

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041081**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.09.09

(21) Номер заявки
201792042

(22) Дата подачи заявки
2016.04.29

(51) Int. Cl. *A61K 35/17* (2015.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(54) Т-КЛЕТКА, КОТОРАЯ ЭКСПРЕССИРУЕТ Т-КЛЕТОЧНЫЙ РЕЦЕПТОР (TCR) ГАММА-ДЕЛЬТА И ХИМЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР (CAR)

(31) 1507368.7

(32) 2015.04.30

(33) GB

(43) 2018.03.30

(86) PCT/GB2016/051235

(87) WO 2016/174461 2016.11.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮСИЭЛ БИЗНЕС ЛТД. (GB)

(72) Изобретатель:
**Андерсон Джон, Фишер Джонатан,
Пуле Мартен, Густафссон Кент (GB)**

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

(56) DREW C DENIGER ET AL:
"Bispecific T-cells Expressing Polyclonal Repertoire
of Endogenous [gamma][delta] T-cell Receptors
and Introduced CD19-specific Chimeric Antigen
Receptor", MOLECULAR THERAPY, vol. 21, no.
3, 1 March 2013 (2013-03-01), pages 638-647,
XP055278535, GB ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/
mt.2012.267 page 638, column 1, paragraph 1 -
column 2, paragraph 1 page 639, column 2, paragraph
1 page 640, column 1, paragraph 2 page 642, column
1, paragraph 2 - page 643, column 1, paragraph 2
PIZZITOLA IRENE ET AL: "In Vitro
Comparison of Three Different Chimeric Receptor-
modified Effector T-cell Populations for Leukemia
Cell Therapy", JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY,
LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINGS INC, vol.
34, no. 6, 1 July 2011 (2011-07-01), pages 469-479,
XP009190521, ISSN: 1524-9557 page 475, column 1 -
page 476, column 2; figures 4,5 page 469, column 2,
paragraph 2
WO-A1-2015017214
US-A1-2015038684
WO-A1-2015066262
WO-A1-2015123642
WO-A1-2015075468

(57) Настоящее изобретение относится к Т-клетке, которая экспрессирует Т-клеточный рецептор (TCR) гамма-дельта и химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит: антигенсвязывающий домен; трансмембранный домен; и костимуляторный внутриклеточный сигнальный домен; где внутриклеточный сигнальный домен генерирует костимуляторный сигнал для Т-клетки после связывания антигена с антигенсвязывающим доменом.

B1**041081****041081****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к иммунотерапевтическим Т-клеткам. В частности, изобретение относится к иммунотерапевтическим Т-клеткам гамма-дельта, содержащим химерный антигенный рецептор (CAR).

Предпосылки создания изобретения

Химерные антигенные рецепторы (CAR), разработанные для иммунотерапии рака, объединяют в одной молекуле внеклеточный антигенраспознающий домен и сигнальные домены, специфичные для эффекторных клеток. Наиболее распространенная система CAR включает в себя антигенраспознающий домен моноклонального антитела, гибридный с сигнальными доменами, отвечающими за сигналы активации Т-клеток.

Как правило, сигнальные домены CAR генерируют сигналы, участвующие в цитотоксичности, пролиферации и выживании, обеспечивая активацию эффекторной клетки после связывания антигена с антигенраспознающим доменом (сигналы 1 и 2).

Ограничением этой технологии является вероятность появления обусловленной мишенью внеопухолевой токсичности. Такая токсичность индуцируется в результате распознавания CAR ассоциированного с раком антигена, присутствующего на низком уровне на нормальных тканях. Например, GD2 является мишенью, специфичной для нейробластомы, но также экспрессируется в нервах; PSMA является мишенью, специфичной для клеток рака предстательной железы, однако его также можно обнаружить на нормальных клетках почек, печени и толстой кишки и на астроцитах мозга. Эта проблема более выражена в солидных опухолях, в которых наблюдается недостаток высокоселективных мишеней.

Таким образом, существует потребность в способах противоопухолевой иммунотерапии, которые позволяют преодолеть вышеуказанные проблемы.

Сущность изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили способ снижения обусловленной мишенью внеопухолевой токсичности путем применения CAR в гамма-дельта ($\gamma\delta$) Т-клетках. В описанной здесь системе CAR используют для генерирования костимуляторного сигнала (сигнал 2) для $\gamma\delta$ Т-клетки после связывании антигена с антигенраспознающим доменом CAR. Таким образом, сигнал 2 предоставляется только Т-клетке после связывании CAR с антигеном-мишенью (фиг. 2А). Сигнал 1, индуцирующий активацию $\gamma\delta$ Т-клеток, генерируется эндогенным TCR, который активируется сигналами опасности, такими как фосфоантигены. Для осуществления оптимальной эффекторной функции $\gamma\delta$ Т-клетке нужен как сигнал 1, так и сигнал 2. Таким образом, в системе настоящего изобретения $\gamma\delta$ Т-клетка полностью активируется с индукцией цитотоксичности, пролиферации и секреции цитокинов только в том случае, если клетка-мишень: (i) экспрессирует антиген, распознаваемый CAR; и (ii) экспрессирует сигналы опасности, распознаваемые эндогенным $\gamma\delta$ TCR.

Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к Т-клетке, которая экспрессирует рецептор гамма-дельта Т-клеток (TCR) и химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит:

- (i) антигенсвязывающий домен;
- (ii) трансмембранный домен; и
- (iii) костимуляторный внутриклеточный сигнальный домен;

где внутриклеточный сигнальный домен обеспечивает костимуляторный сигнал для Т-клетки после связывания антигена с антигенсвязывающим доменом.

Таким образом, связывание первого антигена с $\gamma\delta$ TCR приводит к генерированию сигнала 1, а связывание второго антигена с антигенсвязывающим доменом CAR приводит к генерированию сигнала 2.

Антигенсвязывающий домен способен связываться с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA).

Антигенсвязывающий домен способен связываться с GD2, CD33, CD19 или EGFR.

Внутриклеточный сигнальный домен может содержать сигнальный домен DAP10, CD28, CD27, 41BB, OX40, CD30, IL2-R, IL7-R, IL21-R, NKp30, NKp44 или DNAM-1 (CD226).

Трансмембранный домен CAR может содержать каркас CