейрональной глиобластомы, видов саркомы мягких тканей, лейкоза, лимфомы, меланомы, рака толстой кишки, аденокарциномы толстой кишки, глиобластомы головного мозга, гепатоклеточной карциномы, гепатохолангиокарциномы печени, остеосаркомы, рака желудка, плоскоклеточной карциномы пищевода, поздних стадий рака поджелудочной железы, аденокарциномы легкого, плоскоклеточной карциномы легкого, мелкоклеточного рака легкого, карциномы почки и рака внутрипеченочных желчных путей.

[00193] Вариант осуществления 33. Способ по вариантам осуществления 31 или 32, где рак характеризуется раковыми клетками, экспрессирующими РТК7.

[00194] Вариант осуществления 34. Способ получения сконструированной Т-

клетки, при этом способ предусматривает (а) доставку в Т-клетку РНК-направляемой нуклеазы, gRNA, нацеливающейся на ген TRAC, и вектора, содержащего донорную матрицу, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, который содержит эктодомен, который специфически связывается с PTK7, и (b) получение сконструированной Т-клетки, имеющей нарушенный ген TRAC и экспрессирующей CAR.

[00195] Вариант осуществления 35. Способ по варианту осуществления 34, где gRNA, нацеливающаяся на ген TRAC, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 18 или 19 или нацелена на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 40.

[00196] Вариант осуществления 36. Способ по вариантам осуществления 34 или 35, где нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, фланкирована левым и правым плечами гомологии в отношении гена TRAC.

[00197] Вариант осуществления 37. Способ по любому из вариантов осуществления 34-36, дополнительно предусматривающий доставку в Т-клетку gRNA, нацеливающейся на ген $\beta 2M$.

[00198] Вариант осуществления 38. Способ по варианту осуществления 37, где gRNA, нацеливающаяся на ген $\beta 2M$, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 20 или 21 или нацелена на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 41.

[00199] Вариант осуществления 39. Способ по любому из вариантов осуществления 34-38, где РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9, необязательно нуклеазу Cas9 *S. pyogenes*.

[00200] Вариант осуществления 40. Способ по любому из вариантов осуществления 34-39, где эктодомен CAR представляет собой антитело к PTK7.

[00201] Вариант осуществления 41. Способ по варианту осуществления 40, где антитело к PTK7 представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) к PTK7.

[00202] Вариант осуществления 42. Способ по варианту осуществления 41, где scFv к PTK7 содержит те же определяющие комплементарность области (CDR) переменного домена тяжелой (VH) цепи и те же CDR переменного домена легкой (VL) цепи, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит (i) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 55, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 56, (ii) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 69, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 70, (iii) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 76, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 77, или (iv) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 83, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 84.

[00203] Вариант осуществления 43. Способ по варианту осуществления 42, где scFv к PTK7 содержит те же VH- и VL-цепи, что и эталонное антитело.

[00204] Вариант осуществления 44. Способ по варианту осуществления 42, где

scFv к РТК7 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 54, 68, 75 или 82.

[00205] Вариант осуществления 45. Способ по любому из вариантов осуществления 34-44, где CAR содержит костимулирующий домен CD28 или костимулирующий домен 41BB.

[00206] Вариант осуществления 46. Способ по варианту осуществления 45, где CAR дополнительно содержит цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ .

[00207] Вариант осуществления 47. Способ по любому из вариантов осуществления 34-46, где донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 63, 64, 71, 78 или 91.

[00208] Вариант осуществления 48. Способ по любому из вариантов осуществления 34-47, где CAR кодируется нуклеотидной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 49, 51, 65, 72, 79 или 112.

[00209] Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано приведенными ниже вариантами осуществления.

[00210] Вариант осуществления A1. Сконструированная Т-клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), при этом CAR содержит эктодомен, который специфически связывается с РТК7.

[00211] Вариант осуществления A2. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления A1, дополнительно содержащая нарушенный ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC).

[00212] Вариант осуществления A3. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления A1 или A2, дополнительно содержащая нарушенный ген бета-2-микроглобулина ($\beta 2M$).

[00213] Вариант осуществления A4. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления A1-A3, где эктодомен CAR предусматривает антитело к РТК7.

[00214] Вариант осуществления A5. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления A4, где антитело к РТК7 представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) к РТК7.

[00215] Вариант осуществления A6. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления A5, где scFv к РТК7 содержит те же определяющие комплементарность области (CDR) переменного домена тяжелой (VH) цепи и те же CDR переменного домена легкой (VL) цепи, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит (i) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 55, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 56, (ii) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 69, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 70, (iii) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 76, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 77, или (iv) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 83, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 84.

[00216] Вариант осуществления A7. Сконструированная Т-клетка по варианту

осуществления A6, где scFv к РТК7 содержит те же VH- и VL-цепи, что и эталонное антитело.

[00217] Вариант осуществления A8. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления A6, где scFv к РТК7 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 54, 68, 75 или 82.

[00218] Вариант осуществления A9. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления A1-A8, где CAR дополнительно содержит костимулирующий домен CD28 или костимулирующий домен 41BB.

[00219] Вариант осуществления A10. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления A9, где CAR дополнительно содержит цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ .

[00220] Вариант осуществления A11. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления A1-A10, где CAR кодируется нуклеотидной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 49, 51, 65, 72, 79 или 112 или нуклеотидной последовательностью, предусматривающей последовательность нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 49, 51, 65, 72, 79 или 112.

[00221] Вариант осуществления A12. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления A1-A11, где нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, вставлена в нарушенный ген TRAC.

[00222] Вариант осуществления A13. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления A2-A12, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую LHA и/или RHA в пределах последовательности под любым из SEQ ID NO: 63, 64, 71, 78 или 91, нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 92 или 100 и/или нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 63, 64, 71, 78 или 91.

[00223] Вариант осуществления A14. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления A1-A13, где нарушенный ген $\beta 2M$ содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательности под любым из SEQ ID NO: 9-14.

[00224] Вариант осуществления A15. Сконструированная Т-клетка, содержащая (i) нарушенный ген TRAC; (ii) нарушенный ген $\beta 2M$ и (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела к РТК7.

[00225] Вариант осуществления A16. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления A15, где CAR содержит (a) эктодомен, который предусматривает антигенсвязывающий фрагмент антитела к РТК7, (b) трансмембранный домен CD8 и (c) эндодомен, который предусматривает костимулирующий домен CD28 и цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ .

[00226] Вариант осуществления A17. Сконструированная Т-клетка по варианту осуществления A15 или A16, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеиновую кислоту,

кодирующую CAR.

[00227] Вариант осуществления A18. Сконструированная Т-клетка, содержащая (i) нарушенный ген TRAC, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, содержащий (a) эктодомен, который предусматривает антигенсвязывающий фрагмент антитела к PTK7, (b) трансмембранный домен CD8 и (c) эндодомен, который предусматривает костимулирующий домен CD28 и цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ ; и (ii) нарушенный ген $\beta 2M$.

[00228] Вариант осуществления A19. Сконструированная Т-клетка, содержащая (i) нарушенный ген TRAC, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 50, 52, 66, 73 или 80; и (ii) нарушенный ген $\beta 2M$.

[00229] Вариант осуществления A20. Сконструированная Т-клетка, содержащая (i) нарушенный ген TRAC, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, где последовательность нуклеиновой кислоты характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с последовательностями под SEQ ID NO: 49, 51, 65, 72, 79 или 112 и кодирует CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50, 52, 66, 73 или 80; и (ii) нарушенный ген $\beta 2M$.

[00230] Вариант осуществления A21. Сконструированная Т-клетка по любому из вариантов осуществления A1-A20, где Т-клетка представляет собой Т-клетку человека.

[00231] Вариант осуществления A22. Популяция клеток, содержащая сконструированную Т-клетку по любому из вариантов осуществления A1-A21, где по меньшей мере 25% или по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции экспрессируют CAR.

[00232] Вариант осуществления A23. Популяция по варианту осуществления A22, где по меньшей мере 70% сконструированных Т-клеток популяции экспрессируют CAR.

[00233] Вариант осуществления A24. Популяция по варианту осуществления A22, где по меньшей мере 25% сконструированных Т-клеток популяции экспрессируют CAR после по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14 дней пролиферации *in vitro*.

[00234] Вариант осуществления A25. Популяция по любому из вариантов осуществления A22-A24, где по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют белок Т-клеточного рецептора (TCR) на обнаруживаемом уровне.

[00235] Вариант осуществления A26. Популяция по варианту осуществления A25, где по меньшей мере 90% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют белок TCR на обнаруживаемом уровне.

[00236] Вариант осуществления A27. Популяция по любому из вариантов осуществления A22-A26, где по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне.

[00237] Вариант осуществления A28. Популяция по варианту осуществления A27, где по меньшей мере 70% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют

белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне.

[00238] Вариант осуществления A29. Популяция по любому из вариантов осуществления A22-A28, где сконструированные Т-клетки популяции при совместном культивировании *in vitro* с популяцией раковых клеток, которые экспрессируют РТК7, индуцируют клеточный лизис по меньшей мере 10%, по меньшей мере 25% или по меньшей мере 50% раковых клеток популяции.

[00239] Вариант осуществления A30. Популяция по варианту осуществления A29, где сконструированные Т-клетки популяции при совместном культивировании *in vitro* с популяцией раковых клеток, которые экспрессируют РТК7, индуцируют клеточный лизис по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% популяции раковых клеток.

[00240] Вариант осуществления A31. Популяция по варианту осуществления A29 или A30, где сконструированные Т-клетки популяции при совместном культивировании *in vitro* с популяцией раковых клеток секретируют $IFN\gamma$.

[00241] Вариант осуществления A32. Популяция по любому из вариантов осуществления A29-A31, где соотношение сконструированных Т-клеток и раковых клеток составляет от 1:1 до 2:1.

[00242] Вариант осуществления A33. Популяция по любому из вариантов осуществления A29-A32, где раковые клетки предусматривают клетки саркомы.

[00243] Вариант осуществления A34. Популяция по любому из вариантов осуществления A29-A32, где раковые клетки предусматривают клетки рака молочной железы, клетки рака яичника, клетки мелкоклеточного рака легкого и/или клетки рака толстой кишки.

[00244] Вариант осуществления A35. Популяция по любому из вариантов осуществления A22-A34, которая при введении *in vivo* субъекту не индуцирует токсичности у субъекта.

[00245] Вариант осуществления A36. Популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат (i) нарушенный ген TRAC; (ii) нарушенный ген $\beta 2M$ и (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела к РТК7.

[00246] Вариант осуществления A37. Популяция клеток по варианту осуществления A36, где CAR содержит (a) эктодомен, который предусматривает антигенсвязывающий фрагмент антитела к РТК7, (b) трансмембранный домен CD8 и (c) эндодомен, который предусматривает костимулирующий домен CD28 и цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ .

[00247] Вариант осуществления A38. Популяция клеток по варианту осуществления A36 или A37, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR.

[00248] Вариант осуществления A39. Популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат (i) нарушенный

ген TRAC, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, содержащий (a) эктодомен, который предусматривает антигенсвязывающий фрагмент антитела к PTK7, (b) трансмембранный домен CD8 и (c) эндодомен, который предусматривает костимулирующий домен CD28 и цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ ; и (ii) нарушенный ген $\beta 2M$.

[00249] Вариант осуществления A40. Популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат (i) нарушенный ген TRAC, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, где последовательность нуклеиновой кислоты характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с последовательностями под SEQ ID NO: 49, 51, 65, 72, 79 или 112 и кодирует CAR с последовательностями под SEQ ID NO: 50, 52, 66, 73 или 80; и (ii) нарушенный ген $\beta 2M$.

[00250] Вариант осуществления A41. Способ, предусматривающий введение субъекту популяции сконструированных Т-клеток по любому из вариантов осуществления A22-A40.

[00251] Вариант осуществления A42. Способ по варианту осуществления A41, где субъект является субъектом-человеком.

[00252] Вариант осуществления A43. Способ по варианту осуществления A42, где у субъекта имеется рак.

[00253] Вариант осуществления A44. Способ по варианту осуществления A43, где рак выбран из группы, состоящей из рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, рака матки, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака яичка, рака щитовидной железы, рака носоглотки, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), нейрональной глиобластомы, видов саркомы мягких тканей, лейкоза, лимфомы, меланомы, рака толстой кишки, аденокарциномы толстой кишки, глиобластомы головного мозга, гепатоклеточной карциномы, гепатохолангиокарциномы печени, остеосаркомы, рака желудка, плоскоклеточной карциномы пищевода, поздних стадий рака поджелудочной железы, аденокарциномы легкого, плоскоклеточной карциномы легкого, мелкоклеточного рака легкого, карциномы почки и рака внутрипеченочных желчных путей.

[00254] Вариант осуществления A45. Способ по варианту осуществления A43 или A44, где рак характеризуется раковыми клетками, экспрессирующими PTK7.

[00255] Вариант осуществления A46. Способ получения сконструированной Т-клетки, при этом способ предусматривает (a) доставку в Т-клетку (i) РНК-направляемой нуклеазы, (ii) gRNA, нацеливающейся на ген TRAC, и (iii) вектора, содержащего донорную матрицу, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, который содержит эктодомен, который специфически связывается с PTK7, и (b) получение сконструированной Т-клетки, имеющей нарушенный ген TRAC и экспрессирующей CAR.

[00256] Вариант осуществления A47. Способ по варианту осуществления A46, где gRNA, нацеливающаяся на ген TRAC, содержит нуклеотидную последовательность под

SEQ ID NO: 18 или 19 или нацелена на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 40.

[00257] Вариант осуществления A48. Способ по варианту осуществления A46 или A47, дополнительно предусматривающий доставку в Т-клетку gRNA, нацеливающейся на ген $\beta 2M$.

[00258] Вариант осуществления A49. Способ по варианту осуществления A48, где gRNA, нацеливающаяся на ген $\beta 2M$, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 20 или 21 или нацелена на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 41.

[00259] Вариант осуществления A50. Способ по любому из вариантов осуществления A46-A49, где эктодомен CAR предусматривает антитело к PTK7.

[00260] Вариант осуществления A51. Способ по варианту осуществления A50, где антитело к PTK7 представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) к PTK7.

[00261] Вариант осуществления A52. Способ по варианту осуществления A51, где scFv к PTK7 содержит те же определяющие комплементарность области (CDR) переменного домена тяжелой (VH) цепи и те же CDR переменного домена легкой (VL) цепи, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит (i) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 55, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 56, (ii) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 69, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 70, (iii) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 76, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 77, или (iv) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 83, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 84.

[00262] Вариант осуществления A53. Способ по варианту осуществления A52, где scFv к PTK7 содержит те же VH- и VL-цепи, что и эталонное антитело.

[00263] Вариант осуществления A54. Способ по варианту осуществления A52, где scFv к PTK7 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 54, 68, 75 или 82.

[00264] Вариант осуществления A55. Способ по любому из вариантов осуществления A46-A54, где CAR дополнительно содержит костимулирующий домен CD28 или костимулирующий домен 41BB.

[00265] Вариант осуществления A56. Способ по варианту осуществления A55, где CAR дополнительно содержит цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ .

[00266] Вариант осуществления A57. Способ по любому из вариантов осуществления A46-A56, где CAR кодируется нуклеотидной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 49, 51, 65, 72, 79 или 112 или нуклеотидной последовательностью, предусматривающей последовательность нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 49, 51, 65, 72, 79 или 112.

[00267] Вариант осуществления A58. Способ по любому из вариантов

осуществления A46-A57, где нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, фланкирована левым и правым плечами гомологии в отношении гена TRAC.

[00268] Вариант осуществления A59. Способ по любому из вариантов осуществления A46-A58, где донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 63, 64, 71, 78 или 91.

[00269] Вариант осуществления A60. Способ по любому из вариантов осуществления A46-A59, где РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9, необязательно нуклеазу Cas9 *S. pyogenes*.

[00270] Вариант осуществления A61. Сконструированная Т-клетка, полученная посредством способа по любому из вариантов осуществления A46-A60.

[00271] Вариант осуществления A62. Популяция клеток, содержащая сконструированную Т-клетку по варианту осуществления A61.

[00272] Вариант осуществления A63. Способ лечения рака у субъекта, предусматривающий введение субъекту популяции клеток по любому из вариантов осуществления A22-A40 или A62.

[00273] Вариант осуществления A64. Способ по варианту осуществления A63, где рак выбран из группы, состоящей из рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, рака матки, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака яичка, рака щитовидной железы, рака носоглотки, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), нейрональной глиобластомы, видов саркомы мягких тканей, лейкоза, лимфомы, меланомы, рака толстой кишки, аденокарциномы толстой кишки, глиобластомы головного мозга, гепатоклеточной карциномы, гепатохолангиокарциномы печени, остеосаркомы, рака желудка, плоскоклеточной карциномы пищевода, поздних стадий рака поджелудочной железы, аденокарциномы легкого, плоскоклеточной карциномы легкого, мелкоклеточного рака легкого, карциномы почки и рака внутривенных желчных путей.

[00274] Вариант осуществления A65. Способ по вариантам осуществления A63 или A64, где рак характеризуется раковыми клетками, экспрессирующими РТК7.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Экспрессия РТК7 в нормальных тканях человека

[00275] Экспрессию РТК7 оценивали на панели замороженной нормальной ткани человека (по стандарту FDA, Biochain) с использованием специального рекомбинантного моноклонального биотинилированного антитела (mAb CTX181, Creative Biolabs, 1 мг/мл, SEQ ID NO: 108 и SEQ ID NO: 109), специфического к конструкции CAR к РТК7, или биотинилированного мышинового изотипического контроля (Novus, NBP2-21948). Препараты фиксировали ацетоном с температурой -20°C в течение 10 мин. при температуре окружающей среды с последующим ручным иммуногистохимическим окрашиванием при температуре окружающей среды. Блокирование с целью минимизации неспецифического окрашивания проводили с помощью реагента Peroxidase 1, авидина и биотина, а также реагента Background Sniper (BioCare Medical, PX968M, AB972L,

BS966M) в последовательных стадиях. Препараты окрашивали биотинилированным первичным моноклональным антителом CTX181 (1:600) в течение 30 мин. с последующей инкубацией с реагентом 4plus Streptavidin-HRP Label (BioCare Medical) в течение 15 мин. для каждого. Визуализацию целевого антигена проводили с помощью субстратного хромогена DAB (бурого цвета) (Dako, K3468). Для контрастирования ядер клеток использовали гематоксилин Майера (Dako, S3309). На фиг. 1 показано, что в нормальных тканях человека экспрессия PTK7 не была распространена.

Последовательности для mAb CTX181

>181_HC (SEQ ID NO: 108)

[00276]

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDGSN
KYYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD DYYGSGSFNSYYGTD
VWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>181_LC (SEQ ID NO: 109)

[00277]

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSIYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPAR
FSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQR SNWPPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT L
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Пример 2. Экспрессия PTK7 в пораженных заболеванием тканях человека

[00278] Экспрессию PTK7 оценивали на фиксированных формалином, залитых в парафин (FFPE) микроматрицах опухолей больных и здоровых пациентов с использованием клона 4F9 мышиногo моноклонального антитела к человеческому PTK7 (EMD Millipore, MABN721) (фиг. 2А и 2В). В таблице 6 перечислены использованные микроматрицы FFPE-тканей (ТМА) от компании US Biomax, Inc. FFPE-срезы запекали в течение 30 мин. при 60°C, удаляли из них парафин и регидратировали. Выделение антигена производили в течение 40 мин. при 95°C в 1X растворе реагента Reveal Decloaker с использованием камеры Decloaker (BioCare Medical). Остальные стадии проводили при температуре окружающей среды. Блокирование с целью минимизации неспецифического окрашивания проводили с помощью реагента Peroxidased 1 (BioCare Medical, PX968M) и реагента Background Sniper (BioCare Medical, BS966M). Препараты окрашивали в течение 60 мин. первичным моноклональным антителом к PTK7 или изотипическим контрольным мышинным IgG (Novus Biologicals, LLC), промывали, а затем окрашивали в течение 30 мин. вторичным козым антителом EnVision, конъюгированным с пероксидазой хрена, к мышинным антителам (Dako, K400111-2). Визуализацию целевого антигена проводили с

помощью субстратного хромогена DAB (бурого цвета) (Dako, K3468). Для контрастирования ядер клеток использовали гематоксилин Майера (Dako, S3309). Препараты сканировали с помощью сканера Panoramic MIDI II (3DHistech, ThermoFisher Scientific) и оценивали с помощью полуколичественной системы оценки, позволяющей оценивать как интенсивность окрашивания (от 1+ до 3+, где 1+ означает низкую экспрессию антигена), так и процент окрашенного участка (1-100%). Результаты были сведены в таблицу, где указаны сводные данные о частоте выявления среди пациентов (фиг. 3). Было показано, что РТК7 экспрессируется в широком спектре форм рака, характеризующихся развитием солидных опухолей.

Таблица 6. FFPE-TMA

Ткань	FFPE-TMA (US Biomax, Inc., название/номер)
Глиобластома головного мозга	GL806f
Гепатоклеточная карцинома	LV631
Гепатохолангиокарцинома печени	LV642
Остеосаркома	OS804c
Рак желудка	ST483e
Рак яичника	OVC962
Плоскоклеточная карцинома пищевода	HEso-Squ127Lym-01
Поздние стадии рака поджелудочной железы	PA1921a
Аденокарцинома легкого	BCS04017b
Плоскоклеточная карцинома легкого	HLug-Squ090Lym-01
Мелкоклеточный рак легкого	BS04116
Рак внутрипеченочных желчных путей	HIBD-Ade100PG-01

Пример 3. Перекрестная реактивность СТХ181 к мышинной/человеческой РТК7

[00279] Для оценки межвидовой перекрестной реактивности специального антитела СТХ181 его аффинность связывания оценивали на клеточных линиях мышинных фибробластов 3T3L1 и мышинных клеток рака молочной железы M158 и сравнивали с его аффинностью связывания на линиях человеческих клеток Saos2 (остеосаркомы), A498 (карциномы почки) и HCC70 (рака молочной железы). Для каждой клеточной линии анализ связывания с подбором доз (200 нМ - 0,0032 нМ конечного антитела СТХ181) в каждой концентрации проводили на 2×10^6 клеток. Клетки окрашивали 30 мин. на льду антителом СТХ181 с последующей промывкой и 15 мин. окрашивания при RT вторичным человеческим антителом IgG-Fc, конъюгированным с флуорофором APC. Клетки

оценивали по окрашиванию на проточном цитометре Novocyte (Acea Biosciences). На фиг. 4 показана эквивалентная аффинность связывания для антитела CTX181 на мышинных и человеческих клеточных линиях.

Пример 4. Экспрессия РТК7 в нормальных тканях человека и мышей

[00280] Экспрессию РТК7 оценивали на панели замороженных нормальных тканей мышей (по стандарту FDA, Biochain; фиг. 5А и 5В), а также на зафиксированной матрице эмбрионального развития мыши (Zyagen; фиг. 6) с использованием CTX181, специфического к конструкции CAR к РТК7, или биотинилированного мышинового изотипического контроля (Novus, NBP2-21948). Препараты фиксировали ацетоном с температурой -20°C в течение 10 мин. при температуре окружающей среды с последующим ручным иммуногистохимическим окрашиванием при температуре окружающей среды. Блокирование с целью минимизации неспецифического окрашивания проводили с помощью реагента Peroxidased 1, авидина и биотина, а также реагента Background Sniper (BioCare Medical, PX968M, AB972L, BS966M) в последовательных стадиях. Препараты окрашивали биотинилированным первичным моноклональным антителом CTX181 (1:300 в случае человеческих; 1:600 в случае мышинных) в течение 30 мин. с последующей инкубацией с реагентом 4plus Streptavidin-HRP Label (BioCare Medical) в течение 15 мин. для каждого. Визуализацию целевого антигена проводили с помощью субстратного хромогена DAB (бурого цвета) (Dako, K3468). Для контрастирования ядер клеток использовали гематоксилин Майера (Dako, S3309).

Пример 5. Получение Т-клеток TRAC⁺/β2M⁺/CAR⁺ к РТК7

[00281] В данном примере описано получение аллогенных человеческих Т-клеток, у которых отсутствует экспрессия гена Т-клеточного рецептора (TCR) (гена, отредактированного в константной области альфа-цепи TCR (TRAC)), гена β2-микроглобулина (β2M) и которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), нацеливающийся на протеин-тирозинкиназу 7 (РТК7) и РТК7⁺ формы рака. Для постановки эксперимента и оценки у Т-клеток TRAC⁺/β2M⁺ производили отдельную экспрессию четырех уникальных CAR к РТК7 (РТК7-4, РТК7-7, РТК7-13 и РТК7-17), содержащих костимулирующие домены CD28. Также получали РТК7-4 с костимулирующим доменом 41BB вместо CD28 (РТК7-4b). В таблице 7 перечислены структуры CAR к РТК7. В таблице 11 перечислены последовательности компонентов CAR к РТК7. В таблице 12 перечислены донорные компоненты.

Таблица 7.

CAR	Структура CAR	SEQ ID NO:
РТК7-4	CD8[сигнальный пептид]-VH-линкер-VL-CD8[tm]-CD28[костимулирующий домен]-CD3ζ	50
РТК7-4b	CD8[сигнальный пептид]-VH-линкер-VL-CD8[tm]-41BB[костимулирующий домен]-CD3ζ	52
РТК7-7	CD8[сигнальный пептид]-VL-линкер-VH-CD8[tm]-	66

	CD28[костимулирующий домен]-CD3 ζ	
PTK7-13	CD8[сигнальный пептид]-VL-линкер-VH-CD8[tm]- CD28[костимулирующий домен]-CD3 ζ	73
PTK7-17	CD8[сигнальный пептид]-VH-линкер-VL-CD8[tm]- CD28[костимулирующий домен]-CD3 ζ	80

[00282] Активированные первичные человеческие Т-клетки подвергали электропорации с RNP-комплексами Cas9:gRNA и векторами на основе аденоассоциированного вируса (AAV) с получением Т-клеток TRAC $^{-}$ β 2M $^{+}$ /CAR $^{+}$ к PTK7. Рекомбинантный AAV серотипа 6 (AAV6), содержащий одну из нуклеотидных последовательностей, кодирующих CAR к PTK7 (SEQ ID NO: 49, 51, 65, 72, 79 или 112), вводили с RNP-молекулами Cas9:sgRNA (1 мкМ Cas9, 5 мкМ gRNA) в активированные аллогенные человеческие Т-клетки. Использовали следующие sgRNA: TRAC (SEQ ID NO: 28) и β 2M (SEQ ID NO: 30). Также можно было использовать немодифицированные версии (или другие модифицированные версии) gRNA (например, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20). См. также таблицу 4.

[00283] Приблизительно через одну (1) неделю после электропорации клетки обрабатывали для проточной цитометрии с целью оценки уровней экспрессии TRAC, β 2M и CAR к PTK7 на клеточной поверхности популяции отредактированных клеток (фиг. 7). В таблице 8 перечислены антитела, которые были использованы. В случае всех Т-клеток с CAR к PTK7 и контрольных клеток TRAC $^{-}$ β 2M $^{+}$, у >90% жизнеспособных клеток отсутствовала экспрессия TCR и у >60% отсутствовала экспрессия β 2M. Клетки, обработанные конструкцией, кодирующей CAR к PTK7-4, имели наиболее высокий процент жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR $^{+}$ к PTK7 (>70%). На экспрессию CAR, судя по всему, оказывает влияние ориентация последовательностей VH и VL в scFV. CAR PTK7-4 отличается от CAR PTK7-7 ориентацией последовательности VH и VL, однако PTK7-7 экспрессировался лишь у <50% популяции жизнеспособных клеток. Т-клетка с CAR к PTK7 с костимулирующим доменом CD28 (PTK7-4) была более эффективной, чем с костимулирующим доменом 4-1BB (PTK7-4b) (фиг. 8).

Таблица 8.

Антитело	Клон	Флуоресцентный краситель	Каталожный №	Разведение
TCR $\alpha\beta$	BW242/412	PE	130-099-661 (Miltenyi)	1:100
β 2M	2M2	FITC	316304 (Biolegend)	1:100
IgG, F(ab') $_2$ - фрагмент, специфический	поликлональный	Биотинилированный; обнаруживаемый с помощью SA-	109-006-097 (Jackson Immuno-	1:20

		APC	research)	
Стрептавидин- APC (SA-APC)	н. д.	APC	17-4317-82 (eBioscience с участием ThermoFisher)	1:100

[00284] **Анализ цитолиза.** Затем использовали анализ цитолиза (цитотоксичности) для оценки способности Т-клеток TRAC⁺/β2M⁺/CAR⁺ к РТК7 вызывать клеточный лизис в линиях прикрепленных клеток саркомы, которые экспрессируют РТК7 (A-204 и Saos-2), и линии клеток рака молочной железы, которые экспрессируют РТК7 (MCF7). Прикрепленные клетки высевали в 96-луночные планшеты в количестве 50000 клеток на лунку и оставляли на ночь при температуре 37°C. На следующий день в лунки, содержащие целевые клетки, вносили Т-клетки в соотношении Т-клетка:целевая клетка 2:1 или 1:1. В качестве отрицательного контроля использовали Т-клетки TRAC⁺/β2M⁺. Спустя примерно 20 часов Т-клетки удаляли из культуры путем аспирации и в каждую лунку планшета вносили 100 мкл реагента Cell titer-Glo (Promega) для оценки количества оставшихся жизнеспособных клеток. Затем с помощью планшет-ридера оценивали количество света, испускаемого из каждой лунки. Т-клетки с CAR к РТК7, особенно клетки, экспрессирующие конструкции РТК7-4, РТК7-7 и РТК7-13, характеризовались сильной цитотоксичностью по отношению к клеточным линиям A-204 (фиг. 9А) и Saos (фиг. 9В). Дополнительно, у Т-клеток с CAR к РТК7, экспрессирующих CAR РТК7-4, наблюдали наиболее высокую цитотоксическую активность в отношении клеточной линии MCF7 (фиг. 9С), которая, как известно, имеет более низкую экспрессию mRNA РТК7, чем тестируемые линии клеток саркомы.

[00285] Клеточная специфичность Т-клеток с CAR РТК7-4 была проиллюстрирована с помощью клеток Saos2, нокаутных (KO) по РТК7 (фиг. 10А), и РТК7-сверхэкспрессирующих клеток линии A498 (фиг. 10В). РТК7 KO клетки линии Saos-2 получали путем введения электропорацией комплексов рибонуклеопротеиновых частиц (RNP) (1 мкМ Cas9 и 5 мкМ gRNA РТК7 (SEQ ID NO: 111; см. таблицу 9)) согласно общеизвестным способам. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии с применением mAb CTX181 (фиг. 10С) в отношении отсутствия экспрессии РТК7 на клеточной поверхности, а затем подвергали размножению. По результатам анализа способом проточной цитометрии было видно, что экспрессия белка снижалась на 88,6%, что указывало на высокоэффективное редактирование генов. In vitro эффективность РТК7 KO клеток линии Saos-2 оценивали в анализе цитотоксичности клеток в сравнении с клетками WT линии Saos-2. На фиг. 10А видно снижение эффективности лизиса РТК7 KO клеток линии Saos2 под действием Т-клеток с CAR к РТК7, что указывало на то, что Т-клетки с CAR были специфичными в отношении РТК7-экспрессирующих целевых клеток.

Таблица 9. Последовательность gRNA к РТК7

Название	Немодифицированная последовательность (подчеркнута спейсерная последовательность gRNA) (SEQ ID NO: 110)	Модифицированная последовательность (SEQ ID NO: 111)
PTK7_T11	<u>CCGCCGCGAUGGGAGCUGCG</u> guuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucsaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUU	C*C*G*CCGCCGCGAUGGGAGCUGCGguuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucsaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU*U*U*U
*: 2'-О-метилфосфотиоатный остаток		

[00286] PTK7-сверхэкспрессирующие клетки линии A498 получали следующим образом. Клетки почечно-клеточной карциномы линии A498 высевали с 60-70% конфлюэнтностью в среду MEM1 α +10% FBS, дополненную 10 мкг/мл полибрена. Исходя из требуемой множественности заражения (MOI), клетки линии A498 трансдуцировали на следующий день лентивирусом, экспрессирующим cDNA humPTK7 (LPP-A6381-Lv225-200, GeneCopoeia, Роквилл, штат Мэриленд, США). Спустя 24-48 часов после заражения лентивирусом среду заменяли на свежую среду, содержащую 4 мкг/мл средства для отбора на основе пурамицина. Обработку пурамицином продолжали в течение 5-7 дней после трансдукции до тех пор, пока из культуры не были удалены все нетрансдуцированные клетки. Экспрессию лентивирусной конструкции humPTK7cDNA оценивали с помощью проточной цитометрии (фиг. 10С) с применением mAb CTX181. In vitro эффективность клеток линии A498, сверхэкспрессирующих cDNA humPTK7, оценивали в анализе цитотоксичности клеток в сравнении с клетками WT линии A498. На фиг. 10В видно увеличение эффективности лизирования Т-клетками с CAR к PTK7 клеток линии A498, сверхэкспрессирующих cDNA humPTK7, по сравнению с клетками WT линии A498, что указывало на то, что Т-клетки с CAR к PTK7 были специфичными в отношении целевых клеток, экспрессирующих антиген PTK7.

Пример 6. In vitro эффективность Т-клеток с CAR к PTK7 на линиях клеток солидных опухолей

[00287] **Анализ цитолиза** Для исследования эффективности на дополнительных линиях опухолевых клеток из базы данных Broad Cancer Cell Line отбирали линии клеток, имеющие высокий, средний и низкий уровень экспрессии PTK7, для форм рака молочной железы, поджелудочной железы и NSCL. Анализ цитолиза (цитотоксичности) использовали для оценки способности Т-клеток TRAC γ / β 2M/CAR $^{+}$ к PTK7 вызывать клеточный лизис у линии прикрепленных клеток саркомы, которые экспрессируют PTK7 (Saos-2), у линий клеток рака молочной железы, которые в разной степени экспрессируют PTK7 (HCC1395, MCF7, HCC1419), у линий клеток поджелудочной железы, которые в разной степени экспрессируют PTK7 (Panc-1, Hs766T, Aspc1), и у линий клеток

немелкоклеточного рака легкого, которые в разной степени экспрессируют PTK7 (NCI-H1975, NCI-H520, NCI-H460). Прикрепленные клетки высевали в 96-луночные планшеты в количестве 50000 клеток на лунку и оставляли на ночь при температуре 37°C. На следующий день в лунки, содержащие целевые клетки, вносили Т-клетки в соотношении Т-клетка:целевая клетка 0,125:1, 0,25:1, 1:1 или 4:1. В качестве отрицательного контроля использовали Т-клетки TRAC⁻/β2M⁻. Спустя примерно 24 часа Т-клетки удаляли из культуры путем аспирации и в каждую лунку планшета вносили 100 мкл реагента CellTiter-Glo (Promega) для оценки количества оставшихся жизнеспособных клеток. Затем с помощью планшет-ридера оценивали количество света, испускаемого из каждой лунки. Экспрессию белка PTK7 оценивали путем окрашивания целевых клеток в течение 30 мин. на льду антителом CTX181 с последующей промывкой и 15 мин. окрашивания при RT вторичным человеческим антителом IgG-Fc, конъюгированным с флуорофором APC. Целевые клетки оценивали по окрашиванию на проточном цитометре Novocyte (Acea Biosciences). На фиг. 11А-11С видно, что Т-клетки с CAR к PTK7 характеризовались цитотоксичностью в отношении всех тестируемых клеточных линий, а их активность *in vitro* имела схожий характер с уровнем экспрессии PTK7 в данных линиях опухолевых клеток.

[00288] Функциональную активность Т-клеток с CAR к PTK7 дополнительно оценивали с помощью анализов высвобождения цитокинов интерферон-гамма (IFNγ) и интерлейкин-2 (IL2). Т-клетки всех тестируемых генотипов в течение 24 часов инкубировали с целевыми клетками при указанных выше соотношениях клеток. Спустя 24 часа собирали надосадочную среду, окружающую клеточный образец, и измеряли уровни IFNγ и IL2 с помощью ELISA (RD Systems), следуя инструкциям производителя. Т-клетки с CAR к PTK7 секретируют IFNγ и IL2 в присутствии линий раковых клеток, экспрессирующих PTK7 (Saos2, HCC1395, MCF7, Panc1, Hs766T, NCI-H520 и NCI-H1975), при их использовании в соотношении Т-клетки:целевые клетки 4:1 или 1:1. У контрольных клеток (TCR⁻/β2M⁻ (без AAV) и неотредактированных (без RNP)) клеток в присутствии любой из перечисленных линий раковых клеток не наблюдали специфического секреторного ответа с высвобождением IFNγ или IL2. В своей совокупности из результатов данных функциональных анализов было видно, что Т-клетки с CAR к PTK7 обладали цитотоксичностью в отношении клеток, экспрессирующих PTK7, и секретируют IFNγ и IL2 в их присутствии.

Пример 7. Функциональные возможности Т-клеток с CAR к PTK7

[00289] Т-Клетки TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ PTK7-4 (также называемые Т-клетками с CAR PTK7-4) получали так, как описано в примере 5. Популяции Т-клеток TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ к CD19 и TRAC⁻/β2M⁻ Т-клеток получали аналогичным способом для их использования в качестве контролей. После получения посредством трансфекции отредактированных Т-клеток проверяли способность всех отредактированных типов клеток и неотредактированных Т-клеток пролиферировать в течение 7 дней. Для каждого генотипа Т-клеток высевали 5×10⁶ клеток. Причем, и как показано на фиг. 12, Т-клетки TRAC⁻/β2M⁻

/CAR⁺ PTK7-4 были способны пролиферировать со скоростью и на уровнях, которые были сравнимы со всеми контрольными экспериментами. После 7 дней клеточной пролиферации образец каждого генотипа, подлежащего введению инъекцией в мышинные модели, замораживали в cyrostor10 и хранили в жидком азоте. Оставшиеся клетки с каждым из генотипов оставляли продолжать пролиферировать до наступления 14 дня после редактирования. Причем, и как видно на фиг. 13А-13В, процент жизнеспособных клеток с генетическим редактированием TCR, β 2М и CAR оставался неизменным, начиная с 7 дня и по 14 день после редактирования. На фиг. 13С-13D видно, что в последующих экспериментах 70,9% клеток экспрессировали конструкцию CAR PTK7-4, при этом у 98% клеток был TRAC КО фенотип, а у 97% клеток был β 2М КО фенотип. Экспрессию CAR к CD19 обнаруживали с применением первичного биотинилированного поликлонального антитела к мышинному FАВ с последующим применением конъюгата стрептавидин-АРС; экспрессию CAR к PTK7 обнаруживали с применением конъюгата РЕ и антитела к PTK7 (Miltenyi, № по кат. 130-091-364) (фиг. 14А и 14D).

[00290] Функциональную активность Т-клеток с CAR PTK7-4 проверяли с помощью анализа цитотоксичности прикрепленных клеток, который описан в примере 5. Т-клетки с CAR PTK7-4 (CAR к PTK7) были способны вызывать цитотоксичность PTK7-экспрессирующих клеток линий Saos-2 и MCF7 при их применении в соотношении Т-клетки:целевые клетки 1:1 или 2:1. У контрольных клеток (TCR⁻/ β 2М⁻ (без AAV); TCR⁻/ β 2М⁻/CAR к CD19 (CAR к CD19) и неотредактированных (без RNP)) не наблюдали специфической цитотоксичности ни в отношении клеток линии Saos-2, ни в отношении клеток линии MCF7 (фиг. 14В и 14Е).

[00291] Функциональную активность Т-клеток с CAR PTK7-4 дополнительно оценивали с помощью анализа высвобождения цитокинов (интерферона-гамма/IFN γ). Т-клетки всех тестируемых генотипов в течение 24 часов инкубировали с целевыми клетками (клетками линий Saos-2 и MCF7) в соотношении клеток 1:1 и 2:1. Спустя 24 часа собирали надосадочную среду, окружающую клеточный образец, и измеряли уровни IFN γ с помощью ELISA (RD Systems), следуя инструкциям производителя. Т-клетки с CAR PTK7-4 (CAR к PTK7) секретировали IFN γ в присутствии PTK7-экспрессирующих клеток линий Saos-2 и MCF7 при их применении в соотношении Т-клетки:целевые клетки 1:1 или 2:1. У контрольных клеток (TCR⁻/ β 2М⁻ (без AAV); TCR⁻/ β 2М⁻/CAR⁺ к CD19 (CAR к CD19) и неотредактированных (без RNP)) не наблюдали специфического секреторного ответа с высвобождением IFN γ ни в присутствии клеток линии Saos-2, ни в присутствии клеток линии MCF7 (фиг. 14С и 14F).

[00292] В своей совокупности из результатов данных функциональных анализов было видно, что Т-клетки с CAR к PTK7 обладали цитотоксичностью в отношении клеток, экспрессирующих PTK7, и секретировали IFN γ в их присутствии.

Пример 8. Анализ *in vitro* цитотоксичности

[00293] Для оценки эффективности *in vitro* Т-клеток с CAR к PTK7 в отношении мышинных клеток, т. е. фибробластов линии 3Т3L1 и клеток рака молочной железы линии

M158, проводили анализ 24-часовой цитотоксичности. Результаты сравнивали с эффективностью Т-клеток с CAR к PTK7 в отношении лизиса клеток линии Saos2 остеосаркомы человека и линии A498 почечно-клеточной карциномы человека. Прикрепленные клетки высевали в 96-луночные планшеты в количестве 50000 клеток на лунку и оставляли на ночь при температуре 37°C. На следующий день в лунки, содержащие целевые клетки, вносили Т-клетки в соотношении Т-клетка:целевая клетка 0,125:1, 0,25:1, 1:1 или 4:1. В качестве отрицательного контроля использовали Т-клетки TRAC β 2M γ . Спустя примерно 24 часа Т-клетки удаляли из культуры путем аспирации и в каждую лунку планшета вносили 100 мкл реагента CellTiter-Glo (Promega) для оценки количества оставшихся жизнеспособных клеток. Затем с помощью планшет-ридера оценивали количество света, испускаемого из каждой лунки. Т-клетки с CAR к PTK7 одинаково хорошо демонстрировали цитотоксичность в отношении линии Saos2 человеческих клеток и линии 3T3L1 мышинных клеток (фиг. 15). В отличие от этого, человеческие клетки линии A498 и мышинные клетки линии M158 не подвергались лизису в присутствии Т-клеток с CAR к PTK7, поскольку в этих 2 клеточных линиях уровни экспрессии PTK7 были низкими.

Пример 9. Переносимость Т-клеток с CAR к PTK7 на мышинных моделях

[00294] Тестировали способность мышей NOG переносить обработку путем инъекции Т-клеток TRAC β 2M γ /CAR β PTK7-4. Двум мышам NOG вводили 10 миллионов Т-клеток TRAC β 2M γ /CAR PTK7-4 (полученных так, как описано выше); двум дополнительным мышам вводили 10 миллионов Т-клеток с CAR к CD19. Все Т-клетки с CAR вводили путем инъекции в хвостовую вену.

[00295] Мышей ежедневно взвешивали и отслеживали на предмет дистресса или состояния агонии. У мышей, обработанных Т-клетками с CAR к PTK7, наблюдали минимальную потерю массы, что было схоже с мышами, обработанными Т-клетками с CAR к CD19 (фиг. 16). Спустя период в десять дней после инъекции животных умерщвляли и анализировали образцы крови и селезенки на наличие человеческих Т-клеток (человеческих CD45 $^{+}$ клеток). Как в селезенке, так и в крови у мышей, обработанных Т-клетками с CAR к PTK7, были более высокие уровни отредактированных Т-клеток с CAR (huCD45 $^{+}$ клеток), чем у мышей, обработанных Т-клетками с CAR к CD19 (таблица 10), что позволяло предположить, что Т-клетки с CAR к PTK7 будут размножаться в присутствии мышинного антигена.

Таблица 10. Процент человеческих CD45 $^{+}$ клеток ((huCD45 $^{+}$ /muCD45 $^{+}$)*100) у мышей, обработанных Т-клетками с CAR к PTK7 и к CD19

	PTK7		CD19	
	Мышь 1	Мышь 2	Мышь 1	Мышь 2
Селезенка	8,56	10,01	0,58	0,82
Кровь	18,47	15,13	0,42	0,93

[00296] В совокупности временная потеря массы тела и более высокие уровни Т-

клеток с CAR у мышей, обработанных CAR к РТК7, позволяли предположить, что CAR к РТК7 распознавал антиген у мышей, что приводило к пролиферации Т-клеток с CAR. Общее отсутствие значительной токсичности было неожиданным и указывало на то, что известная целевая/нетканевая токсичность, связанная с нацеливанием на РТК7, была переносимой у мышей и, кроме того, может быть переносимой и у людей.

Пример 10. Эффективность *in vivo* Т-клеток с CAR к РТК7 на мышинных ксенотрансплантатных моделях

[00297] Эффективность Т-клеток с CAR к РТК7 тестировали *in vivo* на мышинных ксенотрансплантатных моделях опухоли яичника человека SKOV-3, немелкоклеточного рака легкого человека NCI-H1975 и поджелудочной железы человека Hs766T. На фиг. 17 показаны уровни экспрессии РТК7 на клеточной поверхности у линий раковых клеток человека при применении Ab CTX181. В случае каждой ксенотрансплантатной модели 5 самкам (5-8 недель) мышей NOG вводили однократную IV дозу в единый момент времени (5×10^7 клеток/мл) Т-клеток TRAC β 2M/CAR к РТК7 (полученных так, как описано выше). Конечными точками, измеряемыми в ходе исследования, были масса тела (2х в неделю) и объем опухоли. Мышам вводили дозу Т-клеток с CAR к РТК7, когда опухоли (клеточные линии, введенные инъекцией подкожно в правый бок) достигали 50 мм. Исследования прекращали, когда опухоли достигали конечного размера (1000 мм в случае SKOV3 (яичника), 2000 мм в случае NCI-H1975 (NSCLC) и Hs766T (поджелудочной железы)) или через 90 дней, в зависимости от того, что наступало раньше. Мышей содержали и отслеживали в апиригенных условиях и в соответствии со стандартами IACUC. Т-клетки с CAR к РТК7 были эффективны во всех трех ксенотрансплантатных моделях (ксенотрансплантатной модели немелкоклеточного рака легкого NCI-H1975 (фиг. 18A), ксенотрансплантатной модели рака яичника SKOV3 (фиг. 18B) и ксенотрансплантатной модели рака поджелудочной железы Hs766T (фиг. 18C)).

Пример 11. Эффективность *in vivo* Т-клеток с CAR к РТК7 на мышинных ксенотрансплантатных моделях

[00298] Эффективность Т-клеток с CAR к РТК7 тестировали *in vivo* на мышинных ксенотрансплантатных моделях опухоли яичника человека OV90, OVCAR3, A2780, молочной железы человека MCF7, HCC70, толстой кишки человека HCT116 и мелкоклеточного рака легкого человека H209. В случае каждой ксенотрансплантатной модели 5 самкам (5-8 недель) мышей NOG вводили однократную IV дозу в единый момент времени (5×10^7 клеток/мл) Т-клеток TRAC β 2M/CAR к РТК7 (полученных так, как описано выше). Конечными точками, измеряемыми в ходе исследования, были масса тела (2х в неделю) и объем опухоли. Мышам вводили дозу Т-клеток с CAR к РТК7, когда опухоли (клеточные линии, введенные подкожно в правый бок) достигали 50 мм. Исследования прекращали, когда опухоли достигали конечного размера (2000 мм) или через 90 дней, в зависимости от того, что наступало раньше. Мышей содержали и отслеживали в апиригенных условиях и в соответствии со стандартами IACUC. На фиг. 19A показана эффективность Т-клеток с CAR к РТК7 в отношении ксенотрансплантатной

модели опухоли яичника OV90. На фиг. 19В показана эффективность Т-клеток с CAR к РТК7 в отношении ксенотрансплантатной модели опухоли толстой кишки НСТ116. На фиг. 19С показано, что Т-клетки с CAR к РТК7 были особенно эффективны в ксенотрансплантатных моделях опухоли MCF7. На фиг. 20 показан процент изменения массы тела у ксенотрансплантатной модели опухоли поджелудочной железы Hs-766T, обработанной Т-клетками с CAR к РТК7. Эквивалентные проценты изменения массы тела наблюдали во всех исследованиях по измерению ксенотрансплантатов. Латентная токсичность характеризовалась варьированием у ксенотрансплантатных моделей.

Таблица 11. Компоненты CAR

Структура CAR

[00299] CD8[сигнальный пептид]-антитело к Pkt7[scFV]-CD8[tm]-CD28[костимулирующий домен]-CD3ζ или
[00300] CD8[сигнальный пептид]-антитело к Pkt7[scFV]-CD8[tm]-41BB[костимулирующий домен]-CD3ζ

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
РТК7-4		
CAR PKT7-4 Костим. CD28	ATGGCGCTGCCGGTGACCGCGCTGCTGCTGCCGCTG GCGCTGCTGCTGCATGCGGCGCGCCCGCAGGTGCAG CTGGTGGAAAGCGGCGGGCGGCGTGGTGCAGCCGGG CCGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGCTT TACCTTTAGCAGCTATGGCATGCATTGGGTGCGCCA GGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGGCGGTGA TTTGGGATGATGGCAGCAACAAATATTATGTGGATA GCGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATAACA GCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGC GCGCGGAAGATAACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCG ATGATTATTATGGCAGCGGCAGCTTTAACAGCTATT ATGGCACCGATGTGTGGGGCCAGGGCACCAACCGTGA CCGTGAGCAGCGGCGGCGGCGGCGAGCGGCGGCGGC GGCAGCGGCGGCGGCGGCGGCGAGCGAAATTGTGCTGAC CCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGAGCCCGGGCGA ACGCGCGACCCTGAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCGT GAGCATTTATCTGGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGG CCAGGCGCCGCGCCTGCTGATTTATGATGCGAGCAA CCGCGCGACCGGCATTCCGGCGCGCTTTAGCGGCAG	49

	CGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATTAGCAG CCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTATTATTGCCA GCAGCGCAGCAACTGGCCGCCGTTTACCTTTGGCCC GGGCACCAAAGTGGATATTAAGCGCGGCGGCGTT TGTGCCGGTGTCTTCTGCCGGCGAAACCGACCACCAC CCCGGCGCCGCGCCCGCCGACCCCGGCGCCGACCAT TGCGAGCCAGCCGCTGAGCCTGCGCCCGGAAGCGTG CCGCCCCGGCGGGCGGGCGGGCGGGTGCATACCCGCGG CCTGGATTTTGCCTGCGATATTTATATTTGGGCGCCG CTGGCGGGCACCTGCGGCGTGCTGCTGCTGAGCCTG GTGATTACCCTGTATTGCAACCATCGCAACCGCAGC AAACGCAGCCGCCTGCTGCATAGCGATTATATGAAC ATGACCCCGCGCCGCCCCGGGCCCCGACCCGCAAACAT TATCAGCCGTATGCGCCGCCGCGCGATTTTGCGGCG TATCGCAGCCGCGTGAAATTTAGCCGCAGCGCGGAT GCGCCGGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTAT AACGAACTGAACCTGGGCCGCCGCGAAGAATATGAT GTGCTGGATAAACGCCGCGGCCGCGATCCGGAAATG GGCGGCAAACCGCGCCGCAAAAACCCGCAGGAAGG CCTGTATAACGAACTGCAGAAAGATAAAATGGCGG AAGCGTATAGCGAAATTGGCATGAAAGGCGAACGC CGCCGCGGCAAAGGCCATGATGGCCTGTATCAGGGC CTGAGCACCGCGACCAAAGATACCTATGATGCGCTG CATATGCAGGCGCTGCCGCCGCGC	
CAR PKT7-4 Костим. CD28	ATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGG CGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGCAGGTGCAGC TGGTGGAGAGCGGCGGAGGAGTGGTGCAACCCGGA AGGTCCCTGAGGCTCTCCTGTGCCGCCAGCGGCTTCA CCTTCTCCAGCTACGGTATGCACTGGGTGAGACAAG CCCCCGGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGCCGTGATCT GGGATGATGGCTCCAACAAGTACTACGTGGACAGCG TCAAGGGCAGATTACCATCAGCAGGGACAACAGCA AGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAG CCGAAGACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAGGGACG ACTACTATGGCTCCGGCTCCTTCAATAGCTACTATGG	112

	CACCGACGTGTGGGGCCAGGGCACACAGTGACAGT GAGCAGCGGCGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGAA GCGGAGGAGGAGGAAGCGAGATCGTGCTGACACAG TCCCCGCTACCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGAGAGA GCTACCCTGAGCTGCAGAGCCAGCCAGAGCGTCTCC ATCTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAG GCCCCTAGACTGCTGATCTACGACGCCAGCAACAGG GCCACCGGCATTTCCTGCCAGATTCAGCGGCTCCGGC TCCGGCACCGATTTACACTGACCATCAGCTCCCTGG AGCCTGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCCAGCAGA GGAGCAACTGGCCCCCCTTTACCTTCGGCCCCGGCA CCAAGGTCGACATCAAGAGTGCTGCTGCCTTTGTCCC GGTATTTCTCCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGC CCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCT CAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCG CCGCCGGGGGTGCTGTTTCATACGAGGGGCTTGGACT TCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGG TACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTGCACTCGTTATTACTT TGTATTGTAATCACAGGAATCGCTCAAAGCGGAGTA GGTTGTTGCATTCCGATTACATGAATATGACTCCTCG CCGGCCTGGGCCGACAAGAAAACATTACCAACCCTA TGCCCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCCCG AGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATA TCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAA TTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAA ACGCCGGGGGAGAGACCCGGAATGGGGGGTAAAC CCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATG AACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAG AAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAA GGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCA ACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCC CTGCCTCCCAGA	
CAR PKT7-4 Костим. CD28	MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLVESGGGVVQPGR SLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIW DDGSNKYYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE	50

	DTAVYYCARDDYYGSGSFNSYYGTDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSIYLAWEYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTF GPGTKVDIKSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT CGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLHSDYMNMTPRRP GPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
CAR PKT7-4b Костим. 41BB	ATGGCGCTGCCGGTGACCGCGCTGCTGCTGCCGCTG GCGCTGCTGCTGCATGCGGCGCGCCCGCAGGTGCAG CTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCGTGGTGCAGCCGGG CCGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGCTT TACCTTTAGCAGCTATGGCATGCATTGGGTGCGCCA GGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGGCGGTGA TTTGGGATGATGGCAGCAACAAATATTATGTGGATA GCGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATAACA GCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGC GCGCGGAAGATAACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCG ATGATTATTATGGCAGCGGCAGCTTTAACAGCTATT ATGGCACCGATGTGTGGGGCCAGGGCACCAACCGTGA CCGTGAGCAGCGGCGGCGGCGGCGAGCGGCGGCGGC GGCAGCGGCGGCGGCGGCGGCGAGCGAAATTGTGCTGAC CCAGAGCCCGGCGACCCCTGAGCCTGAGCCCGGGCGA ACGCGCGACCCCTGAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCGT GAGCATTTATCTGGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGG CCAGGCGCCGCGCCTGCTGATTTATGATGCGAGCAA CCGCGCGACCGGCATTCCGGCGCGCTTTAGCGGCAG CGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATTAGCAG CCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTATTATTGCCA GCAGCGCAGCAACTGGCCGCCGTTTACCTTTGGCCC GGGCACCAAAGTGGATATTTAAAGCGCGGCGGCGTT TGTGCCGGTGTTTCTGCCGGCGAAACCGACCACCAC	51

	CCCGGCGCCGCGCCCGCCGACCCCGGCGCCGACCAT TGCGAGCCAGCCGCTGAGCCTGCGCCCGGAAGCGTG CCGCCCGGGCGGGCGGGCGGGTGCATACCCGCGG CCTGGATTTTTCGTGCGATATTTATATTTGGGCGCCG CTGGCGGGCACCTGCGGCGTGCTGCTGCTGAGCCTG GTGATTACCCTGTATTGCAACCATCGCAACCGCAAA CGCGGCCGCAAAAAACTGCTGTATATTTTAAACAG CCGTTTATGCGCCCGGTGCAGACCACCCAGGAAGAA GATGGCTGCAGCTGCCGCTTCCGGAAGAAGAAGAA GGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTTAGCCGCAGC GCGGATGCGCCGGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCA GCTGTATAACGAACTGAACCTGGGCCGCGCGAAGA ATATGATGTGCTGGATAAACGCGCGGCCGCGATCC GGAAATGGGCGGCAAACCGCGCCGCAAAAACCCGC AGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGATAAA ATGGCGGAAGCGTATAGCGAAATTGGCATGAAAGG CGAACGCCGCGCGGCAAAGGCCATGATGGCCTGTA TCAGGGCCTGAGCACCGCGACCAAAGATACCTATGA TCGCTGCATATGCAGGCGCTGCCGCCGCGC	
CAR PKT7-4b Костим. 41BB	MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLVESGGGVVQPGR SLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIW DDGSNKYYYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTA VYYCARD DYYGSGSFNSYYGTDVWGQGTTVTVS SGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSIYLA WYQQKPGQAPRL LIYDASN RATGIPA RFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQR SNWPPFTF GPGTKVDIKSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIA S QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT CGVLLLSLVITLYCNHRNRKRGRKKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKPRR KNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	52
scFv PTK7-4	CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCGTGGT GCAGCCGGGCCGCGAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGC	53

	GAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCTATGGCATGCATTG GGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGG TGGCGGTGATTTGGGATGATGGCAGCAACAAATATT ATGTGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAGCC GCGATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGA ACAGCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATT GCGCGCGCGATGATTATTATGGCAGCGGCAGCTTTA ACAGCTATTATGGCACCGATGTGTGGGGCCAGGGCA CCACCGTGACCGTGAGCAGCGGCGGCGGCGGCAGC GGCGGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGAAAT TGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGAG CCCGGGCGAACGCGCGACCCTGAGCTGCCGCGCGAG CCAGAGCGTGAGCATTTATCTGGCGTGGTATCAGCA GAAACCGGGCCAGGCGCCGCGCCTGCTGATTTATGA TGCGAGCAACCGCGCGACCGGCATTCCGGCGCGCTT TAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAC CATTAGCAGCCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTA TTATTGCCAGCAGCGCAGCAACTGGCCGCCGTTTAC CTTTGGCCCCGGGCACCAAAGTGGATATTAAA	
scFv PTK7-4	CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCGTGGTG CAGCCGGGGCCGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCG AGCGGCTTTACCTTTAGCAGCTATGGCATGCATTGGG TGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGG CGGTGATTTGGGATGATGGCAGCAACAAATATTATG TGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCG ATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCG CGCGCGATGATTATTATGGCAGCGGCAGCTTTAACA GCTATTATGGCACCGATGTGTGGGGCCAGGGCACCA CCGTGACCGTGAGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGC GGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGAAATTGT GCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGAGCCC GGGCGAACGCGCGACCCTGAGCTGCCGCGCGAGCCA GAGCGTGAGCATTTATCTGGCGTGGTATCAGCAGAA ACCGGGCCAGGCGCCGCGCCTGCTGATTTATGATGC	113

	GAGCAACCGCGCGACCGGCATTCCGGCGCGCTTTAG CGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCAT TAGCAGCCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTATTA TTGCCAGCAGCGCAGCAACTGGCCGCCGTTTACCTTT GGCCCGGGCACCAAAGTGGATATTTAAA	
scFv PTK7-4 (линкер подчеркнут)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWV RQAPGKGLEWVAVIWDDGSNKYYVDSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDDYYGSGSFNS <u>YYGTDVWGQGT</u> TVTVSS <u>GGGGSGGGGSGGGGSEIVLT</u> QSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSIYLA WYQQKPGQA PRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDF AVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK	54
VH scFv PTK7-4 жирным выделены CDR	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHW VRQAPGKGLEWVAVIWDDGSNKYYVDSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDDYYGSGSFN SYYGTDVWGQGT TVTVSS	55
VL scFv PTK7-4 жирным выделены CDR	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSIYLA WYQQ KPGQAPRLLIY DASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISL EPEDFAVYYC QQRSNWPPFT FGPGTKVDIK	56
PTK7-4 CDR1 VH	SYGMH	57
PTK7-4 CDR2 VH	VIWDDGSNKYYVDSVKG	58
PTK7-4 CDR3 VH	DDYYGSGSFNSYYGTDV	59
PTK7-4 CDR1 VL	RASQSVSIYLA	60
PTK7-4 CDR2 VL	DASN RAT	61
PTK7-4 CDR3 VL	QQRSNWPPFT	62

PTK7-4 Донор LHA-RHA	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCT TATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGC AGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATG AGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCA ACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCCCATTCTGCT AATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATT CCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCC ATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGG GTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGC AGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTCCTTG AGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGA AATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGC CTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGT TTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACC GTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTC ATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCA AAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCT CTTGTCACACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCG TGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGT CTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAA TGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCAC AGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTT CAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACAT CGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTC GGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGG GGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCG CCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAG TGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGG GTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGG TTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTATGGCCCT TGCGTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGTACGT GATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTG GGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTC GCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTG GGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGC	63
-------------------------------------	--	-----------

CTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTAA
 AATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGC
 AAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACA
 CTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACG
 GGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGC
 GGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGG
 GGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCT
 GGCTTCGCGCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCG
 GCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCG
 GAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGC
 TCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGC
 GGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCC
 GTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTA
 CCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAG
 CTTTTGGAGTACGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGG
 GTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGT
 GGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTA
 ATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTT
 GGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT
 TTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGACCACCATGGCGC
 TTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTGTT
 GCTCCACGCAGCAAGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGA
 GAGCGGCGGAGGAGTGGTGCAACCCGGAAGGTCCC
 TGAGGCTCTCCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCTC
 CAGCTACGGTATGCACTGGGTGAGACAAGCCCCCGG
 AAAGGGCCTCGAGTGGGTGGCCGTGATCTGGGATGA
 TGGCTCCAACAAGTACTACGTGGACAGCGTCAAGGG
 CAGATTCACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACA
 CCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAAG
 ACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAGGGACGACTACT
 ATGGCTCCGGCTCCTTCAATAGCTACTATGGCACCG
 ACGTGTGGGGCCAGGGCACACAGTGACAGTGAGC
 AGCGGCGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGAAGCGG
 AGGAGGAGGAAGCGAGATCGTGCTGACACAGTCCC
 CCGCTACCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGAGAGAGCTA

CCCTGAGCTGCAGAGCCAGCCAGAGCGTCTCCATCT
 ACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAGGCCC
 CTAGACTGCTGATCTACGACGCCAGCAACAGGGCCA
 CCGGCATTCTGCCAGATTCAGCGGCTCCGGCTCCG
 GCACCGATTTACACTGACCATCAGCTCCCTGGAGC
 CTGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCCAGCAGAGGA
 GCAACTGGCCCCCTTTACCTTCGGCCCCGGCACCA
 AGGTCGACATCAAGAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGG
 TATTTCTCCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCC
 CGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCA
 ACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGC
 CGCCGGGGGTGCTGTTCATACGAGGGGCTTGGACTT
 CGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGT
 ACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTGCTCGTTATTACTT
 TGTATTGTAATCACAGGAATCGCTCAAAGCGGAGTA
 GGTTGTTGCATTCCGATTACATGAATATGACTCCTCG
 CCGGCCTGGGCCGACAAGAAAACATTACCAACCCTA
 TGCCCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCCCG
 AGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATA
 TCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAA
 TTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAA
 ACGCCGGGGGAGAGACCCGAAATGGGGGGTAAAC
 CCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAAT
 GAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTC
 AGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAA
 AAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGG
 CAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGG
 CCCTGCCTCCCAGATAATAATAAAATCGCTATCCAT
 CGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGGAGC
 AACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAAC
 AACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGC
 CCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGT
 TTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCCAGAG
 CTCTGGTCAATGATGTCTAAAACTCCTCTGATTGGTG
 GTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAACCCTCTTTT

	TACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAG AGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGG TGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCT CCAAGTGAAGTTCCTGCCTGCCTTTCCTGCTCAGACT GTTTGCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAG CCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTC TGCCAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTC ACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGT GCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGG AATTAAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGA AGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCT GGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTT TTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGAC AAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACT TGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGA CCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAA AGG	
PTK7-4b Донор LHA-RHA	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCT TATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGC AGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATG AGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCA ACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCCCATTCTGCT AATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATT CCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCC ATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGG GTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGC AGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAAGGTTTCCTTG AGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGA AATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGC CTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGT TTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACC GTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTC ATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCA AAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCT CTTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCG	64

TGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGT
 CTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAA
 TGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCAC
 AGACAAAAGTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTT
 CAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACAT
 CGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGGTC
 GGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGG
 GGTAAGTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCG
 CCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAG
 TGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGG
 GTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGG
 TTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTATGGCCCT
 TGCGTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGTACGT
 GATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTG
 GGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTC
 GCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTG
 GGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGC
 CTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTAA
 AATTTTGTATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGC
 AAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACA
 CTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACG
 GGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGC
 GGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGG
 GGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCT
 GGCTCGCGCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCG
 GCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCGTGAGCG
 GAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGC
 TCAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGC
 GGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCC
 GTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTA
 CCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAG
 CTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGG
 GTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGT
 GGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTA
 ATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTGGAGTTTGGATCTT

GGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT
 TTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGACCACCATGGCGC
 TTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTGTT
 GCTCCACGCAGCAAGGCCGCAGGTGCAGCTGGTGGA
 GAGCGGCGGAGGAGTGGTGCAACCCGGAAGGTCCC
 TGAGGCTCTCCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCTC
 CAGCTACGGTATGCACTGGGTGAGACAAGCCCCCGG
 AAAGGGCCTCGAGTGGGTGGCCGTGATCTGGGATGA
 TGGCTCCAACAAGTACTACGTGGACAGCGTCAAGGG
 CAGATTCACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACA
 CCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAAG
 ACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAGGGACGACTACT
 ATGGCTCCGGCTCCTTCAATAGCTACTATGGCACCG
 ACGTGTGGGGCCAGGGCACACAGTGACAGTGAGC
 AGCGGCGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGAAGCGG
 AGGAGGAGGAAGCGAGATCGTGCTGACACAGTCCC
 CCGCTACCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGAGAGAGCTA
 CCCTGAGCTGCAGAGCCAGCCAGAGCGTCTCCATCT
 ACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAGGCCC
 CTAGACTGCTGATCTACGACGCCAGCAACAGGGCCA
 CCGGCATTCCCTGCCAGATTCAGCGGCTCCGGCTCCG
 GCACCGATTTACACTGACCATCAGCTCCCTGGAGC
 CTGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCCAGCAGAGGA
 GCAACTGGCCCCCCTTTACCTTCGGCCCCGGCACCA
 AGGTTCGACATCAAGAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGG
 TATTTCTCCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCC
 CGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCA
 ACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGC
 CGCCGGGGGTGCTGTTTCATACGAGGGGCTTGGA
 CTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGT
 ACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTCACTCGTTATTACTT
 TGTATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCAGAA
 AGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGA
 GACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTA
 GCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGT

GAACTGCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCT
 CCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAAC
 GAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTG
 CTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGG
 GGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGAC
 TCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAG
 GCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACG
 ACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTT
 GAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCA
 TATGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAATAATAAAATCG
 CTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTG
 TGTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACG
 CCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTT
 CCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGC
 AGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGC
 CCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACTCCTCTG
 ATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAAACC
 CTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCA
 GTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAG
 AGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTC
 AGTCTCTCCAAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGC
 TCAGACTGTTTGCCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCA
 TTCTAAGCCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCT
 CCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAAGT
 CAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCAC
 TGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAA
 GTGGAGGAATTAAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCC
 CAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCT
 GTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGA
 ATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCT
 TCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAA
 ATGCTACTTGAAGATAACAGCCCTACCAAGGGCAGG
 GAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCA
 ATGAGAAAGG

CAR PKT7-7	ATGGCGCTGCCGGTGACCGCGCTGCTGCTGCCGCTG GCGCTGCTGCTGCATGCGGCGCGCCCGGAAATTGTG CTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGAGCCCG GGCGAACGCGCGACCCTGAGCTGCCGCGCGAGCCA GAGCGTGAGCATTATCTGGCGTGGTATCAGCAGAA ACCGGGCCAGGCGCCGCGCCTGCTGATTTATGATGC GAGCAACCGCGCGACC GG CATTCCGGCGCGCTTTAG CGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCAT TAGCAGCCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTATTA TTGCCAGCAGCGCAGCAACTGGCCGCCGTTTACCTT TGGCCCGGGCACCAAAGTGGATATTAAAGGCGGCG GCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGC AGCCAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCGT GGTGCAGCCGGGCCGAGCCTGCGCCTGAGCTGCGC GCGGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCTATGGCATGCA TTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATG GGTGGCGGTGATTTGGGATGATGGCAGCAACAAATA TTATGTGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAG CCGCGATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGAT GAACAGCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTA TTGCGCGCGCGATGATTATTATGGCAGCGGCAGCTT TAACAGCTATTATGGCACCGATGTGTGGGGCCAGGG CACCACCGTGACCGTGAGCAGCGCGGCGGCGTTTGT GCCGGTGTTTCTGCCGGCGAAACCGACCACCACCCC GGCGCCGCGCCCGCCGACCCCGGCGCCGACCATTCG GAGCCAGCCGCTGAGCCTGCGCCCGGAAGCGTGCCG CCCGGCGGCGGGCGGCGCGGTGCATACCCGCGGCCT GGATTTTGCGTGCGATATTTATATTTGGGCGCCGCTG GCGGGCACCTGCGGCGTGCTGCTGCTGAGCCTGGTG ATTACCCTGTATTGCAACCATCGCAACCGCAGCAAA CGCAGCCGCCTGCTGCATAGCGATTATATGAACATG ACCCCGCGCCCGCCGGGCCCCGACCCGCAAACATTAT CAGCCGTATGCGCCCGCGCGGATTTTGCGGCGTAT CGCAGCCGCGTGAAATTTAGCCGCGAGCGCGGATGCG CCGGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTATAAC	65
------------	---	----

	GAACCTGAACCTGGGCGCCGCGGAAGAATATGATGTG CTGGATAAACGCCGCGGCCGCGATCCGGAAATGGGC GGCAAACCGCGCCGCAAAAACCCGCAGGAAGGCCT GTATAACGAACTGCAGAAAGATAAAAATGGCGGAAG CGTATAGCGAAATTGGCATGAAAGGCGAACGCCGCC GCGGCAAAGGCCATGATGGCCTGTATCAGGGCCTGA GCACCGCGACCAAAGATACCTATGATGCGCTGCATA TGCAGGCGCTGCCGCGCGC	
CAR PKT7-7	MALPVTALLPLALLHAARPEIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSIYLA WYQQKPGQAPRLIYDASNRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWP PFTFGPGTKVDIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLVESGG GVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVIWDDGSNKYYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARD DYYGSGSFNSYYGTDVW GQ GTTVTVSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPT IASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG VLLSLVITLYCNHRNRSKRSRL LHS DYMNMTPRRPGP TRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR	66
scFv PTK7-7	GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGC CTGAGCCCGGGCGAACGCGCGACCCTGAGCTGCCGC GCGAGCCAGAGCGTGAGCATTTATCTGGCGTG GTAT CAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGCGCCTGCTGATT TATGATGCGAGCAACCGCGCGACCGGCATTCCGGCG CGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACC CTGACCATTAGCAGCCTGGAACCGGAAGATTTTGCG GTGTATTATTGCCAGCAGCGCAGCAACTGGCCGCCG TTTACCTTTGGCCCGGGCACCAAAGTGGATATTAAA GGCGGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGG CGGCGGCAGCCAGGTGCAGCTGGTGGAAGCGGCG GCGGCGTG GTGCAGCCGGGCCGAGCCTGCGCCTGA GCTGCGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCTATG	67

	GCATGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCC TGGAATGGGTGGCGGTGATTTGGGATGATGGCAGCA ACAAATATTATGTGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTA CCATTAGCCGCGATAACAGCAAAAACACCCTGTATC TGCAGATGAACAGCCTGCGCGCGGAAGATACCGCG GTGTATTATTGCGCGCGCGATGATTATTATGGCAGC GGCAGCTTTAACAGCTATTATGGCACCGATGTGTGG GGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC	
scFv PTK7-7 (линкер подчеркнут)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSIYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSE PEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK <u>GGGGSGGG</u> <u>GSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS</u> YGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDGSNKYYVDSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD DYYG SGSFNSYYGTDVWGQGTTVTVSS	68
VH scFv PTK7-7	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWV RQAPGKGLEWVAVIWDDGSNKYYVDSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD DYYGSGSFNS YYGTDVWGQGTTVTVSS	69
VL scFv PTK7-7	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSIYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSE PEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK	70
PTK7-7 Донор LHA-RHA	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCT TATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGC AGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATG AGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCA ACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCCCATTCTGCT AATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATT CCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTCCC ATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGG GTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGC AGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAAGTTTCCTTG AGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGA AATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGC CTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGT	71

TTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACC
 GTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCC
 ATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCA
 AAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCT
 CTTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCG
 TGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGT
 CTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAA
 TGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCAC
 AGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTT
 CAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACAT
 CGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTC
 GGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGG
 GGTAACCTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCG
 CCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAG
 TGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGG
 GTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGG
 TTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTATGGCCCT
 TGCGTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGTACGT
 GATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTG
 GGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTC
 GCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTG
 GGGCCGCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGC
 CTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTAA
 AATTTTGTATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGC
 AAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACA
 CTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACG
 GGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGC
 GGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGG
 GGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCT
 GGCCTCGCGCCGCGGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCG
 GCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCG
 GAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGC
 TCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGC
 GGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCC
 GTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTA

CCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAG
 CTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGG
 GTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGT
 GGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTA
 ATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTT
 GGTTCAATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT
 TTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGACCACCATGGCGC
 TTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTGTT
 GCTCCACGCAGCAAGGCCGGAGATCGTGCTGACCCA
 GAGCCCTGCCACACTGAGCCTGAGCCCCGGAGAGAG
 GGCTACCCTGAGCTGCAGGGCCTCCCAGTCCGTGAG
 CATCTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA
 GGCCCCCAGGCTGCTGATCTACGACGCCAGCAATAG
 GGCCACCGGAATCCCTGCCAGGTTTAGCGGCTCCGG
 AAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCTCCCT
 GGAGCCCGAGGATTTGCGCCGTGTACTACTGCCAGCA
 GAGGTCCAACCTGGCCTCCCTTTACCTTCGGCCCCGGC
 ACCAAGGTGGATATTAAGGGCGGCGGCGGATCCGG
 AGGAGGAGGCAGCGGAGGAGGAGGAAGCCAGGTGC
 AACTGGTGGAGTCCGGCGGAGGCGTGGTGCAACCTG
 GCAGAAGCCTGAGGCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCT
 TCACCTTCAGCAGCTACGGTATGCACTGGGTGAGGC
 AGGCTCCCGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGGCCGTG
 ATCTGGGACGACGGCTCCAACAAGTACTACGTGGAC
 TCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAAC
 TCCAAGAACACACTGTACCTGCAGATGAACAGCCTG
 AGGGCCGAGGATACCGCTGTGTATTACTGCGCCAGG
 GACGATTACTACGGCAGCGGCAGCTTCAATTCCTAC
 TACGGAACCGACGTCTGGGGCCAGGGAACCAACGTG
 ACCGTGAGCAGCAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTA
 TTTCTCCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCG
 CGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAAC
 CTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCG
 CCGGGGGTGCTGTTCATACGAGGGGCTTGGACTTCG
 CTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTAC

GTGCGGCGTCCTTTTGTGTGTCACCTCGTTATTACTTTG
 TATTGTAATCACAGGAATCGCTCAAAGCGGAGTAGG
 TTGTTGCATTCCGATTACATGAATATGACTCCTCGCC
 GGCCTGGGCCGACAAGAAAACATTACCAACCCTATG
 CCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCCCGAG
 TGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATC
 AGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATT
 TGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAAC
 GCCGGGGGAGAGACCCGGAATGGGGGGTAAACCC
 CGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGA
 ACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAG
 AAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAA
 GGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCA
 ACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCC
 CTGCCTCCCAGATAATAATAAAATCGCTATCCATCG
 AAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCA
 ACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACA
 ACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCC
 CAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTT
 TCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCCAGAGC
 TCTGGTCAATGATGTCTAAAACTCCTCTGATTGGTGG
 TCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAAACCCTCTTTTT
 ACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGA
 GAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGT
 GGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTC
 CAACTGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTG
 TTTGCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGC
 CCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCT
 GCCAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTC
 ACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGT
 GCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGG
 AATTAAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCCAGAGGA
 AGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCT
 GGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTT
 TTAATCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGAC

	AAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACT TGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGA CCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAA AGG	
PTK7-13		
CAR PKT7-13	ATGGCGCTGCCGGTGACCGCGCTGCTGCTGCCGCTG GCGCTGCTGCTGCATGCGGCGCGCCCGGAAATTGTG CTGACCCAGAGCCCGGGCACCTGAGCCTGAGCCCG GGCGAACGCGCGACCTGAGCTGCCGCGCGAGCCA GAGCGTGAGCAGCAGCTATCTGGCGTGGTATCAGCA GAAACCGGGCCAGGCGCCGCGCCTGCTGATTTATGG CGCGAGCAGCCGCGCGACCGGCATTCCGGATCGCTT TAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAC CATTAGCCGCCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTA TTATTGCCAGCAGTATGGCAGCAGCCCGATGTATAC CTTTGGCCAGGGCACCAAACCTGGAAATTAAAGGCGG CGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCG GCAGCGAAGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGGCGGC CTGGTGCATCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGC GCGGGCAGCGGCTTTACCTTTAGCACCTATCTGATGT ATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAACCCTGGAAT GGGTGAGCGCGATTGGCAGCGGCGGCGATACCTATT ATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAGCC GCGATAACGCGAAAAACAGCCTGTATCTGCAGATGA ACAGCCTGCGCGCGGAAGATATGGCGGTGTATTATT GCGCGCGCGGCCTGGGCTATTGGGGCCAGGGCACCC TGGTGACCGTGAGCAGCGCGGCGGCGTTTGTGCCGG TGTTTCTGCCGGCGAAACCGACCACCACCCCGGCGC CGCGCCCGCCGACCCCGGCGCCGACCATTGCGAGCC AGCCGCTGAGCCTGCGCCCGGAAGCGTGCCGCCCGG CGGCGGGCGGCGCGGTGCATACCCGCGGCCTGGATT TTGCGTGCGATATTTATATTTGGGCGCCGCTGGCGG GCACCTGCGGCGTGCTGCTGCTGAGCCTGGTGATTA CCCTGTATTGCAACCATCGCAACCGCAGCAAACGCA GCCGCCTGCTGCATAGCGATTATATGAACATGACCC	72

	CGCGCCGCCCCGGGCCCCGACCCGCAAACATTATCAGC CGTATGCGCCGCCGCGCGATTTTGCGGCGTATCGCA GCCGCGTGAAATTTAGCCGCAGCGCGGATGCGCCGG CGTATCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTATAACGAAC TGAACCTGGGCCGCGCGAAGAATATGATGTGCTGG ATAAACGCCGCGGCCGCGATCCGGAAATGGGCGGC AAACCGCGCCGCAAAAACCCGCAGGAAGGCCTGTA TAACGAACTGCAGAAAGATAAAATGGCGGAAGCGT ATAGCGAAATTGGCATGAAAGGCGAACGCCGCCGC GGCAAAGGCCATGATGGCCTGTATCAGGGCCTGAGC ACCGCGACCAAAGATACCTATGATGCGCTGCATATG CAGGCGCTGCCGCCGCGC	
CAR PKT7-13	MALPVTALLPLALLHAARPEIVLTQSPGTLSPGER ATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS PMYTFGQGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSG GGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTFSTYLMYWVRQAPGKTL EWVSAIGSGGDTYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQM NSLRAEDMAVYYCARGLGWYWGQGLVTVSSAAAFVP VFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNH RNRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRD FAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDA LHMQUALPPR	73
scFv PTK7-13	GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCGGGCACCCCTGAGC CTGAGCCCGGGCGAACGCGCGACCCTGAGCTGCCGC GCGAGCCAGAGCGTGAGCAGCAGCTATCTGGCGTGG TATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGCGCCTGCTG ATTTATGGCGCGAGCAGCCGCGCGACCGGCATTCCG GATCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTT ACCCTGACCATTAGCCGCCTGGAACCGGAAGATTTT GCGGTGTATTATTGCCAGCAGTATGGCAGCAGCCCG ATGTATACCTTTGGCCAGGGCACCAAACTGGAAATT	74

	AAAGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCGGCAGCGG CGGCGGCGGCAGCGAAGTGCAGCTGGTGCAGAGCG GCGGCGGCCTGGTGCATCCGGGCGGCAGCCTGCGCC TGAGCTGCGCGGGCAGCGGCTTTACCTTTAGCACCT ATCTGATGTATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAA CCCTGGAATGGGTGAGCGCGATTGGCAGCGGCGGCG ATACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTA CCATTAGCCGCGATAACGCGAAAAACAGCCTGTATC TGCAGATGAACAGCCTGCGCGCGGAAGATATGGCG GTGTATTATTGCGCGCGCGGCCTGGGCTATTGGGGC CAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC	
scFv PTK7-13 (линкер подчеркнут)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYGSSPMYTFGQGTKLEIK <u>GGGGSGG</u> <u>GGSGGGGSEVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTF</u> STYLMYWVRQAPGKTLEWVSAIGSGGDTYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGLGY WGQGTLLTVSS	75
VH scFv PTK7-13	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTFSTYLMYWV RQAPGKTLEWVSAIGSGGDTYYADSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGLGYWGQGTLLT VSS	76
VL scFv PTK7-13	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYGSSPMYTFGQGTKLEIK	77
PTK7-13 Донор LHA-RHA	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCT TATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGC AGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATG AGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCA ACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCCCATTCTGCT AATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATT CCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCC ATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGG GTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGC AGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAAGTTTCCTTG	78

AGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGA
 AATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGC
 CTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGT
 TTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACC
 GTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCC
 ATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCA
 AAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCCTGATCCT
 CTTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCG
 TGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGT
 CTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAA
 TGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCAC
 AGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTT
 CAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACAT
 CGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGGTC
 GGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGG
 GGTAACCTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCG
 CCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAG
 TGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGAACGG
 GTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGG
 TTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCT
 TGCGTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGTACGT
 GATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTG
 GGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTC
 GCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTG
 GGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGC
 CTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTAA
 AATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGC
 AAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACA
 CTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACG
 GGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGC
 GGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGG
 GGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCT
 GGCCTCGCGCCGCGGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCG
 GCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCGTGAGCG
 GAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGC

TCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGC
 GGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCC
 GTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTA
 CCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAG
 CTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGG
 GTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGT
 GGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTA
 ATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTT
 GGTTCAATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT
 TTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTGACCACCATGGCGC
 TTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTGTT
 GCTCCACGCAGCAAGGCCGGAGATCGTGCTGACCCA
 GAGCCCCGGAACACTGAGCCTGTCCCCCGGAGAAAG
 AGCCACACTGTCCTGCAGGGCCAGCCAGAGCGTGAG
 CAGCTCCTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGG
 ACAGGCCCCCAGGCTGCTGATTTACGGCGCCAGCAG
 CAGGGCCACCGGCATCCCCGACAGATTCAGCGGATC
 CGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAG
 GCTGGAGCCCGAGGACTTCGCTGTGTACTACTGCCA
 GCAGTACGGCAGCAGCCCCATGTACACCTTCGGCCA
 GGGCACCAAGCTGGAGATCAAGGGAGGAGGAGGAT
 CCGGAGGAGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAAGCGA
 GGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGGAGGACTGGTGC
 ATCCCGGAGGATCCCTGAGACTGAGCTGTGCCGGCA
 GCGGATTCACATTCTCCACCTACCTGATGTACTGGGT
 GAGGCAGGCCCTTGCAAGACCCTGGAGTGGGTGTC
 CGCCATTGGCTCCGGCGGAGACACCTATTATGCCGA
 CTCCGTCAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGAGACAA
 CGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCT
 GAGGGCCGAGGATATGGCTGTGTACTATTGCGCTAG
 GGGCCTGGGATACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTGAC
 CGTGAGCTCCAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTT
 CTCCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGCGC
 CCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTC
 TTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCGCCG

GGGGTGCTGTTTCATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTT
 GTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTG
 CGGCGTCCTTTTGTGTGCTACTCGTTATTACTTTGTATT
 GTAATCACAGGAATCGCTCAAAGCGGAGTAGGTTGT
 TGCATTCCGATTACATGAATATGACTCCTCGCCGGCC
 TGGGCCGACAAGAAAACATTACCAACCCTATGCCCC
 CCCACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCCCGAGTGAA
 GTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCA
 AGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGG
 ACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCG
 GGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGTAAACCCCGAA
 GAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCC
 AGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATA
 GGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCA
 CGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAA
 AGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCC
 TCCCAGATAATAATAAAATCGCTATCCATCGAAGAT
 GGATGTGTGTTGGTTTTTTTGTGTGTGGAGCAACAAAT
 CTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCA
 TTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTA
 AGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGC
 TTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCCAGAGCTCTGGTC
 AATGATGTCTAAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGC
 CTTATCCATTGCCACCAAAACCCTCTTTTTACTAAGA
 AACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGAC
 ACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGA
 GAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAACCTGA
 GTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCC
 CTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCT
 CCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAA
 AAATCTTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGT
 CACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCA
 CATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGAGGAATTAAA
 AAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCA
 TTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAA

	GTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCA GGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCA GGGAAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATA CCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAG AGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGG	
PTK7-17		
CAR PKT7-17	ATGGCGCTGCCGGTGACCGCGCTGCTGCTGCCGCTG GCGCTGCTGCTGCATGCGGCGCGCCCGGAAGTGCAG CTGGTGCAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCATCCGGGC GGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGGCAGCGGCTTT ACCTTTAGCACCTATCTGATGTATTGGGTGCGCCAG GCGCCGGGCAAAACCCTGGAATGGGTGAGCGCGATT GGCAGCGGCGGCGATACCTATTATGCGGATAGCGTG AAAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATAACGCGAAA AACAGCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCG GAAGATATGGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGGCCTG GGCTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGC AGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGG CGGCGGCGGCAGCGAAATTGTGCTGACCCAGAGCCC GGGCACCTGAGCCTGAGCCCGGGCGAACGCGCGA CCCTGAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCGTGAGCAGCA GCTATCTGGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGGCCAGG CGCCGCGCCTGCTGATTTATGGCGCGAGCAGCCGCG CGACCGGCATTCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCGGCA GCGGCACCGATTTTACCCTGACCATTAGCCGCCTGG AACCGGAAGATTTTTCGGGTGTATTATTGCCAGCAGT ATGGCAGCAGCCCGATGTATACCTTTGGCCAGGGCA CCAAACCTGGAAATTAAAAGCGCGGCGGCGTTTGTGC CGGTGTTTCTGCCGGCGAAACCGACCACCACCCCGG CGCCGCGCCCGCCGACCCCGGCGCCGACCATTGCGA GCCAGCCGCTGAGCCTGCGCCCGGAAGCGTGCCGCC CGGCGGCGGGCGGCGCGGTGCATACCCGCGGCCTGG ATTTTGCGTGCGATATTTATATTTGGGCGCCGCTGGC GGGCACCTGCGGCGTGCTGCTGCTGAGCCTGGTGAT TACCCTGTATTGCAACCATCGCAACCGCAGCAAACG	79

	CAGCCGCCTGCTGCATAGCGATTATATGAACATGAC CCCGCGCCGCCCCGGGCCCCGACCCGCAAACATTATCA GCCGTATGCGCCGCCGCGCGATTTTTCGGCGTATCG CAGCCGCGTGAAATTTAGCCGCAGCGCGGATGCGCC GGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTATAACGA ACTGAACCTGGGCGCCGCGAAGAATATGATGTGCT GGATAAACGCGCGGCGCGATCCGGAAATGGGCG GCAAACCGCGCCGCAAAAACCCGCAGGAAGGCCTG TATAACGAACTGCAGAAAGATAAAATGGCGGAAGC GTATAGCGAAATTGGCATGAAAGGCGAACGCCGCC GCGGCAAAGGCCATGATGGCCTGTATCAGGGCCTGA GCACCGCGACCAAAGATACCTATGATGCGCTGCATA TGCAGGCGCTGCCGCCGCGC	
CAR PKT7-17	MALPVTALLPLALLHAARPEVQLVQSGGGLVHPGG SLRLSCAGSGFTFSTYLMYWVRQAPGKTLEWVSAIGS GGDTYYADSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAED MAVYYCARGLGWYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPMYTFGQGTKLEIKSAAA FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CNHRNRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAP PRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR	80
scFv PTK7-17	GAAGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGGCGCCTGGT GCATCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGG CAGCGGCTTTACCTTTAGCACCTATCTGATGTATTGG GTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAACCCTGGAATGGGT GAGCGCGATTGGCAGCGGCGGCGATACCTATTATGC GGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGA TAACGCGAAAAACAGCCTGTATCTGCAGATGAACAG CCTGCGCGCGGAAGATATGGCGGTGTATTATTGCGC	81

	GCGCGGCCTGGGCTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGT GACCGTGAGCAGCGGCGGGCGGCGGCAGCGGCGGCG GCGGCAGCGGCGGGCGGCGGCAGCGAAATTGTGCTG ACCCAGAGCCCGGGCACCCCTGAGCCTGAGCCCGGGC GAACGCGCGACCCTGAGCTGCCGCGCGAGCCAGAG CGTGAGCAGCAGCTATCTGGCGTGGTATCAGCAGAA ACCGGGGCCAGGCGCCGCGCCTGCTGATTTATGGCGC GAGCAGCCGCGCGACCGGCATTCCGGATCGCTTTAG CGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCAT TAGCCGCCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTATTA TTGCCAGCAGTATGGCAGCAGCCCGATGTATACCTT TGGCCAGGGCACCAAACTGGAAATTAAA	
scFv PTK7-17 (линкер подчеркнут)	EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSTYLMYWV RQAPGKTLEWVSAIGSGGDTYYADSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGLGYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATG IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPM YTFGQGTKLEIK	82
VH scFv PTK7-17	EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSTYLMYWV RQAPGKTLEWVSAIGSGGDTYYADSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGLGYWGQGT LVTVSS	83
VL scFv PTK7-17	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQQYGSSPMYTFGQGTKLEIK	84
PTK7-17 CDR1 VH	TYLMY	85
PTK7-17 CDR2 VH	AIGSGGDTYYADSVKG	86
PTK7-17 CDR3 VH	GLGY	87
PTK7-17 CDR1 VL	RASQSVSSSYLA	88

PTK7-17 CDR2 VL	GASSRAT	89
PTK7-17 CDR3 VL	QQYGSSPMYT	90
PTK-17 Донор LHA-RHA	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCT TATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGC AGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATG AGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCA ACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCCCATTCTGCT AATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATT CCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTCCC ATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGG GTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGC AGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAGGTTTCCTTG AGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGA AATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGC CTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGT TTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACC GTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCC ATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCA AAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCCTGATCCT CTTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCG TGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGT CTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAA TGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCAC AGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTT CAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACAT CGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTC GGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGG GGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCG CCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAG TGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGG GTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGG TTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTATGGCCCT TGCGTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGTACGT	91

GATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTG
 GGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTC
 GCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTG
 GGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGC
 CTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTAA
 AATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGC
 AAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACA
 CTGGTATTTGCGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACG
 GGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTGCGCGAGGC
 GGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGG
 GGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCT
 GGCCTCGCGCCGCGGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCG
 GCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCG
 GAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGC
 TCAAAATGGAGGACGCGGGCGCTCGGGAGAGCGGGC
 GGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCC
 GTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTA
 CCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAG
 CTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGG
 GTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGT
 GGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTA
 ATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGATCTT
 GGTTCAATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT
 TTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTGACCACCATGGCGC
 TTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTGTT
 GCTCCACGCAGCAAGGCCGGAGGTCCAGCTGGTGCA
 GAGCGGAGGCGGACTGGTGCATCCTGGAGGCTCCCT
 GAGACTGTCCTGTGCCGGCAGCGGCTTCACCTTCAG
 CACCTACCTGATGTACTGGGTGAGACAGGCCCCCGG
 CAAAACCCTGGAGTGGGTGAGCGCTATCGGCAGCGG
 CGGAGACACATACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCA
 GGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCC
 TGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCTGAGGACA
 TGGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGGCCTGGGCTACT
 GGGGACAGGGCACACTGGTGACAGTGAGCAGCGGA

GGCGGCGGCAGCGGAGGCGGCGGCAGCGGCGGCGG
 AGGCAGCGAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTGGCAC
 CCTGTCCCTGTCCCCTGGCGAAAGGGCCACCCTGAG
 CTGTAGGGCCAGCCAGTCCGTGAGCAGCAGCTATCT
 GGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCCAGGCCCTAG
 ACTGCTGATCTACGGCGCCTCCTCCAGAGCCACCGG
 AATCCCCGATAGATTTCAGCGGCTCCGGCAGCGGCAC
 CGATTTACACTGACCATCAGCAGGCTGGAGCCCCGA
 GGACTTCGCCGTGTATTACTGCCAGCAGTACGGCAG
 CAGCCCTATGTACACATTCGGCCAGGGCACCAAGCT
 GGAGATCAAGAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTT
 CTCCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGCGC
 CCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTC
 TTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCGCCG
 GGGGTGCTGTTCATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTT
 GTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTG
 CGGCGTCCTTTTGTGTCACTCGTTATTACTTTGTATT
 GTAATCACAGGAATCGCTCAAAGCGGAGTAGGTTGT
 TGCATTCCGATTACATGAATATGACTCCTCGCCGGCC
 TGGGCCGACAAGAAAACATTACCAACCCTATGCCCC
 CCCACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCCCGAGTGAA
 GTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCA
 AGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGG
 ACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCG
 GGGGAGAGACCCGGAATGGGGGGTAAACCCCGAA
 GAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCC
 AGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATA
 GGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCA
 CGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAA
 AGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCC
 TCCCAGATAATAATAAAATCGCTATCCATCGAAGAT
 GGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCAACAAAT
 CTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCA
 TTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTA
 AGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGC

	TTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCCAGAGCTCTGGTC AATGATGTCTAAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGC CTTATCCATTGCCACCAAAACCCTCTTTTTACTAAGA AACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGAC ACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGA GAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAAGTGA GTTCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCC CTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCT CCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAA AAATCTTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGT CACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCA CATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAAA AAGTCAGATGAGGGGTGTGCCCAGAGGAAGCACCA TTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAA GTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCA GGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCA GGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATA CCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAG AGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGG	
Сигнальный пептид CD8	MALPVTALLLPLALLHAARP	93
Трансмембранный CD8α+5'-линкер (подчеркнут)	<u>GCTGCTGCCT</u>TTTGTCCCGGTATTTCTCCCAGCCAAAC CGACCACGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCG CTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCC CGAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTTCA TACGAGGGGCTTGGAAGTTCGCTTGTGATATTTACATT TGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGT TGTCACCTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAA TCGC	94
Трансмембранный CD8α+5'-линкер (подчеркнут)	<u>SAAAF</u>VPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCNHRNR	95

Трансмембранный CD8a (без линкера)	TTTGTCCCGGTATTTCTCCCAGCCAAACCGACCACGA CTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCAT CGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGC CGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTTCATACGAGGGGC TTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGT TGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTCACTCGT TATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGC	96
Трансмембранный CD8a (без линкера)	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CNHRNR	97
Костимулирующий CD28	TCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATG AATATGACTCCTCGCCGGCCTGGGCCGACAAGAAAA CATTACCAACCCTATGCCCCCCCACGAGACTTCGCTG CGTACAGGTCC	45
Костимулирующий CD28	SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA YRS	46
Костимулирующий 41BB	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAA CAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAG GAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAGAAGAA GAAGGAGGATGTGAACTG	43
Костимулирующий 41BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCEL	44
CD3 ζ	CGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCA TATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTG AATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGAT AAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGTAA ACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAA TGAATCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTC AGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAA AAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGG CAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGG CCCTGCCTCCCAGA	98
CD3 ζ	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI	99

	GMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR	
--	---	--

Таблица 12. Донорные компоненты

Донорная структура TRAC[LHA]-EF1 α [промотор]-CAR-полиА-TRAC[RHA]

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
TRAC-LHA	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATA TCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTC TGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATC TCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACAT ACCATAAACCTCCCATTTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTG GGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTG CTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTT ATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAG AATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTC CTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGA AATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGT CCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGA TGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAG CCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGA CTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCAT GTCCTAACCTGATCCTCTTGTCCACAGATATCCAGAAC CCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCA GTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAA ACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCA CAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCA	100
Промотор EF1 α	GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCC ACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGA ACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAA AGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTG GGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG TTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAG TGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGT TATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCA GTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGG	101

	TGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGC CTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCG CCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCT GCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACC TGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATG CGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGC CGCGGGCGGCGACGGGGGCCCGTGC GTCCCAGCGCACATG TTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAAT CGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTG CCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGG CAAGGCTGGCCCCGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAA GATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATG GAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACC CACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCGTCTCAGCCGTCGCT TCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACC TCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGT TGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTG AGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGAT GTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTT GGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTT CTTCCATTTCAAGGTGTCGTGA	
Синтетическ ий сигнал поли(А)	AATAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTT TTTTGTGTG	102
TRAC-RHA	TGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCA ACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCC AGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTT GCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAA TGATGTCTAAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATC CATTGCCACCAAAACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAG CCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAG CAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCA GCCTCAGTCTCTCCAACTGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTG CTCAGACTGTTTGCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTC TAAGCCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGT	92

	CTGCCAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCAC GCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGC ACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAAAAA GTCAGATGAGGGGTGTGCCCAGAGGAAGCACCATTCTAG TTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATA ACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAA CAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTG AAGAAATGCTACTTGAAGATAACAGCCCTACCAAGGGCA GGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAAT GAGAAAGG	
--	--	--

[00301] Все ссылочные материалы, патенты и заявки на патенты, раскрытые в данном документе, включены посредством ссылки в отношении заявляемого объекта, для которого каждые из них цитируются, что в некоторых случаях может охватывать весь документ.

[00302] Форму единственного числа, используемую в данном документе в описании и формуле изобретения, если явно не указано иное, следует понимать как "по меньшей мере один".

[00303] Также следует учитывать, что, если явно не указано иное, в любых заявляемых в данном документе способах, которые предусматривают более чем одну(одно) стадию или действие, порядок стадий или действий способа не обязательно ограничивается порядком, в котором стадии или действия способа упоминаются.

[00304] В формуле изобретения, а также в приведенном выше описании все переходные фразы, такие как "содержащий", "включающий", "несущий", "имеющий", "вмещающий", "вовлекающий", "предусматривающий", "составленный из" и т. п., следует понимать как неограничивающие, то есть означающие включение без ограничения. Только переходные фразы "состоящий из" и "состоящий по сути из" должны быть закрытыми или полужакрытыми переходными фразами, соответственно, как изложено в Руководстве Патентного ведомства США по процедурам патентной экспертизы, раздел 2111.03.

[00305] Термины "приблизительно" и "по сути", предшествующие числовому значению, означают $\pm 10\%$ от приведенного числового значения.

Если предоставляется диапазон значений, каждое значение между верхним и нижним концами диапазона конкретно предусматривается и описывается в данном документе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сконструированная Т-клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), при этом CAR содержит эктодомен, который специфически связывается с РТК7.

2. Сконструированная Т-клетка по п. 1, дополнительно содержащая нарушенный ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC).

3. Сконструированная Т-клетка по п. 1 или п. 2, дополнительно содержащая нарушенный ген бета-2-микроглобулина ($\beta 2M$).

4. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-3, где эктодомен CAR предусматривает антитело к РТК7.

5. Сконструированная Т-клетка по п. 4, где антитело к РТК7 представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) к РТК7.

6. Сконструированная Т-клетка по п. 5, где scFv к РТК7 содержит те же определяющие комплементарность области (CDR) вариабельного домена тяжелой (VH) цепи и те же CDR вариабельного домена легкой (VL) цепи, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит (i) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 55, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 56, (ii) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 69, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 70, (iii) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 76, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 77, или (iv) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 83, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 84.

7. Сконструированная Т-клетка по п. 6, где scFv к РТК7 содержит те же VH- и VL-цепи, что и эталонное антитело.

8. Сконструированная Т-клетка по п. 6, где scFv к РТК7 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 54, 68, 75 или 82.

9. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-8, где CAR дополнительно содержит костимулирующий домен CD28 или костимулирующий домен 41BB.

10. Сконструированная Т-клетка по п. 9, где CAR дополнительно содержит цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ .

11. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-10, где CAR кодируется нуклеотидной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 49, 51, 65, 72, 79 или 112 или нуклеотидной последовательностью, предусматривающей последовательность нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 49, 51, 65, 72, 79 или 112.

12. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-11, где нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, вставлена в нарушенный ген TRAC.

13. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 2-12, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую LHA и/или RHA в пределах последовательности под любым из SEQ ID NO: 63, 64, 71, 78 или 91, нуклеотидную

последовательность под SEQ ID NO: 92 или 100 и/или нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 63, 64, 71, 78 или 91.

14. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-13, где нарушенный ген $\beta 2M$ содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательности под любым из SEQ ID NO: 9-14.

15. Сконструированная Т-клетка, содержащая

(i) нарушенный ген TRAC;

(ii) нарушенный ген $\beta 2M$ и

(iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела к РТК7.

16. Сконструированная Т-клетка по п. 15, где CAR содержит (a) эктодомен, который предусматривает антигенсвязывающий фрагмент антитела к РТК7, (b) трансмембранный домен CD8 и (c) эндодомен, который предусматривает костимулирующий домен CD28 и цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ .

17. Сконструированная Т-клетка по п. 15 или п. 16, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR.

18. Сконструированная Т-клетка, содержащая

(i) нарушенный ген TRAC, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, содержащий (a) эктодомен, который предусматривает антигенсвязывающий фрагмент антитела к РТК7, (b) трансмембранный домен CD8 и (c) эндодомен, который предусматривает костимулирующий домен CD28 и цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ ; и

(ii) нарушенный ген $\beta 2M$.

19. Сконструированная Т-клетка, содержащая

(i) нарушенный ген TRAC, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 50, 52, 66, 73 или 80; и

(ii) нарушенный ген $\beta 2M$.

20. Сконструированная Т-клетка, содержащая

(i) нарушенный ген TRAC, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, где последовательность нуклеиновой кислоты характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с последовательностями под SEQ ID NO: 49, 51, 65, 72, 79 или 112 и кодирует CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50, 52, 66, 73 или 80; и

(ii) нарушенный ген $\beta 2M$.

21. Сконструированная Т-клетка по любому из пп. 1-20, где Т-клетка представляет собой человеческую Т-клетку.

22. Популяция клеток, содержащая сконструированную Т-клетку по любому из пп. 1-21, где по меньшей мере 25% или по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции экспрессируют CAR.

23. Популяция по п. 22, где по меньшей мере 70% сконструированных Т-клеток популяции экспрессируют CAR.

24. Популяция по п. 22, где по меньшей мере 25% сконструированных Т-клеток популяции экспрессируют CAR после по меньшей мере 7 дней или по меньшей мере 14 дней пролиферации *in vitro*.

25. Популяция по любому из пп. 22-24, где по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют белок Т-клеточного рецептора (TCR) на обнаруживаемом уровне.

26. Популяция по п. 25, где по меньшей мере 90% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют белок TCR на обнаруживаемом уровне.

27. Популяция по любому из пп. 22-26, где по меньшей мере 50% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне.

28. Популяция по п. 27, где по меньшей мере 70% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют белок $\beta 2M$ на обнаруживаемом уровне.

29. Популяция по любому из пп. 22-28, где сконструированные Т-клетки популяции при совместном культивировании *in vitro* с популяцией раковых клеток, которые экспрессируют РТК7, индуцируют клеточный лизис по меньшей мере 10%, по меньшей мере 25% или по меньшей мере 50% раковых клеток популяции.

30. Популяция по п. 29, где сконструированные Т-клетки популяции при совместном культивировании *in vitro* с популяцией раковых клеток, которые экспрессируют РТК7, индуцируют клеточный лизис по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% популяции раковых клеток.

31. Популяция по п. 29 или п. 30, где сконструированные Т-клетки популяции при совместном культивировании *in vitro* с популяцией раковых клеток секретируют IFN γ .

32. Популяция по любому из пп. 29-31, где соотношение сконструированных Т-клеток и раковых клеток составляет от 1:1 до 2:1.

33. Популяция по любому из пп. 29-32, где раковые клетки предусматривают клетки саркомы.

34. Популяция по любому из пп. 29-32, где раковые клетки предусматривают клетки рака молочной железы, клетки рака яичника, клетки мелкоклеточного рака легкого и/или клетки рака толстой кишки.

35. Популяция по любому из пп. 22-34, которая при введении *in vivo* субъекту не индуцирует токсичности у субъекта.

36. Популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат

(i) нарушенный ген TRAC;

(ii) нарушенный ген $\beta 2M$ и

(iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела к РТК7.

37. Популяция клеток по п. 36, где CAR содержит (а) эктодомен, который предусматривает антигенсвязывающий фрагмент антитела к РТК7, (b) трансмембранный домен CD8 и (с) эндодомен, который предусматривает костимулирующий домен CD28 и цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ .

38. Популяция клеток по п. 36 или п. 37, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR.

39. Популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат

(i) нарушенный ген TRAC, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, содержащий (а) эктодомен, который предусматривает антигенсвязывающий фрагмент антитела к РТК7, (b) трансмембранный домен CD8 и (с) эндодомен, который предусматривает костимулирующий домен CD28 и цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ ; и

(ii) нарушенный ген $\beta 2M$.

40. Популяция клеток, содержащая сконструированные Т-клетки, где сконструированные Т-клетки содержат

(i) нарушенный ген TRAC, где нарушенный ген TRAC содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, где последовательность нуклеиновой кислоты характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью с последовательностями под SEQ ID NO: 49, 51, 65, 72, 79 или 112 и кодирует CAR с последовательностями под SEQ ID NO: 50, 52, 66, 73 или 80; и

(ii) нарушенный ген $\beta 2M$.

41. Способ, предусматривающий введение субъекту популяции сконструированных Т-клеток по любому из пп. 22-40.

42. Способ по п. 41, где субъект является субъектом-человеком.

43. Способ по п. 42, где у субъекта имеется рак.

44. Способ по п. 43, где рак выбран из группы, состоящей из рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, рака матки, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака яичка, рака щитовидной железы, рака носоглотки, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), нейрональной глиобластомы, видов саркомы мягких тканей, лейкоза, лимфомы, меланомы, рака толстой кишки, аденокарциномы толстой кишки, глиобластомы головного мозга, гепатоклеточной карциномы, гепатохолангиокарциномы печени, остеосаркомы, рака желудка, плоскоклеточной карциномы пищевода, поздних стадий рака поджелудочной железы, аденокарциномы легкого, плоскоклеточной карциномы легкого, мелкоклеточного рака легкого, карциномы почки и рака внутрипеченочных желчных путей.

45. Способ по п. 43 или п. 44, где рак характеризуется раковыми клетками, экспрессирующими РТК7.

46. Способ получения сконструированной Т-клетки, при этом способ предусматривает

(a) доставку в Т-клетку
 (i) РНК-направляемой нуклеазы,
 (ii) gRNA, нацеливающейся на ген TRAC, и
 (iii) вектора, содержащего донорную матрицу, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, который содержит эктодомен, который специфически связывается с PTK7, и

(b) получение сконструированной Т-клетки, имеющей нарушенный ген TRAC и экспрессирующей CAR.

47. Способ по п. 46, где gRNA, нацеливающаяся на ген TRAC, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 18 или 19 или нацелена на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 40.

48. Способ по п. 46 или п. 47, дополнительно предусматривающий доставку в Т-клетку gRNA, нацеливающейся на ген $\beta 2M$.

49. Способ по п. 48, где gRNA, нацеливающаяся на ген $\beta 2M$, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 20 или 21 или нацелена на нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 41.

50. Способ по любому из пп. 46-49, где эктодомен CAR предусматривает антитело к PTK7.

51. Способ по п. 50, где антитело к PTK7 представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) к PTK7.

52. Способ по п. 51, где scFv к PTK7 содержит те же определяющие комплементарность области (CDR) переменного домена тяжелой (VH) цепи и те же CDR переменного домена легкой (VL) цепи, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит (i) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 55, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 56, (ii) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 69, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 70, (iii) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 76, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 77, или (iv) последовательность VH, изложенную под SEQ ID NO: 83, и последовательность VL, изложенную под SEQ ID NO: 84.

53. Способ по п. 52, где scFv к PTK7 содержит те же VH- и VL-цепи, что и эталонное антитело.

54. Способ по п. 52, где scFv к PTK7 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 54, 68, 75 или 82.

55. Способ по любому из пп. 46-54, где CAR дополнительно содержит костимулирующий домен CD28 или костимулирующий домен 41BB.

56. Способ по п. 55, где CAR дополнительно содержит цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ .

57. Способ по любому из пп. 46-56, где CAR кодируется нуклеотидной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 49, 51, 65, 72, 79 или 112 или нуклеотидной последовательностью, предусматривающей последовательность

нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 49, 51, 65, 72, 79 или 112.

58. Способ по любому из пп. 46-57, где нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, фланкирована левым и правым плечами гомологии в отношении гена TRAC.

59. Способ по любому из пп. 46-58, где донорная матрица содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 63, 64, 71, 78 или 91.

60. Способ по любому из пп. 46-59, где РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9, необязательно нуклеазу Cas9 *S. pyogenes*.

61. Сконструированная Т-клетка, полученная посредством способа по любому из пп. 46-60.

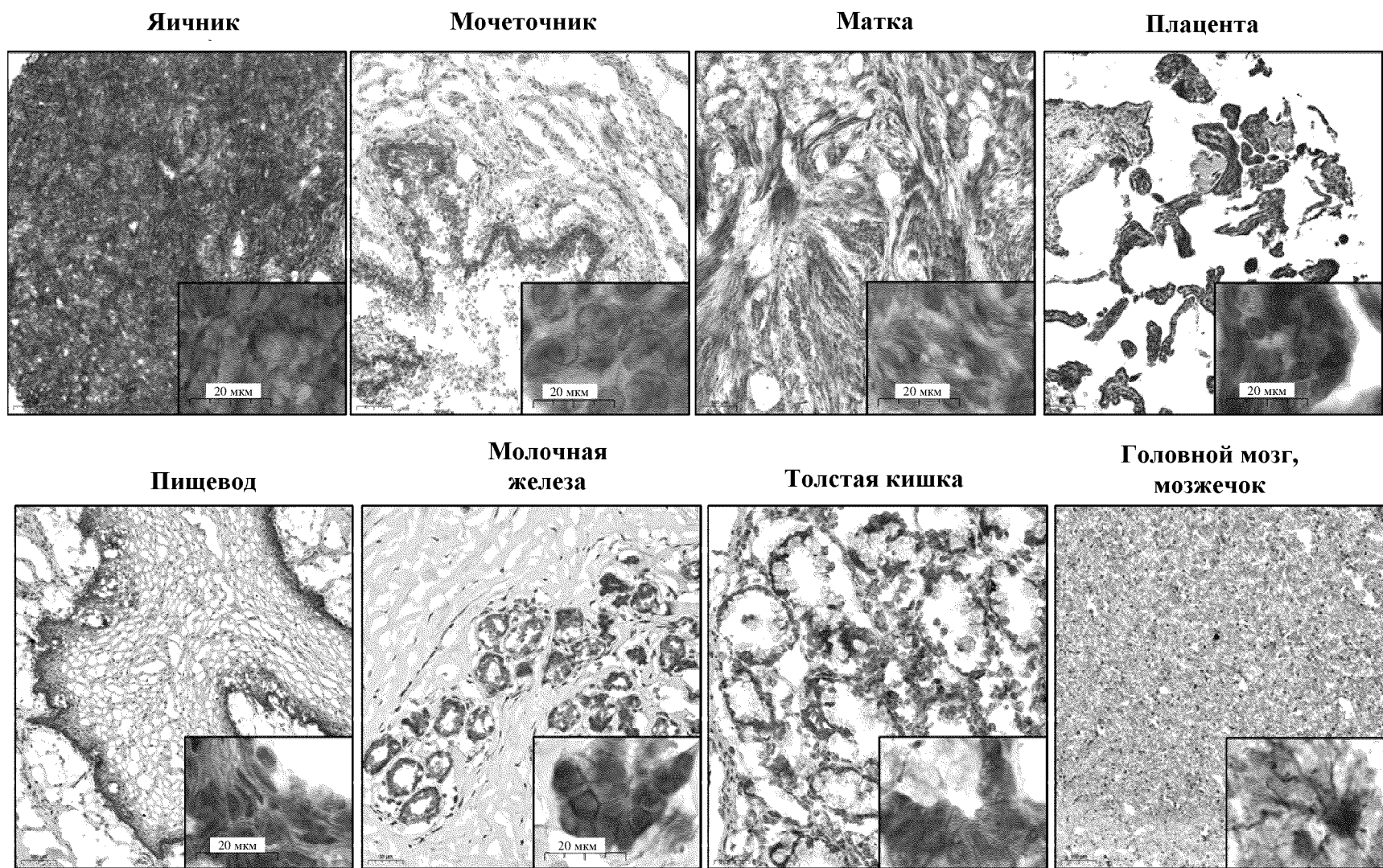
62. Популяция клеток, содержащая сконструированную Т-клетку по п. 61.

63. Способ лечения рака у субъекта, предусматривающий введение субъекту популяции клеток по любому из пп. 22-40 или п. 62.

64. Способ по п. 63, где рак выбран из группы, состоящей из рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, рака матки, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака яичка, рака щитовидной железы, рака носоглотки, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), нейрональной глиобластомы, видов саркомы мягких тканей, лейкоза, лимфомы, меланомы, рака толстой кишки, аденокарциномы толстой кишки, глиобластомы головного мозга, гепатоклеточной карциномы, гепатохолангиокарциномы печени, остеосаркомы, рака желудка, плоскоклеточной карциномы пищевода, поздних стадий рака поджелудочной железы, аденокарциномы легкого, плоскоклеточной карциномы легкого, мелкоклеточного рака легкого, карциномы почки и рака внутрипеченочных желчных путей.

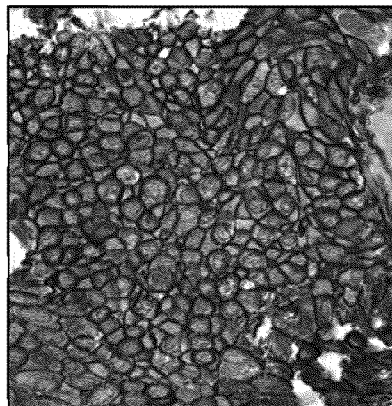
65. Способ по п. 63 или п. 64, где рак характеризуется раковыми клетками, экспрессирующими РТК7.

По доверенности

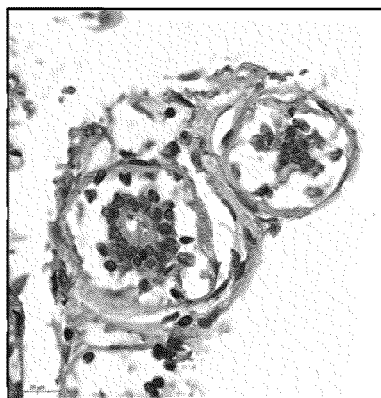


ФИГ. 1

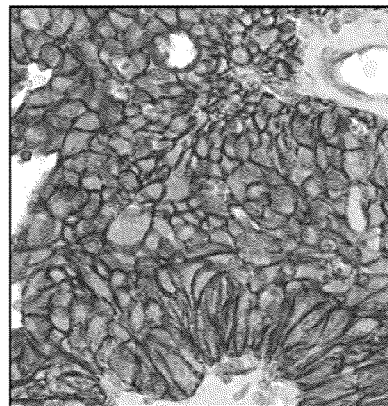
**Инвазивный
протоковый рак
молочной железы**



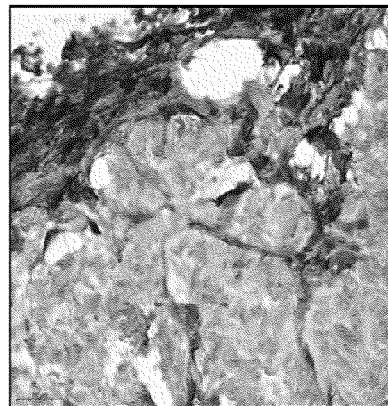
**Прилегающая
нормальная ткань
молочной железы**



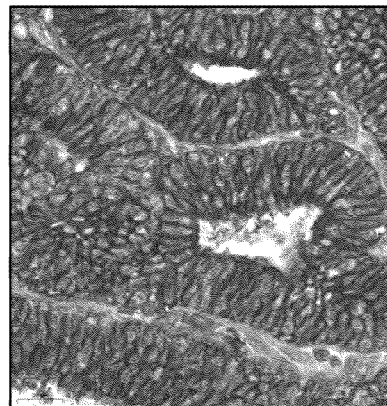
**Серозная
цистаденокарцинома
яичника**



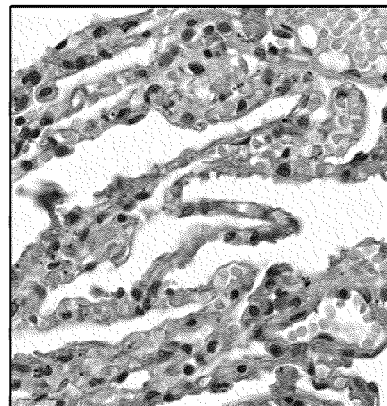
**Прилегающая
нормальная ткань
яичника**



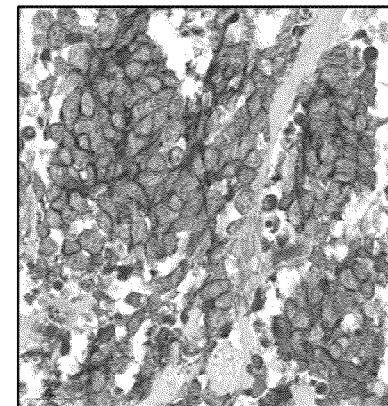
**Аденокарцинома
легкого**



Легкое

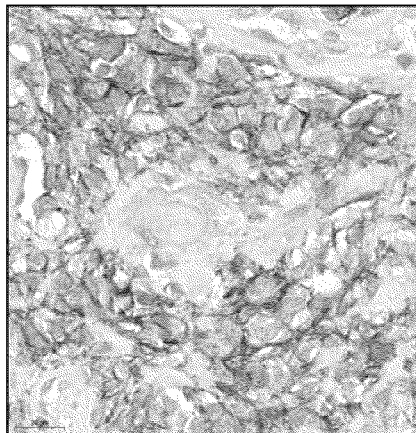


**Легкое,
мелкоклеточный рак
легкого**

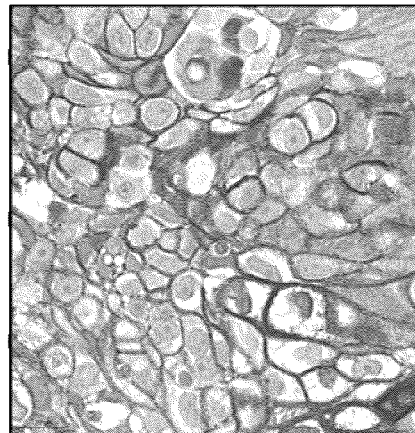


ФИГ. 2А

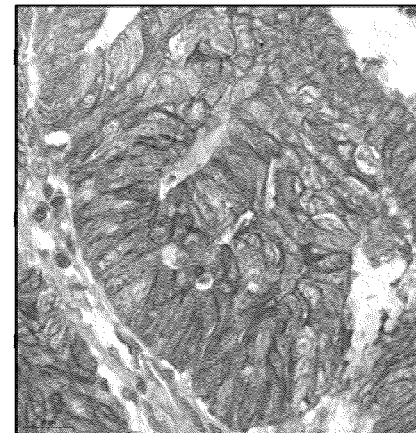
**Остеосаркома
кости**



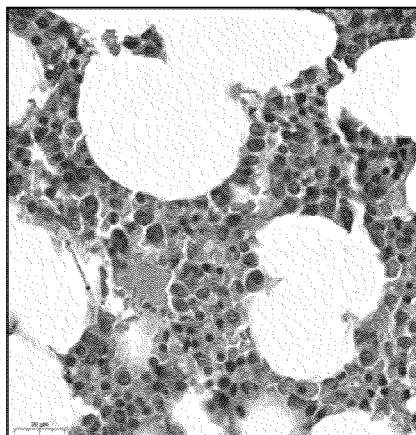
**Плоскоклеточная
карцинома пищевода**



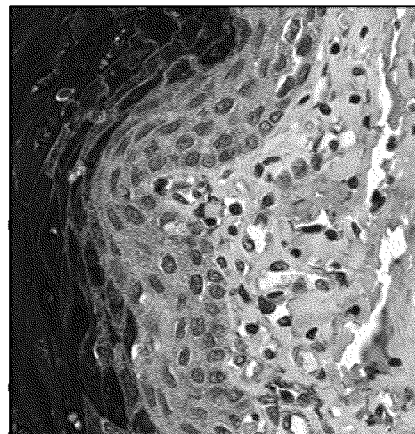
**Аденокарцинома
толстой кишки**



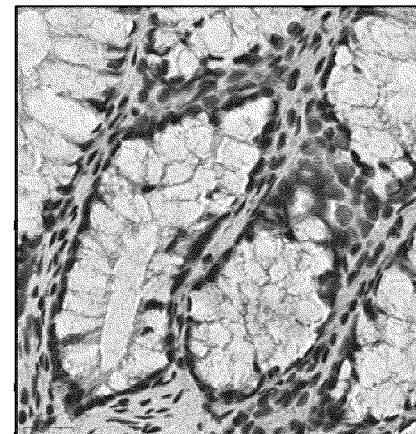
Костный мозг



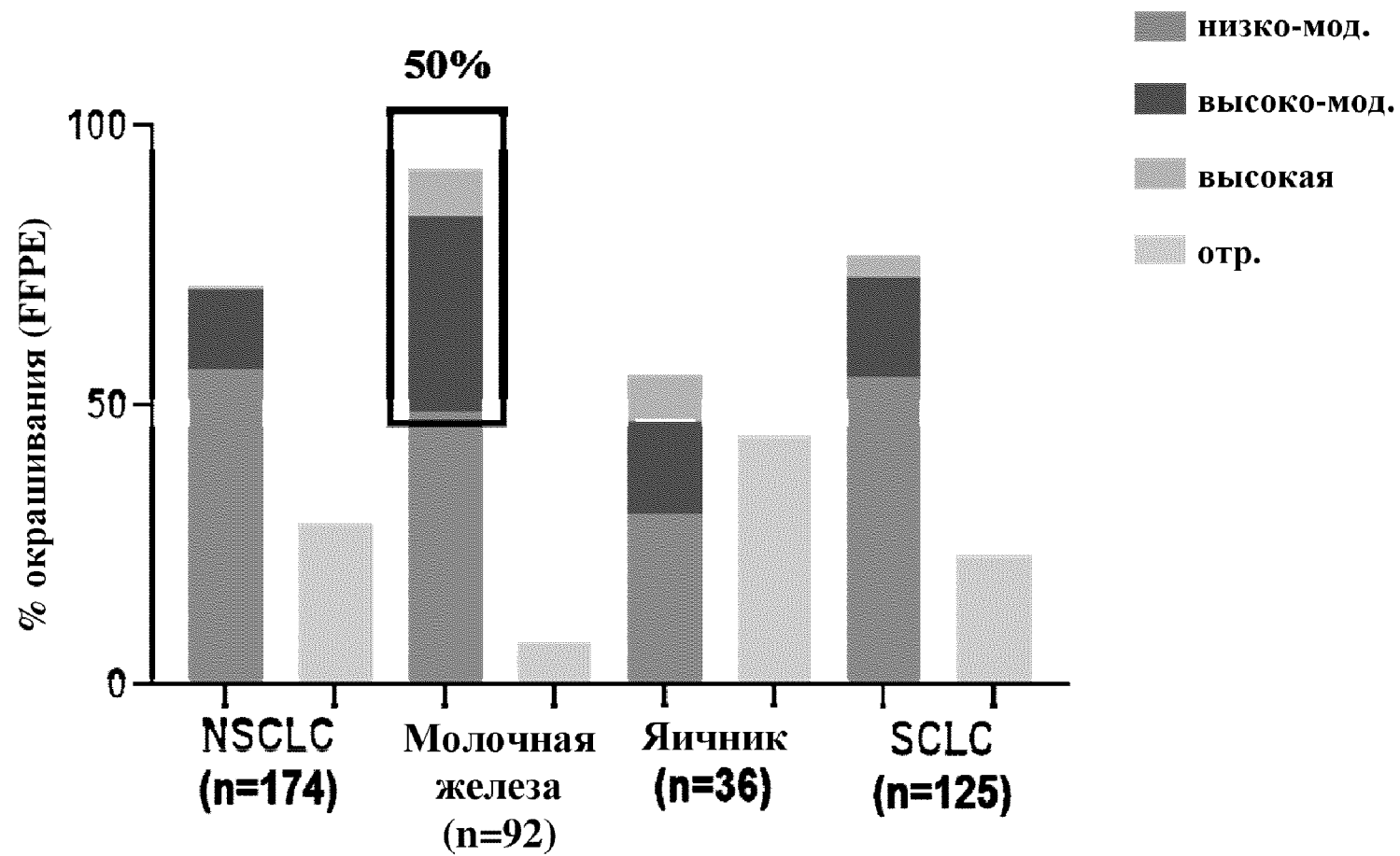
Пищевод



Толстая кишка

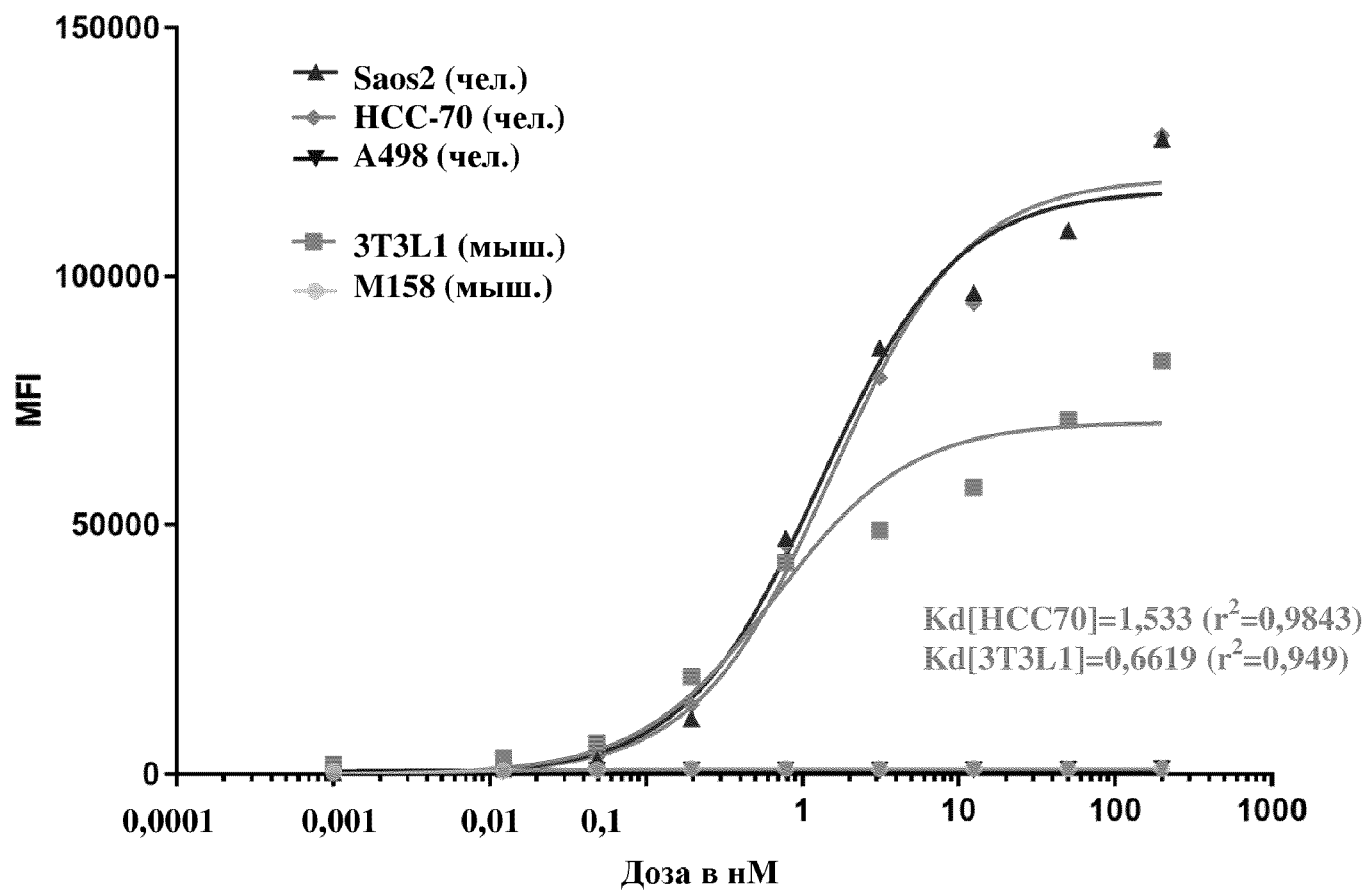


ФИГ. 2В

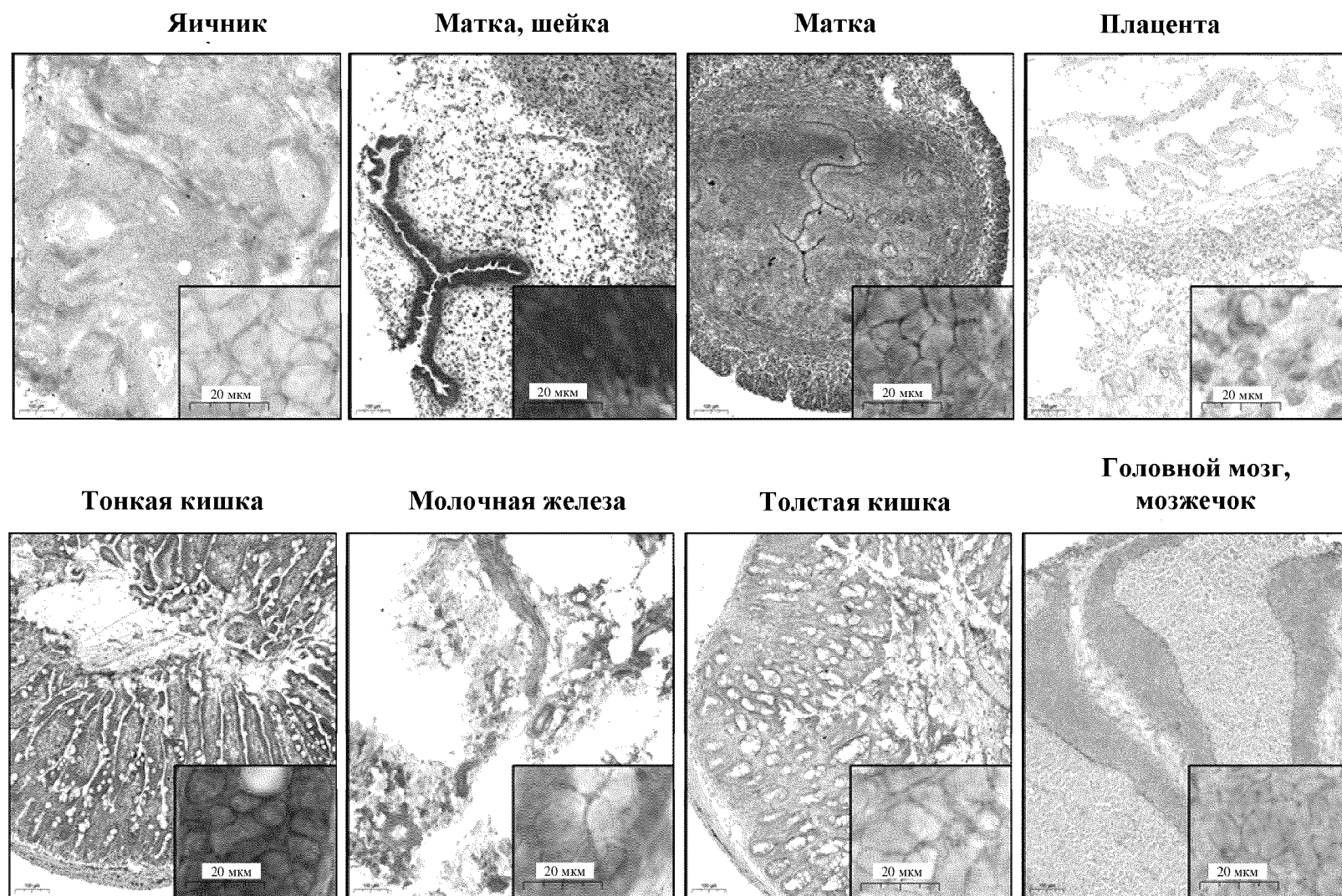


ФИГ. 3

Эквивалентная аффинность связывания Ab РТК7/СТХ181 в человеческих и мышиных клеточных линиях

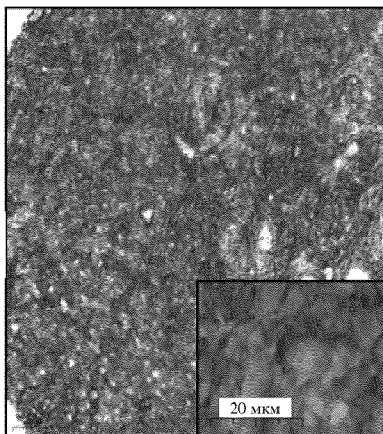


ФИГ. 4

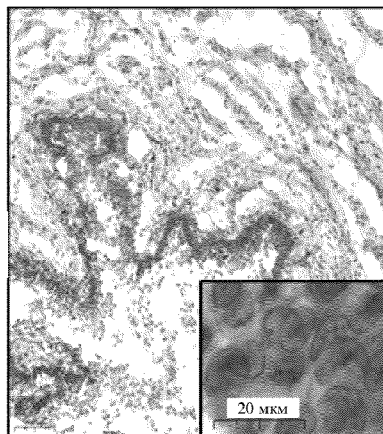


ФИГ. 5А

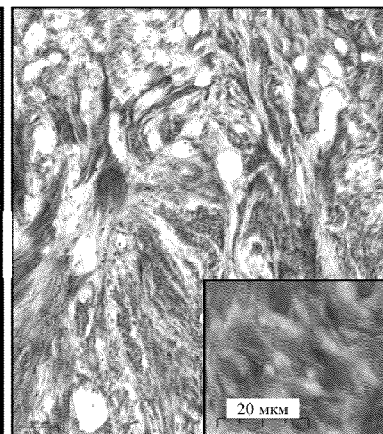
Яичник



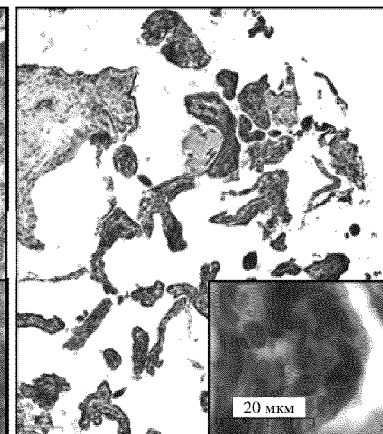
Мочеточник



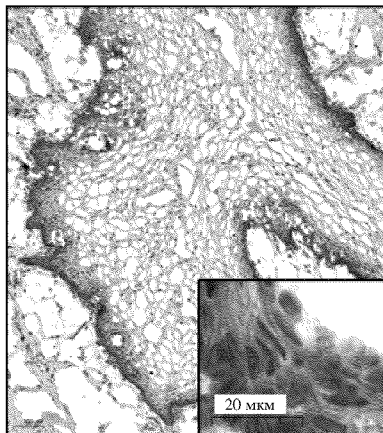
Матка



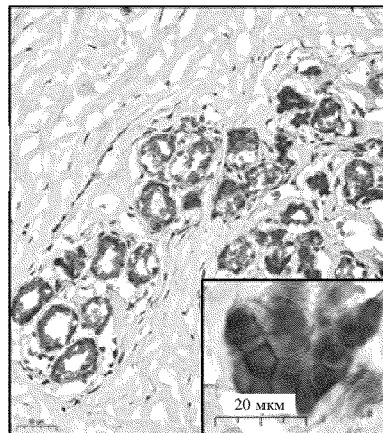
Планта



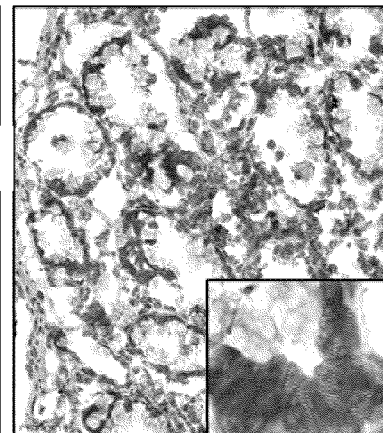
Пищевод



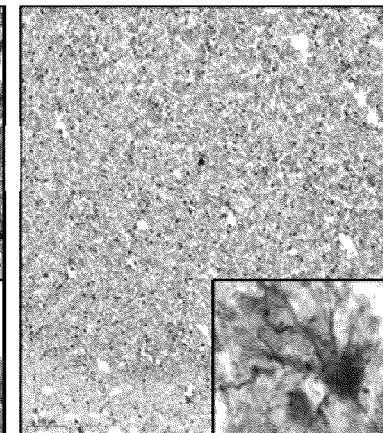
Молочная железа



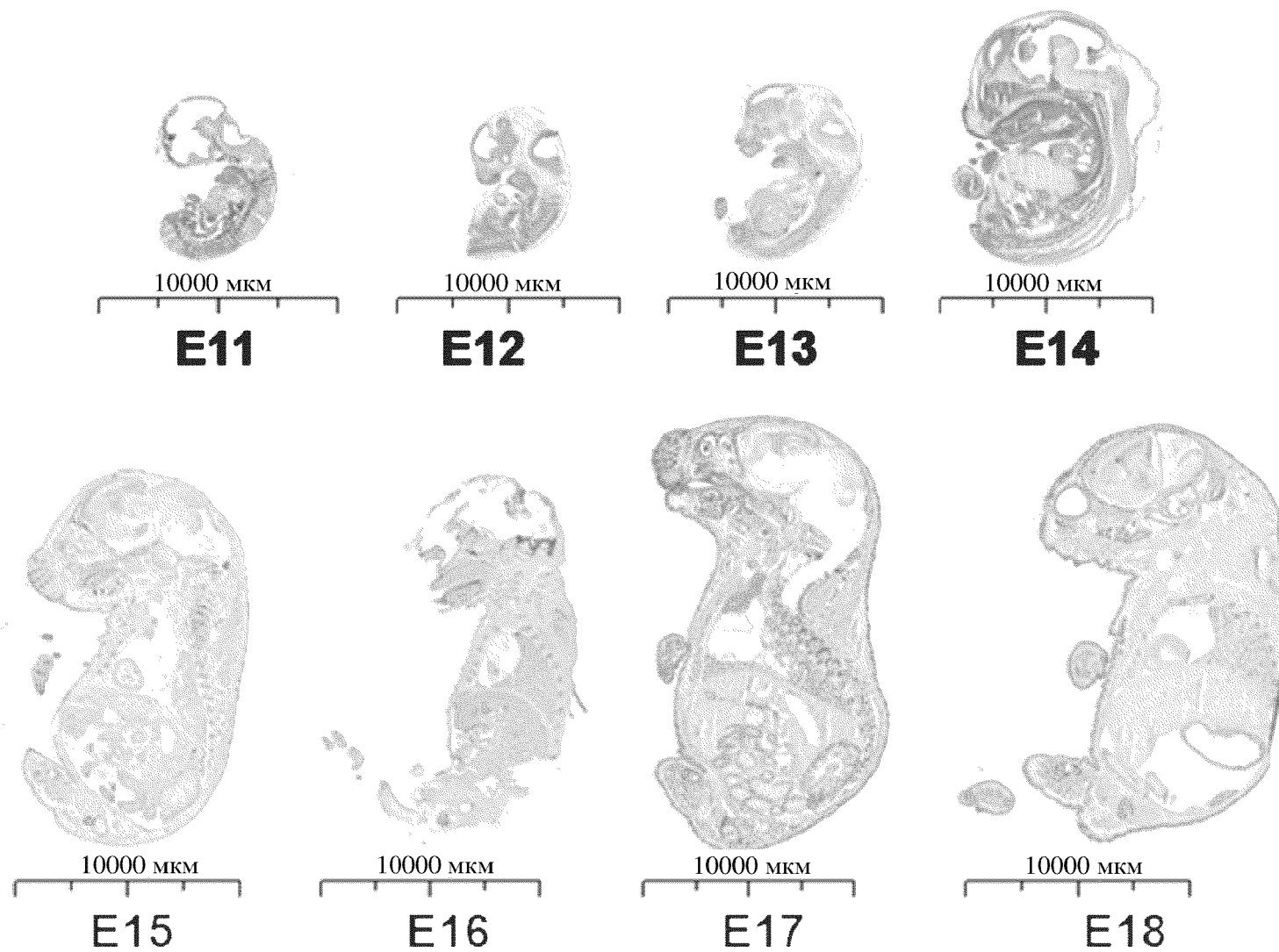
Толстая кишка



**Головной мозг,
мозжечок**

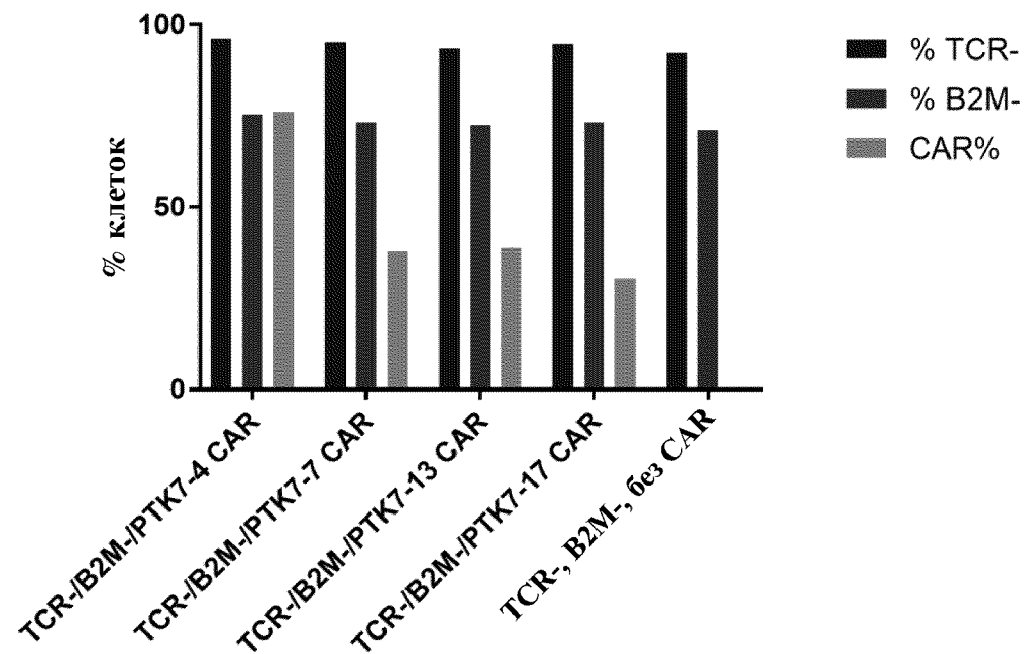


ФИГ. 5В

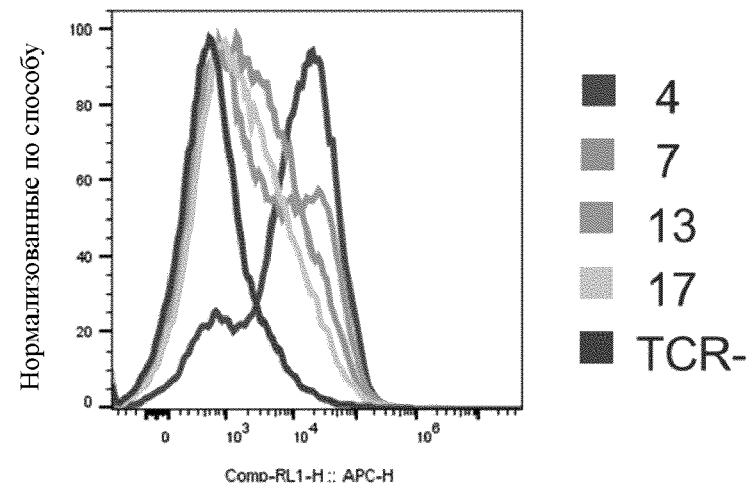


ФИГ. 6

Отредактированный фенотип,
измеренный с помощью FACS

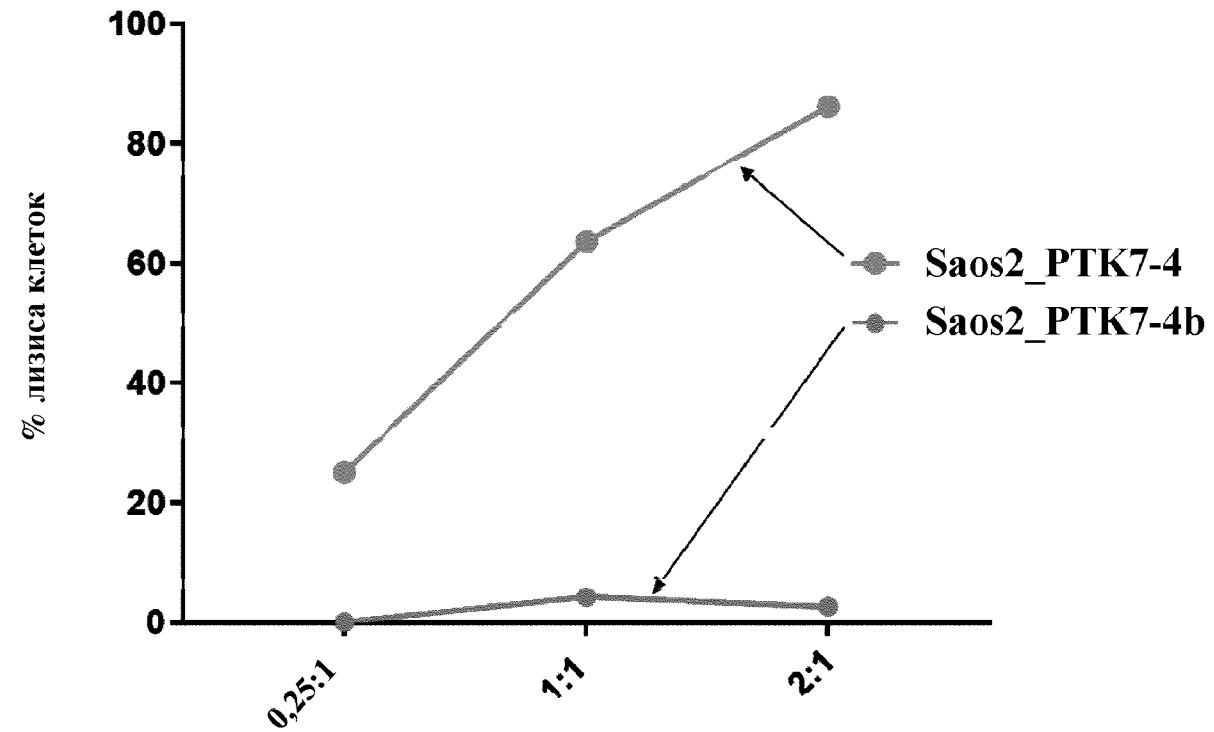


Экспрессия CAR к PTK7



ФИГ. 7

Т-клетки с CAR к РТК7 с костимулирующим доменом CD28 более эффективны, чем с 4-1BB



Соотношение эффекторные Т-клетки с CAR : целевые клетки

ФИГ. 8

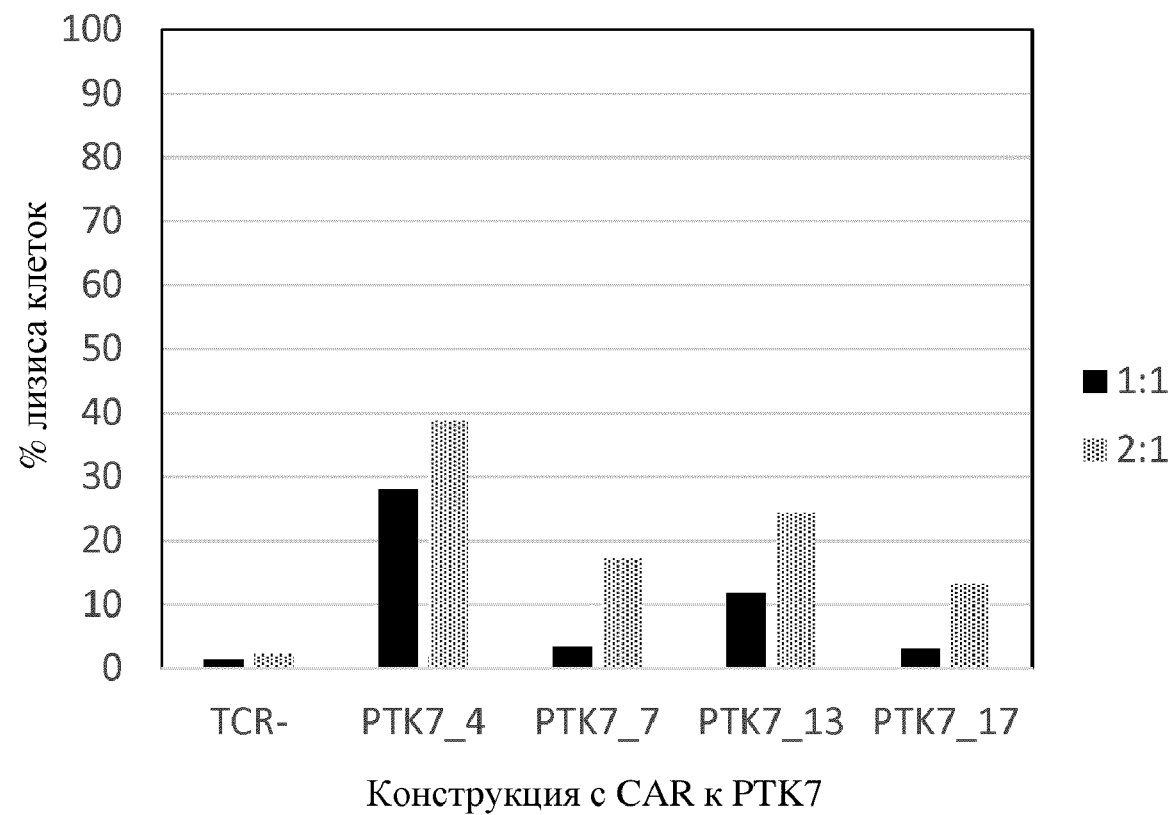


ФИГ. 9А

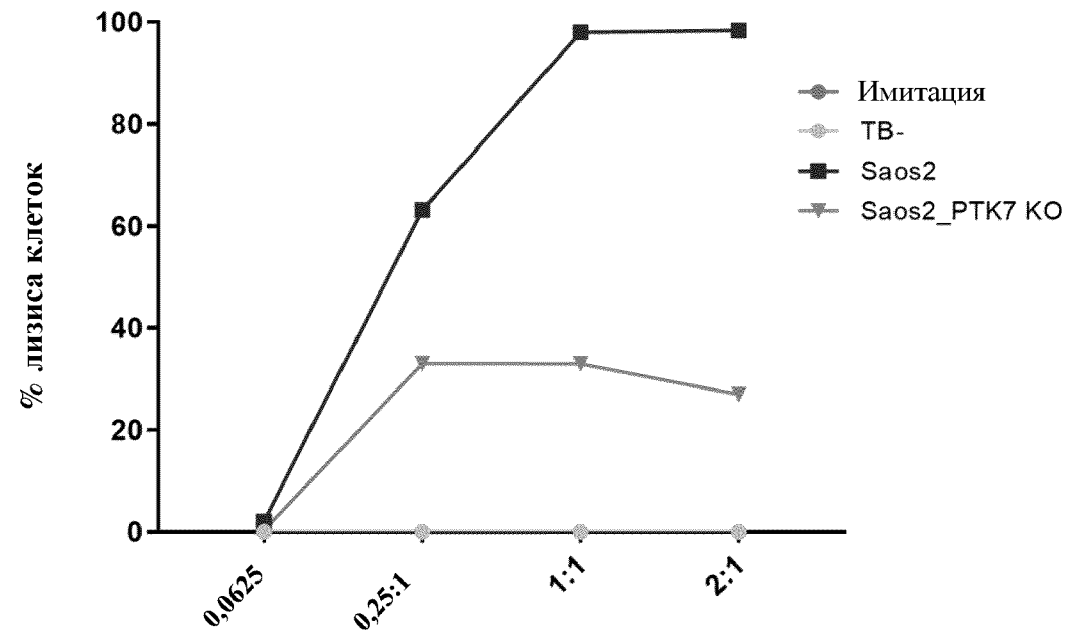


ФИГ. 9В

МСF7, анализ цитотоксичности



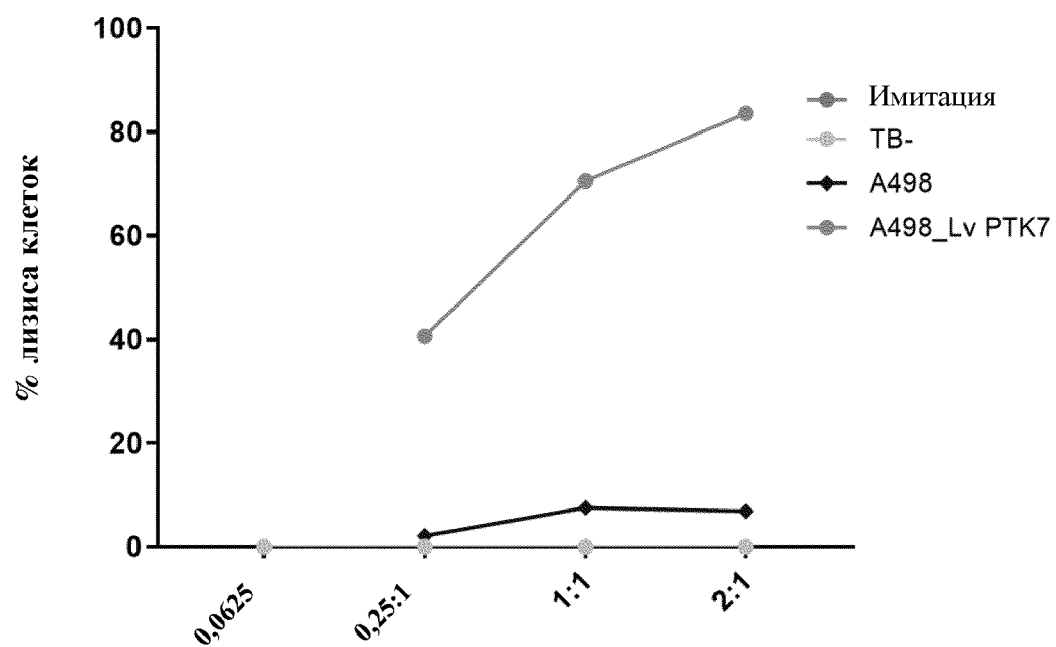
Т-клетки с CAR к РТК7 проявляют сниженную
эффективность *in vitro* в РТК7-КО клетках линии Saos2



Соотношение эффекторные Т-клетки с CAR : целевые клетки

ФИГ. 10А

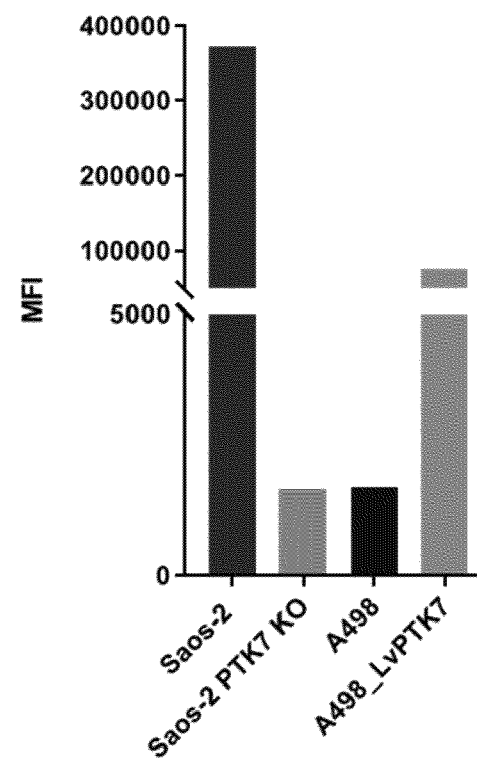
Т-клетки с CAR к РТК7 проявляют повышенную эффективность *in vitro* в РТК7-сверхэкспрессирующих клетках линии A498



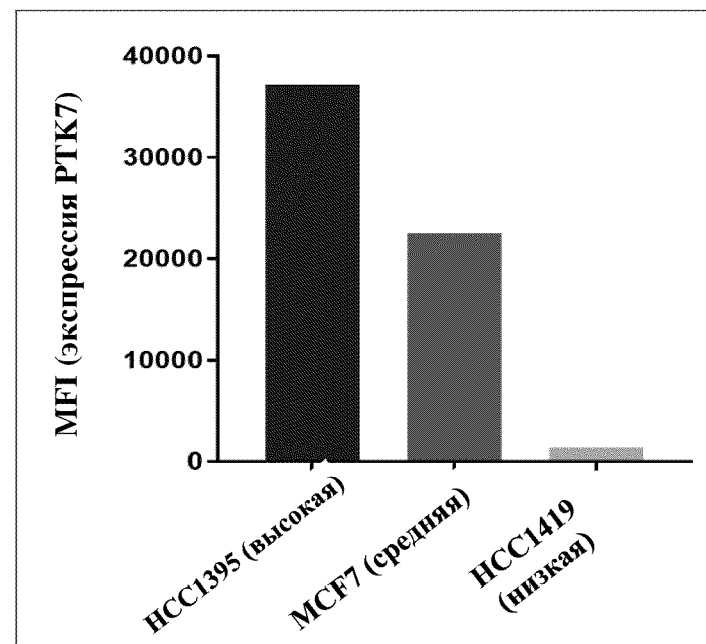
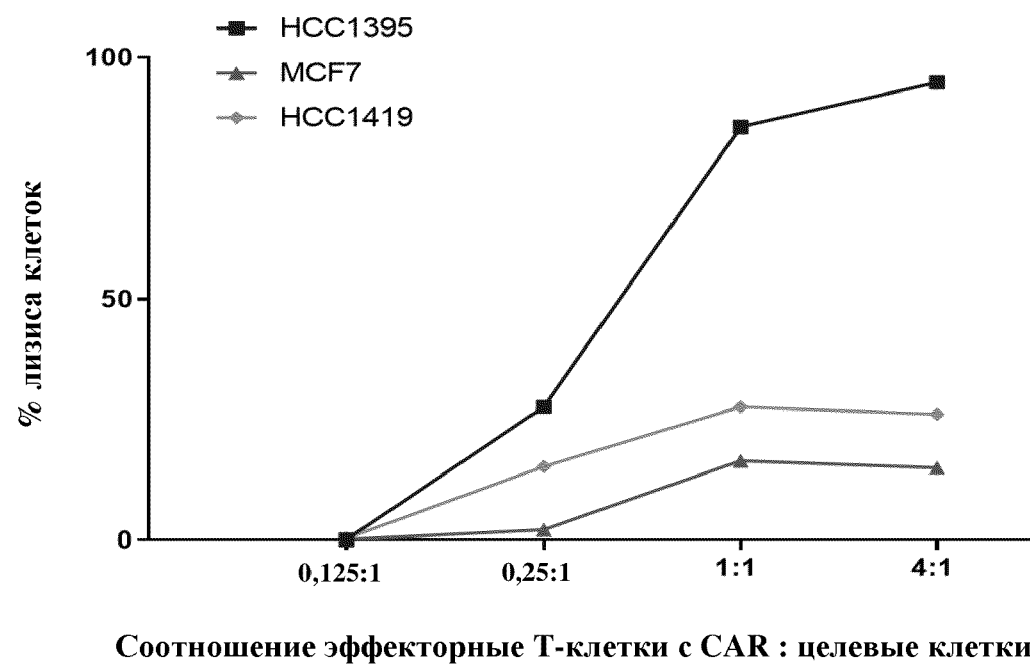
Соотношение эффекторные Т-клетки с CAR : целевые клетки

ФИГ. 10В

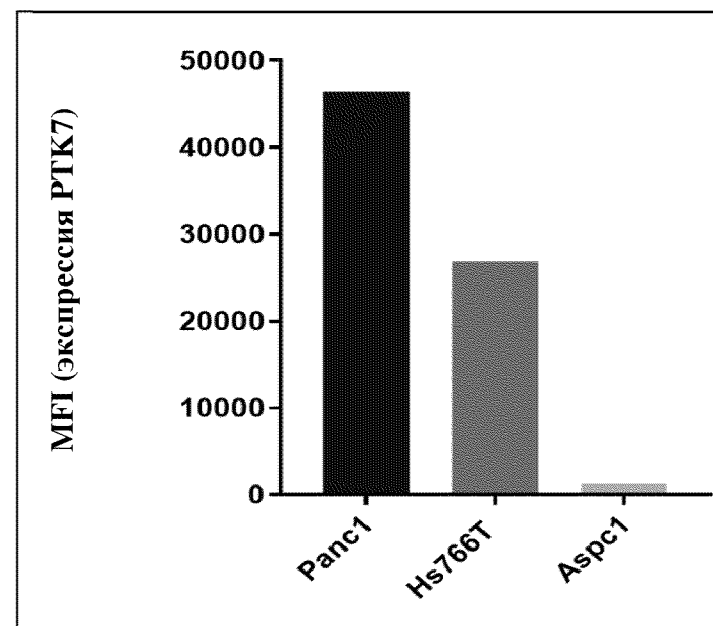
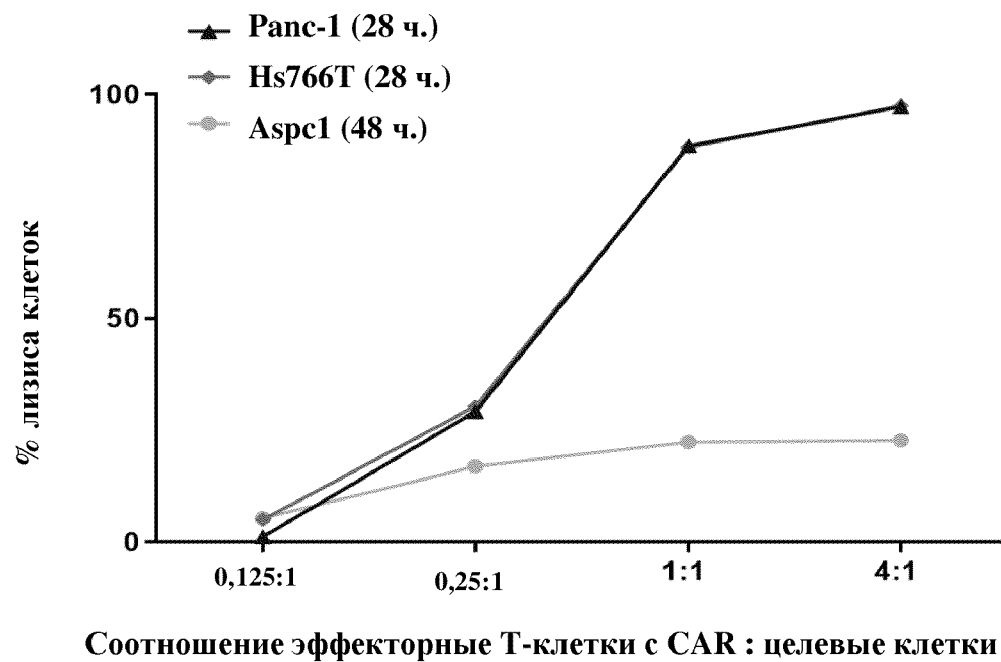
Экспрессия РТК7 на поверхности клеток



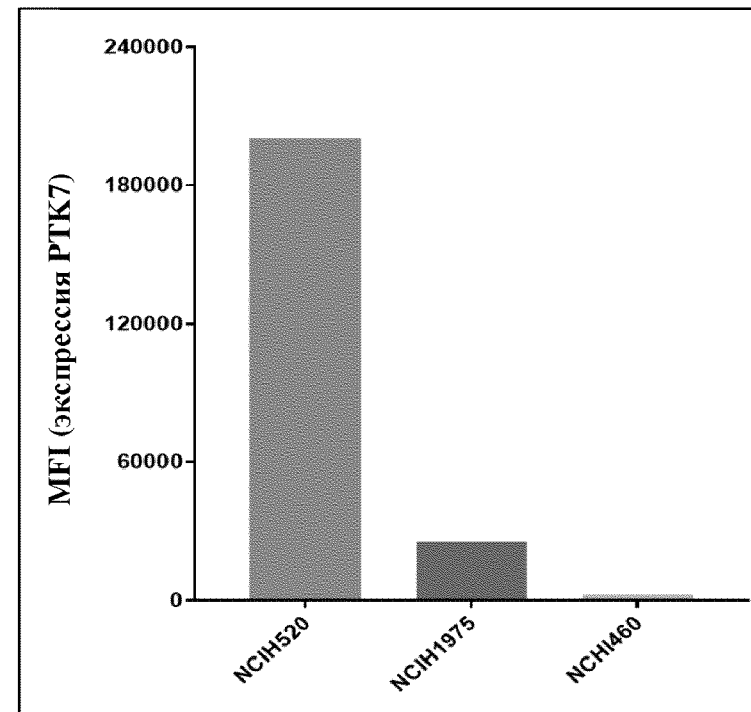
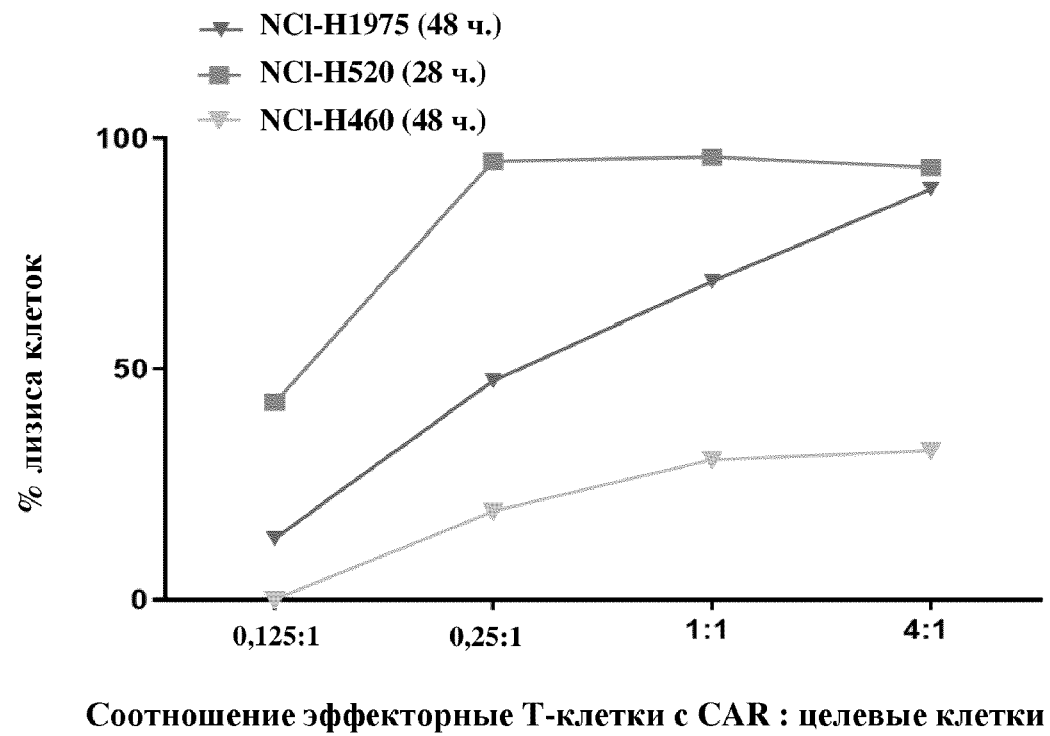
ФИГ. 10С



ФИГ. 11А

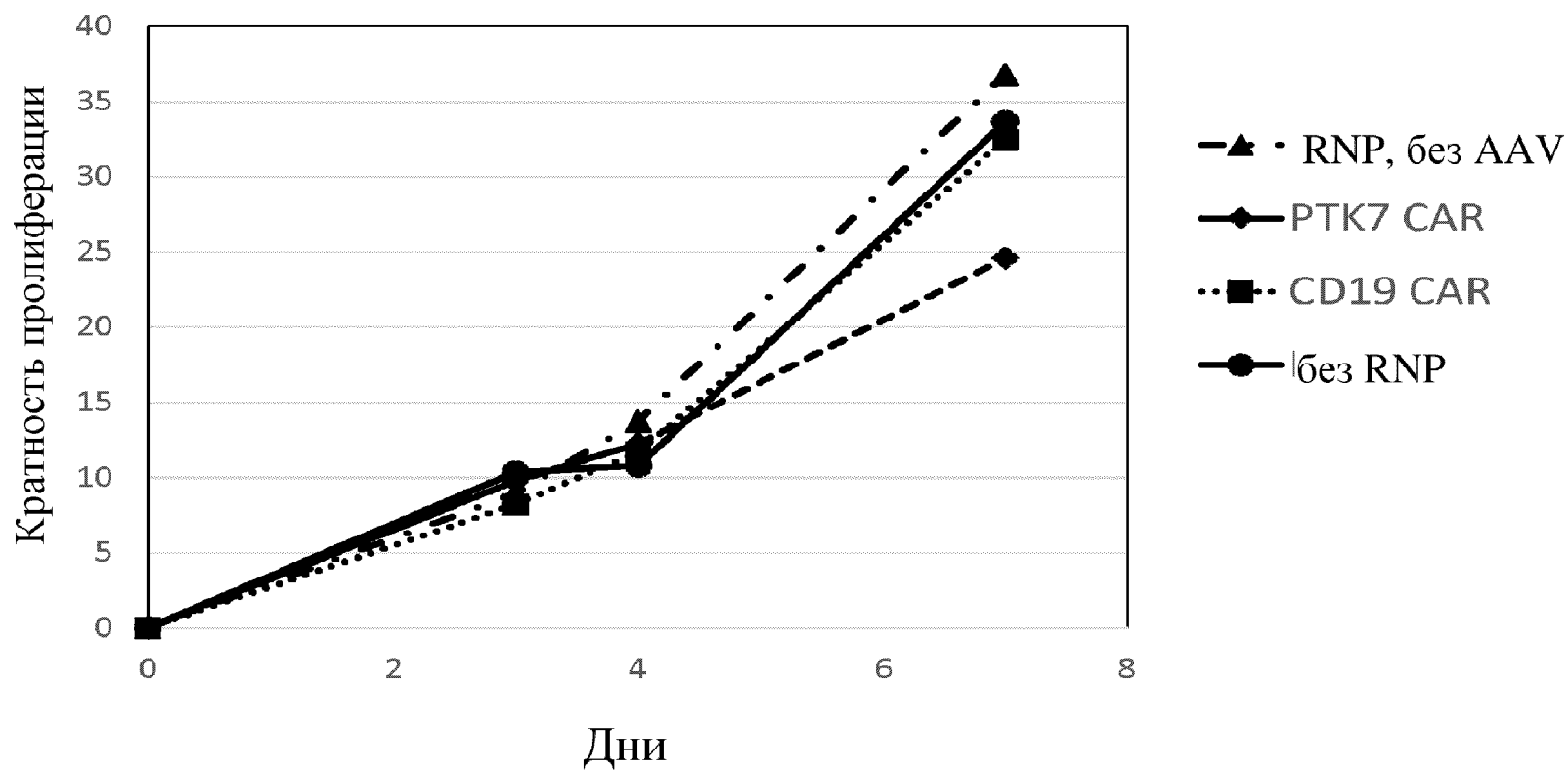


ФИГ. 11В



ФИГ. 11С

Пролиферация клеток после редактирования

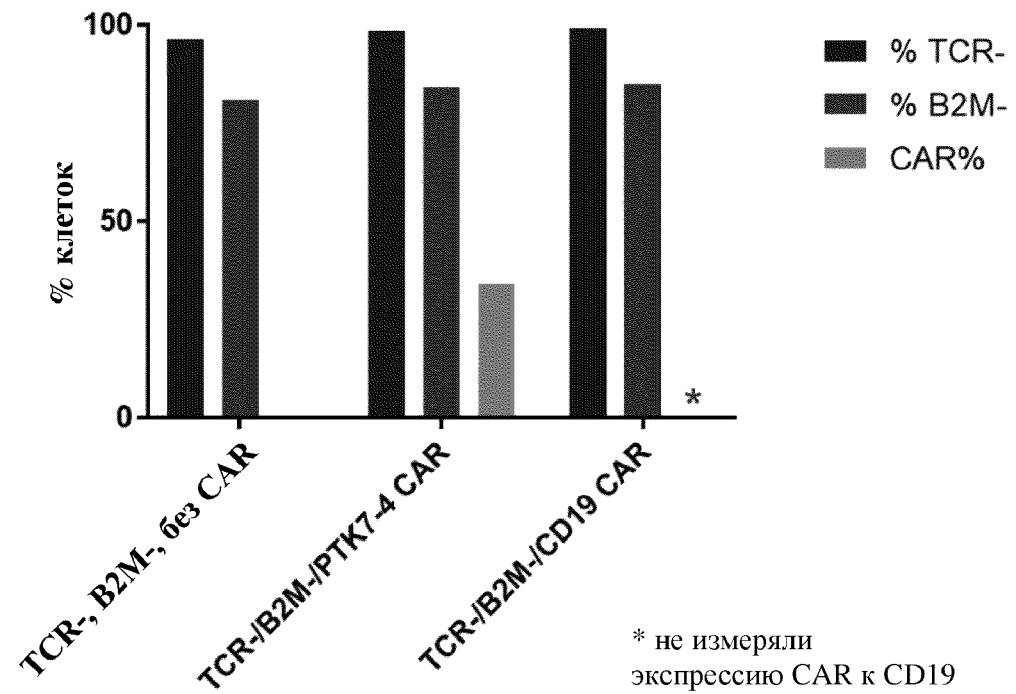


18/34

ФИГ. 12

День 7

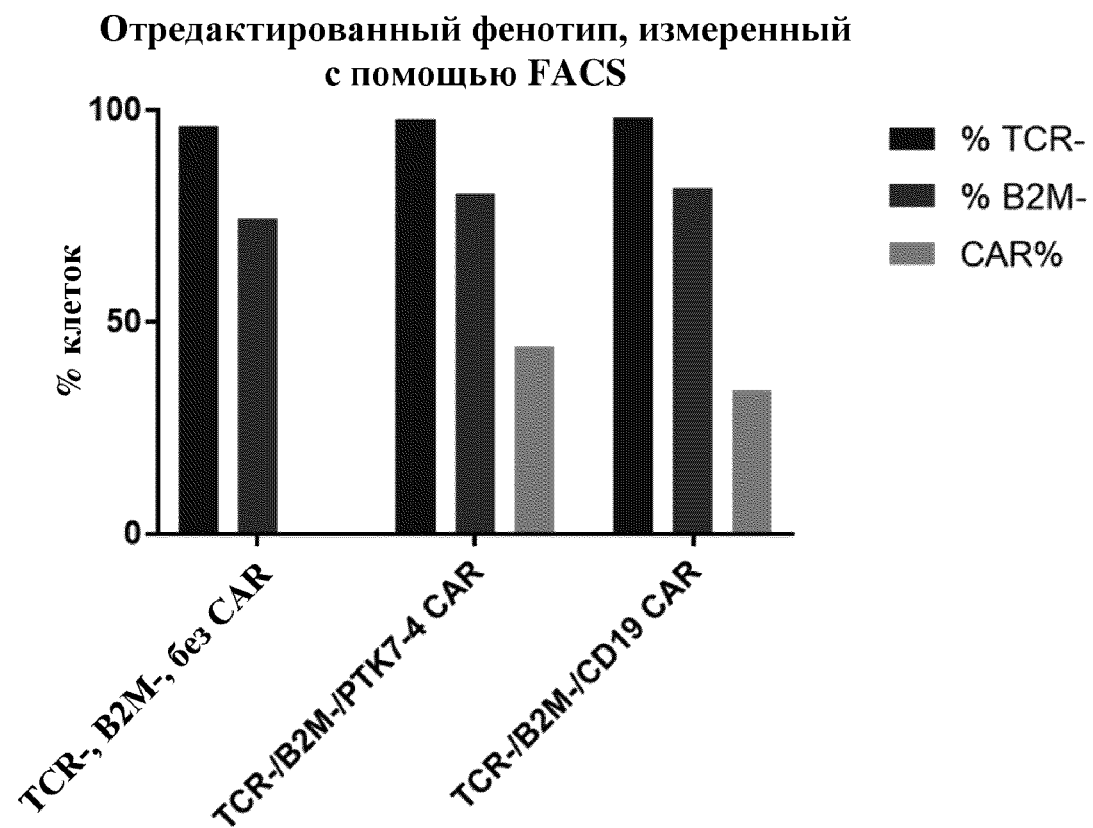
Отредактированный фенотип, измеренный
с помощью FACS



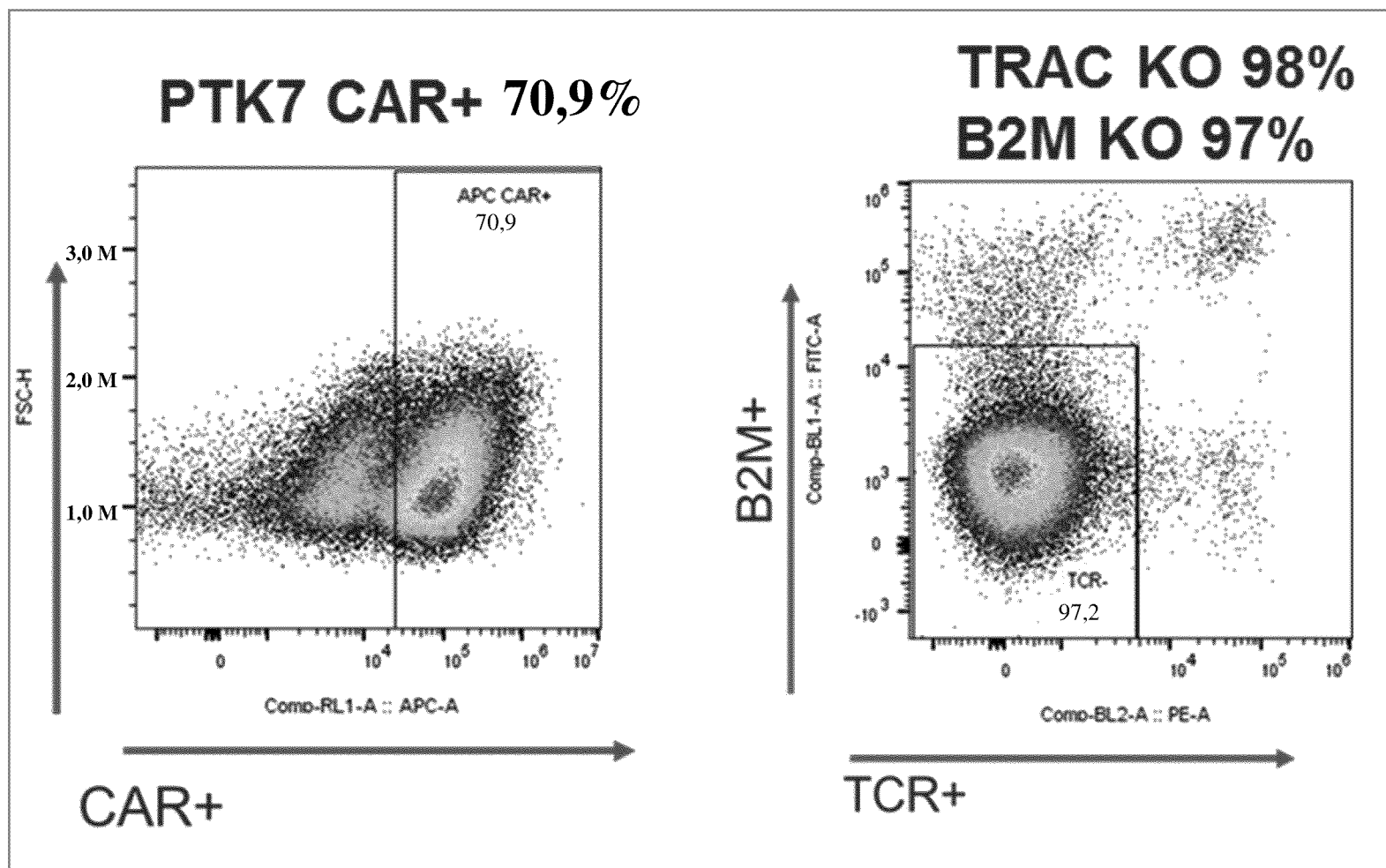
19/34

ФИГ. 13А

День 14

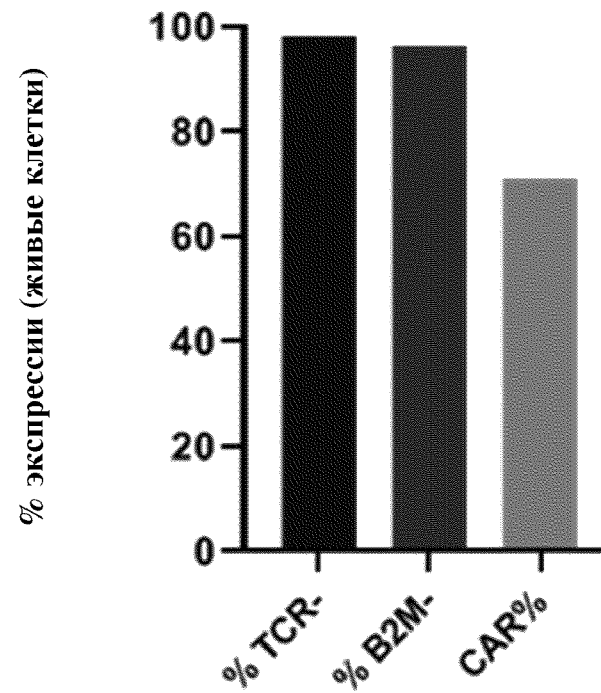


ФИГ. 13В



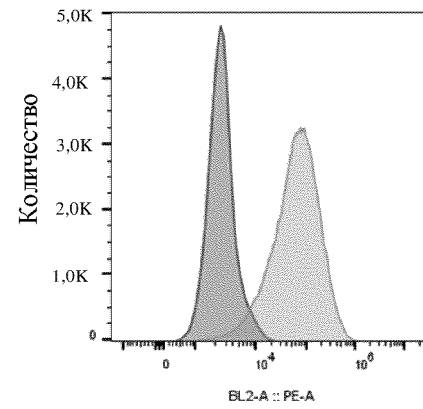
ФИГ. 13С

Редактирование фенотипа Т-клеток с CAR к РТК7, измеренное с помощью FACS (d7 после HDR)



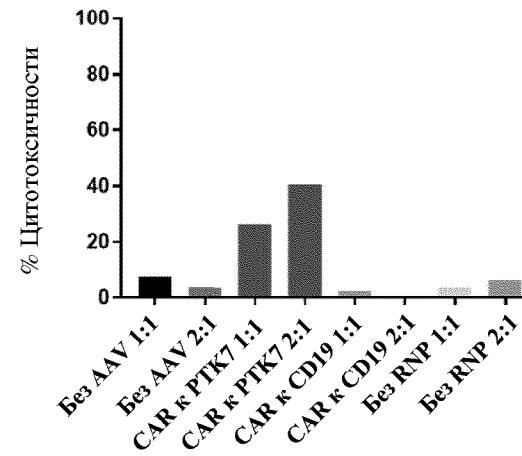
ФИГ. 13D

Экспрессия РТК7 клеточной линией (MCF7)



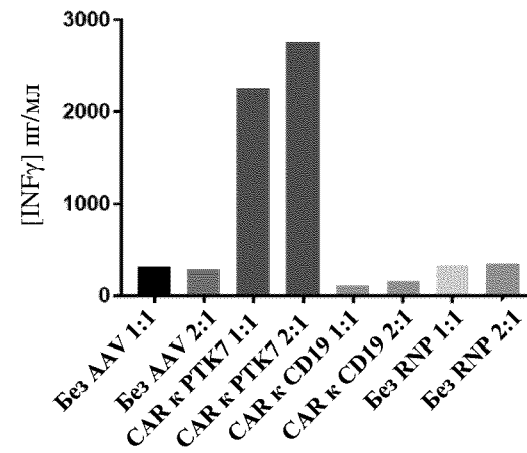
ФИГ. 14А

Цитотоксичность (MCF7)



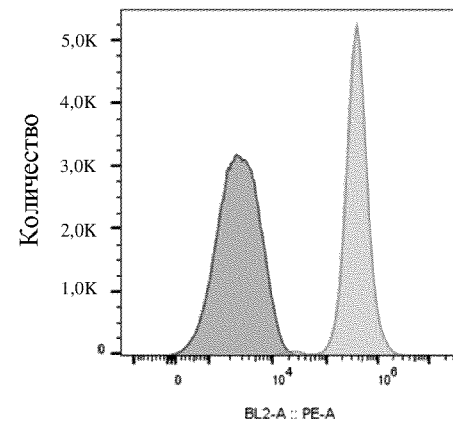
ФИГ. 14В

ELISA в отношении $\text{INF}\gamma$ (MCF7)

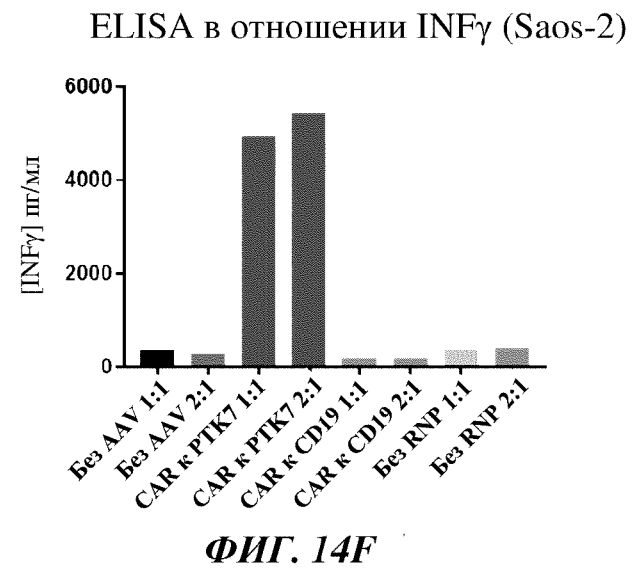
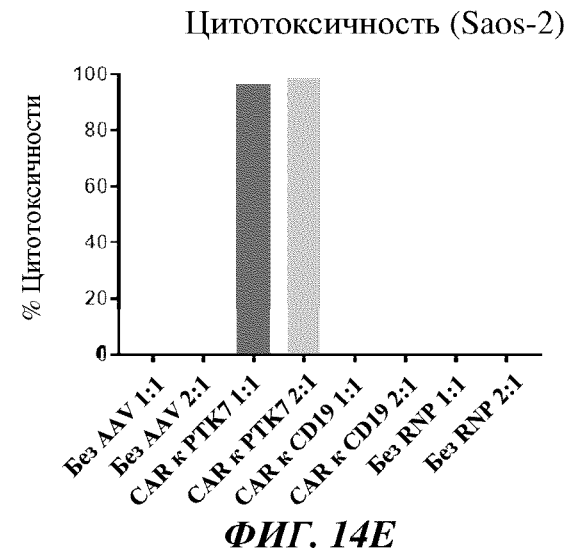


ФИГ. 14С

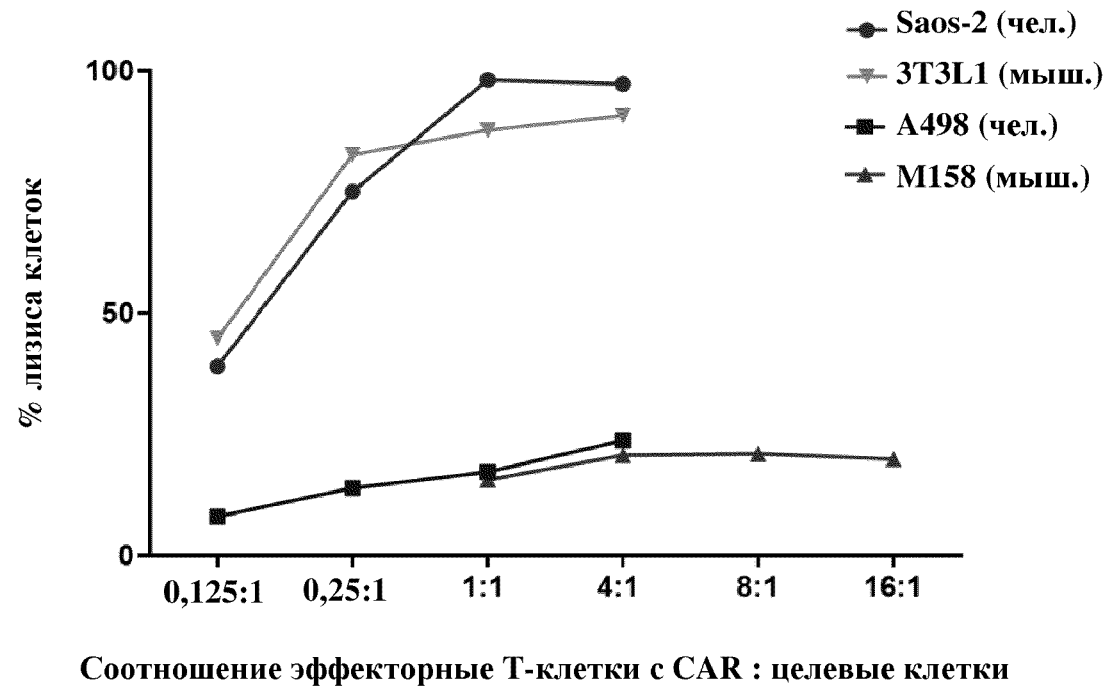
Экспрессия PTK7 клеточной линией (Saos-2)



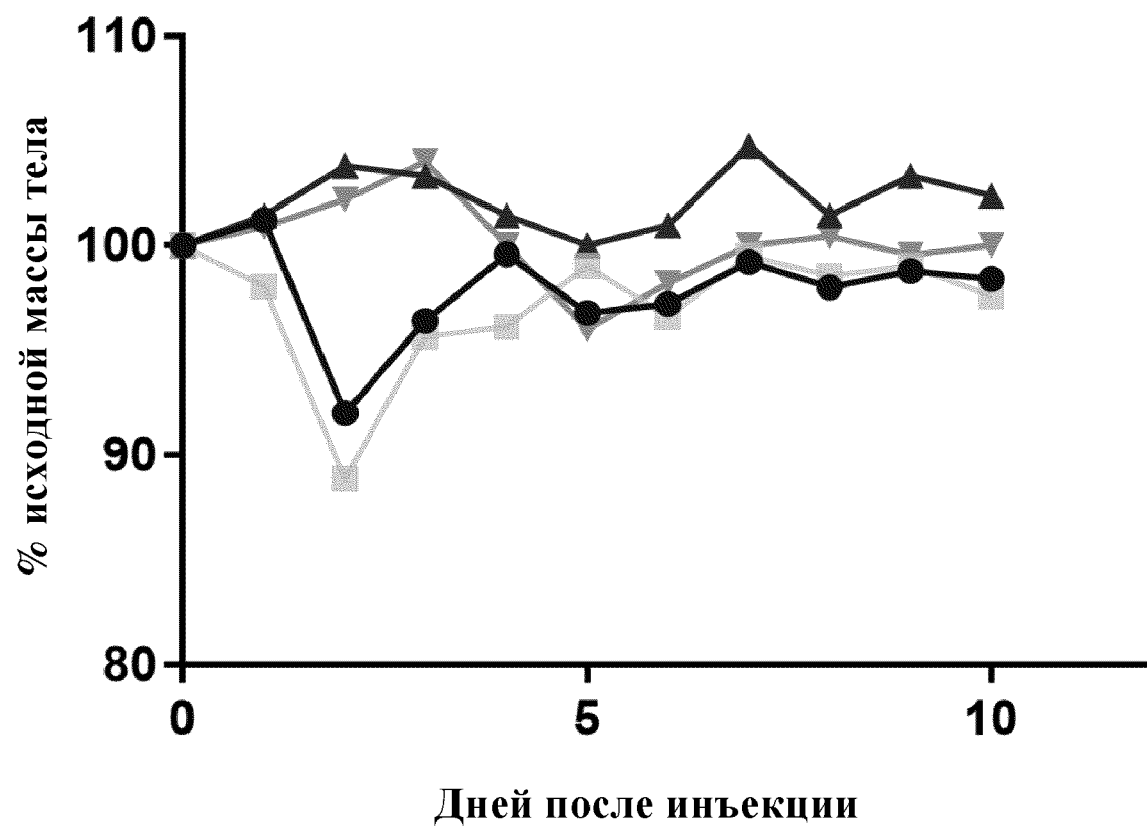
ФИГ. 14D



Т-клетки с CAR к РТК7 эквивалентно эффективны *in vitro* в
человеческих и мышиных клеточных линиях
(день 14 после HDR; 24 ч. анализ цитотокс.)



ФИГ. 15

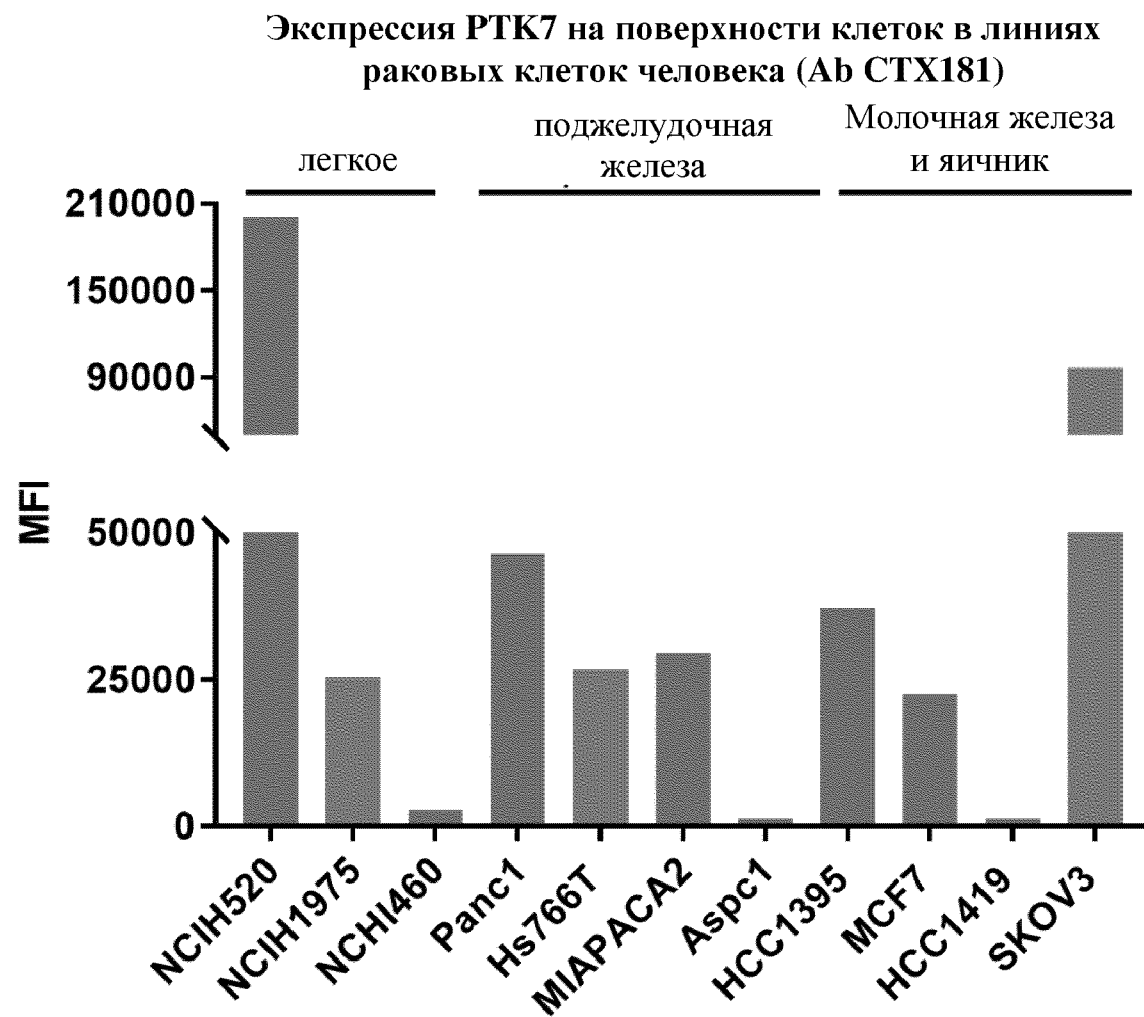


CAR κ PTK7

CAR κ CD19

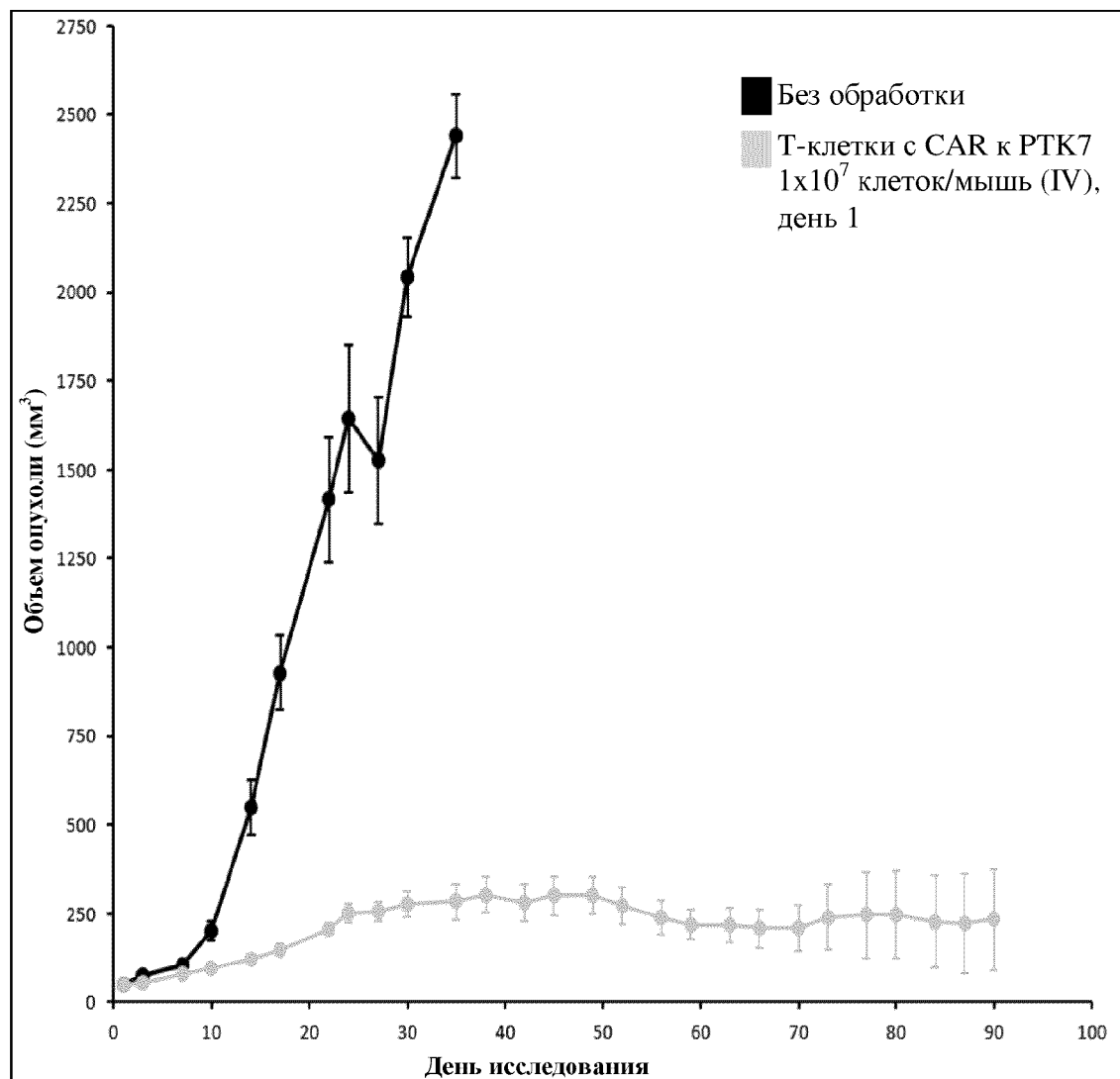
27/34

ФИГ. 16



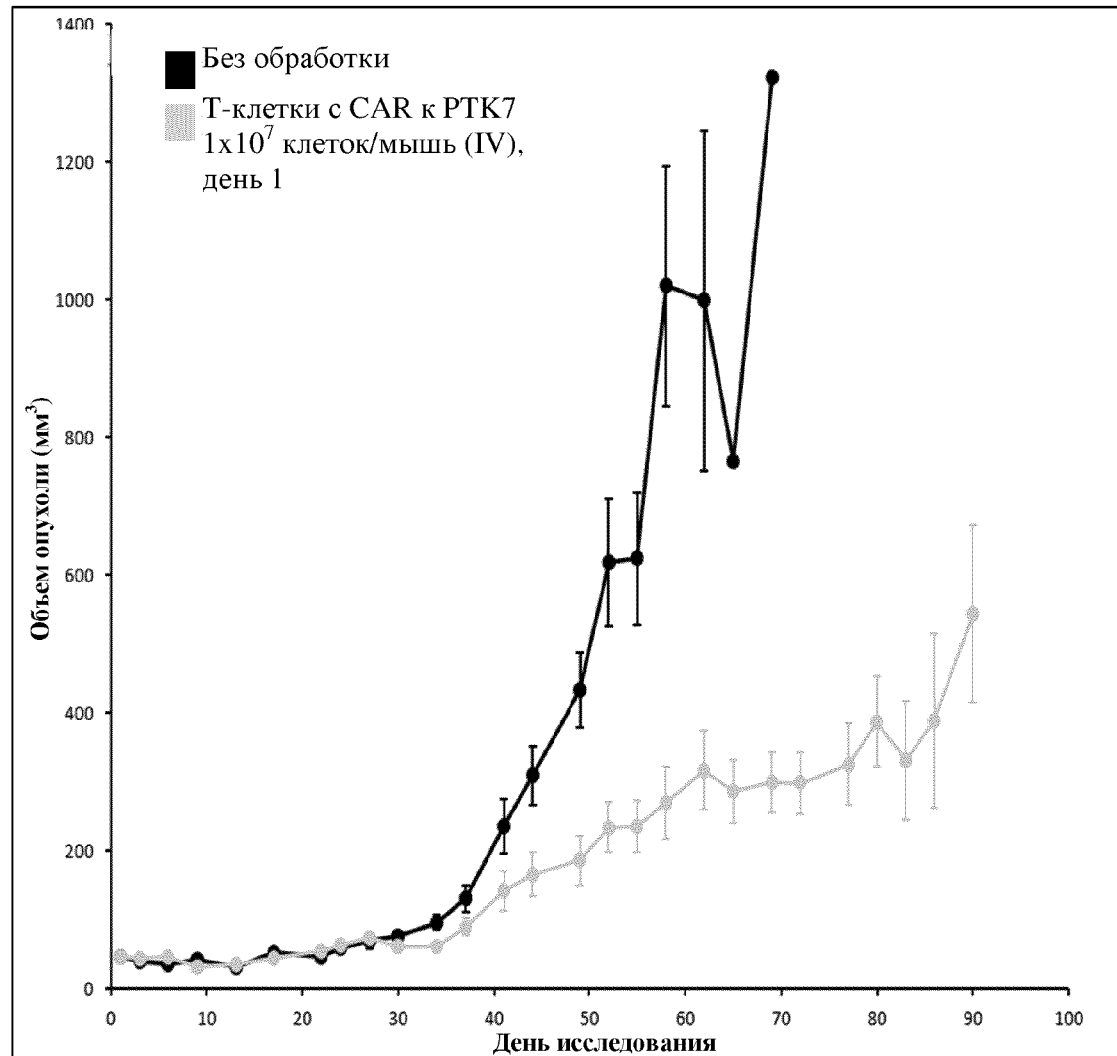
ФИГ. 17

NCI-H1975 - NSCLC



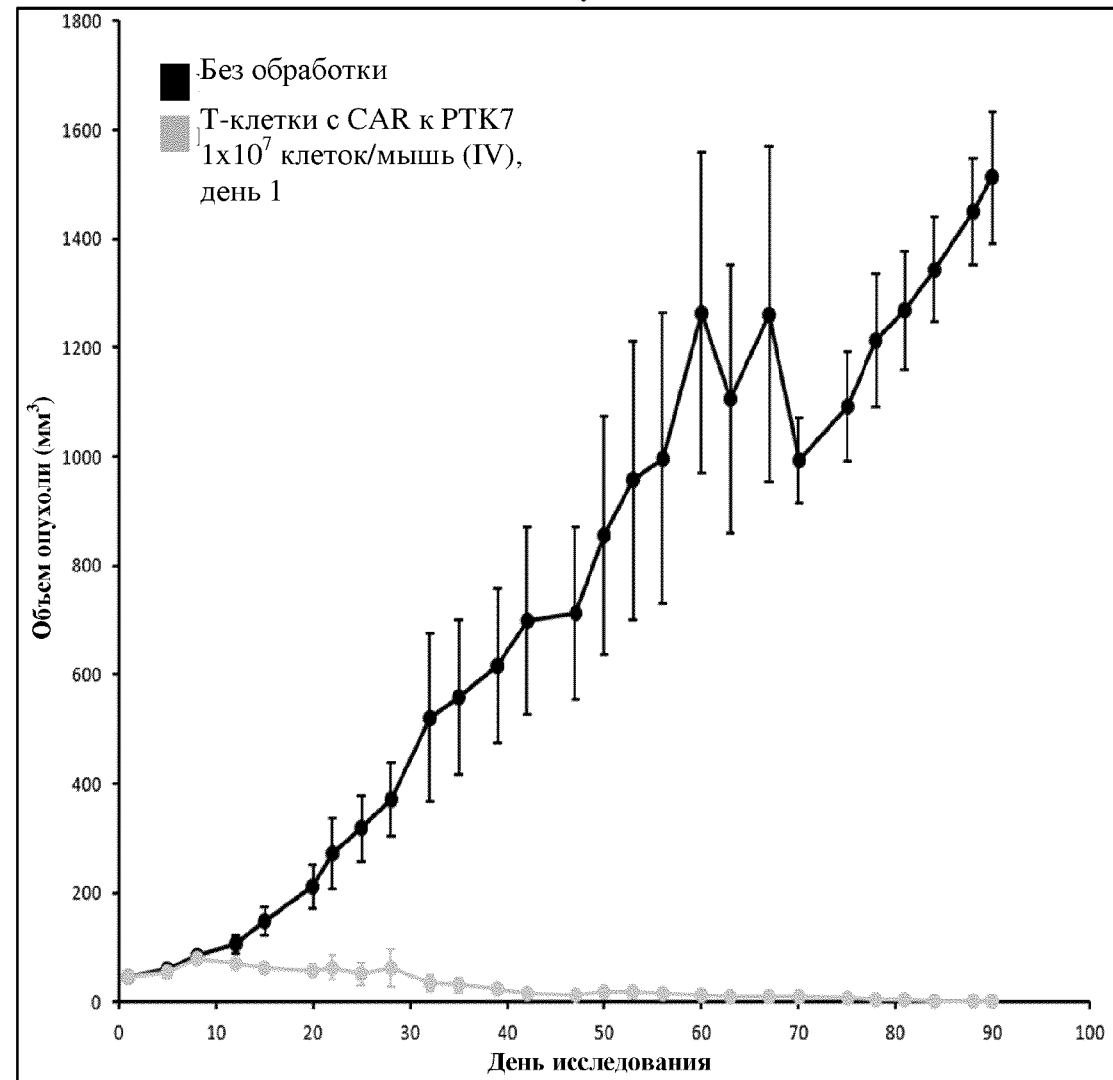
ФИГ. 18А

SKOV3 - Яичники



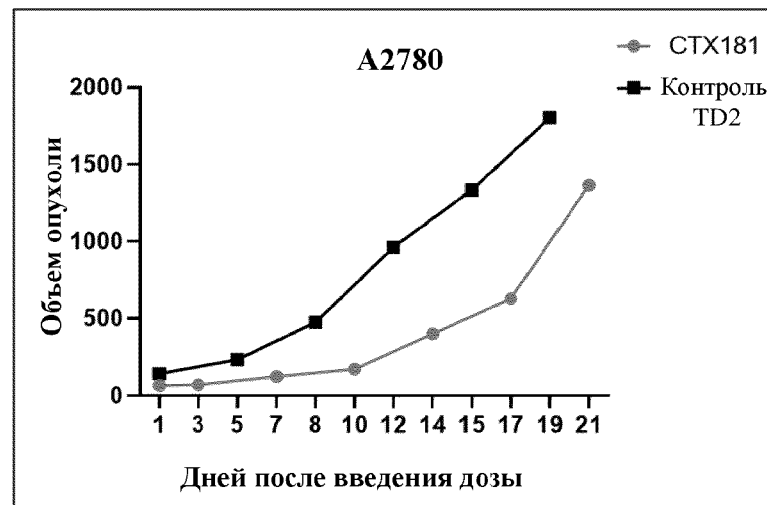
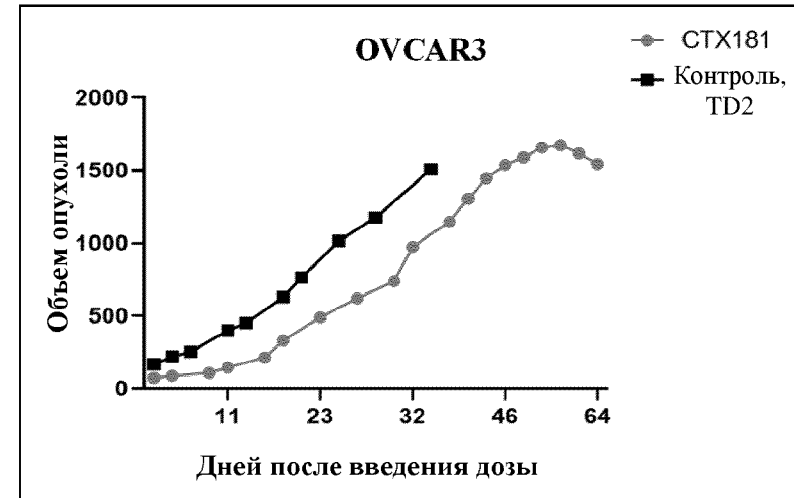
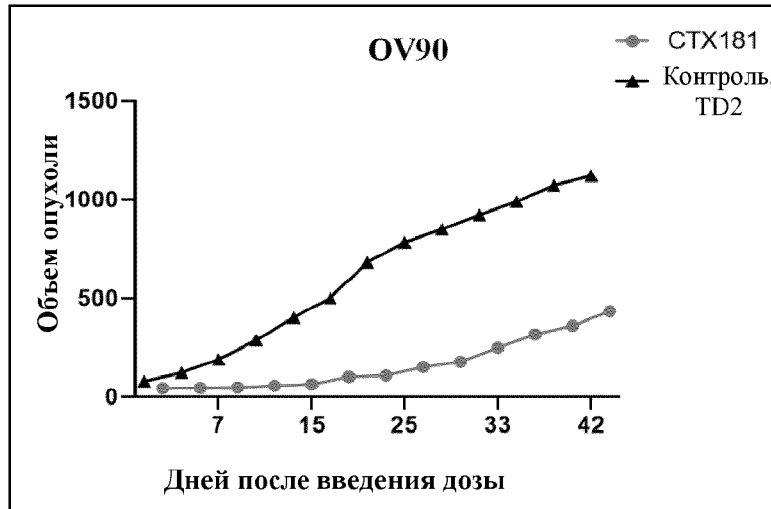
ФИГ. 18В

Нs766Т - Поджелудочная железа



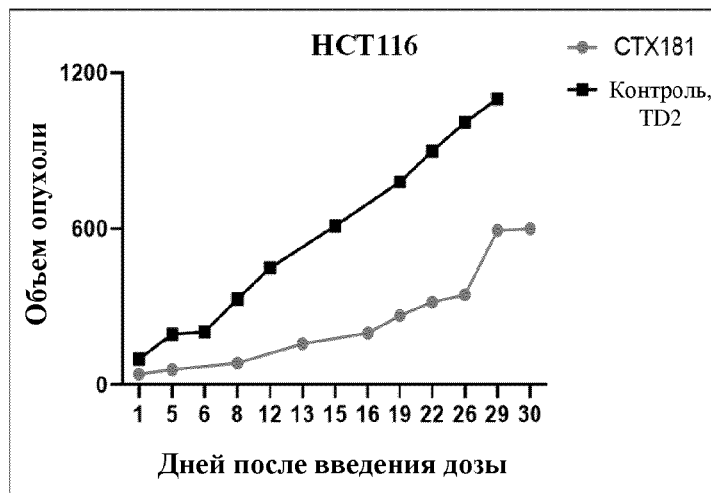
ФИГ. 18С

ЯИЧНИКИ

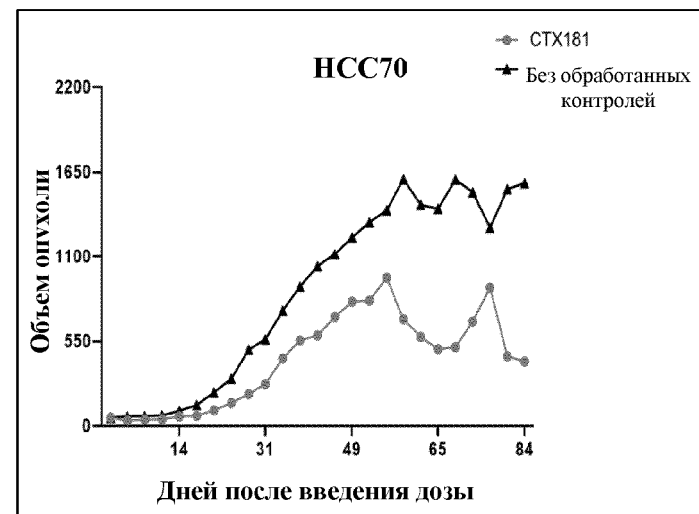
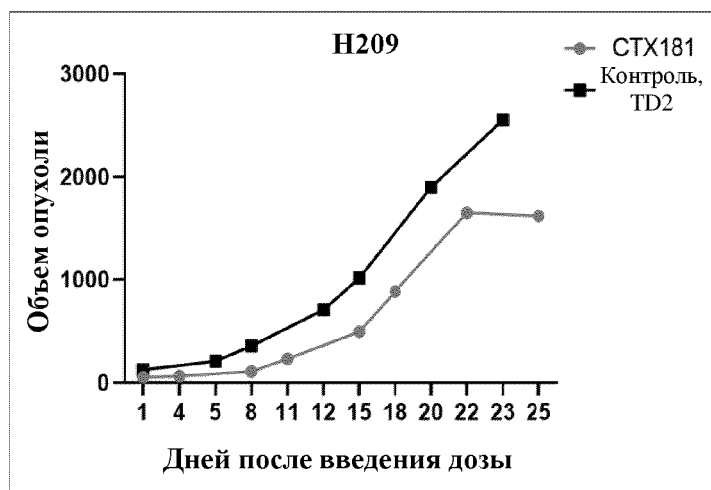
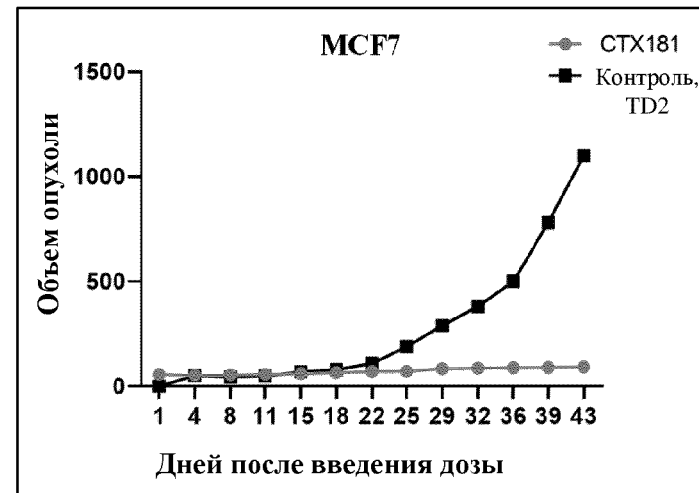


ФИГ. 19А

Толстая кишка и SCLC

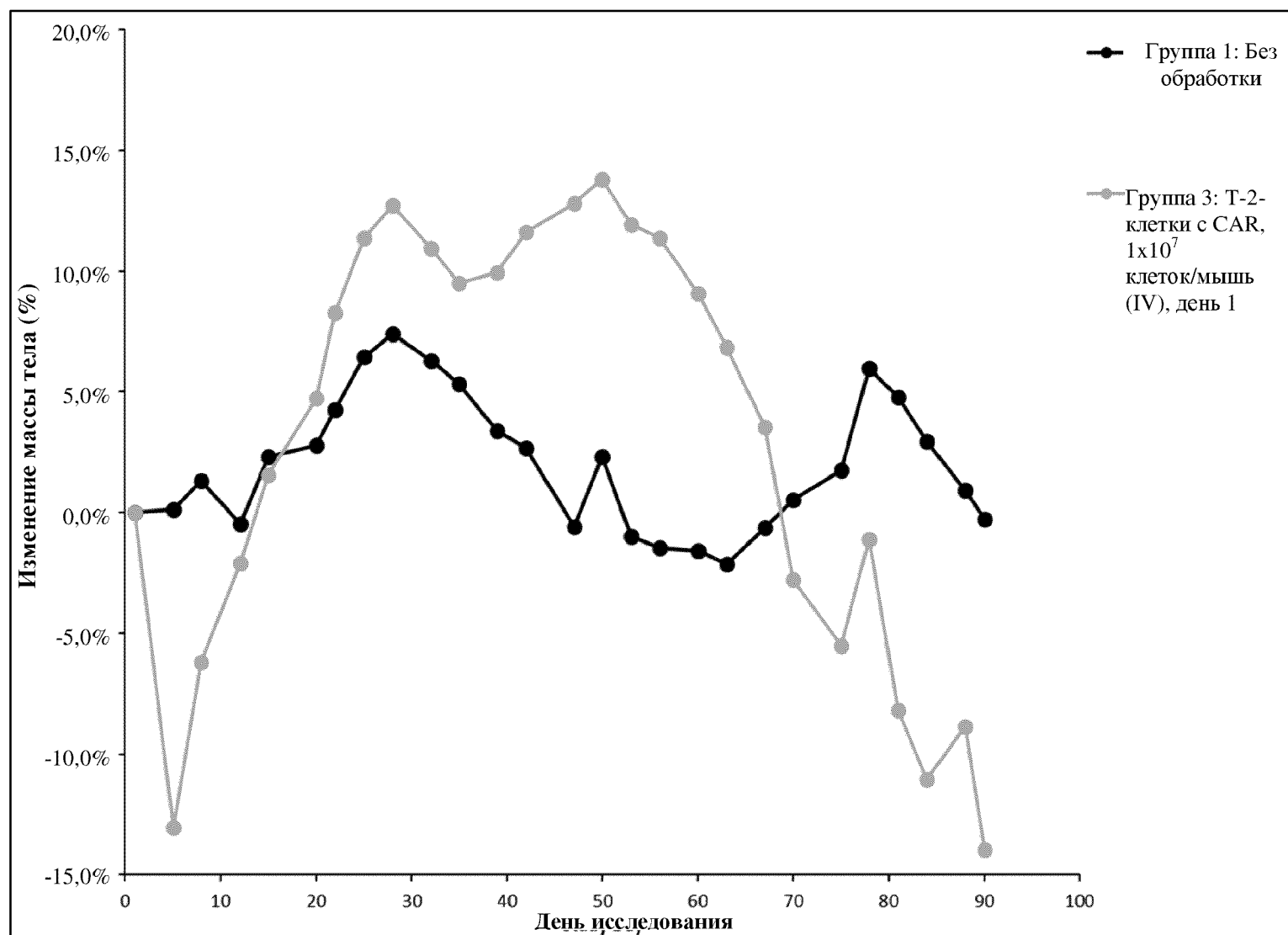


МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА



ФИГ. 19В

ФИГ. 19С



ФИГ. 20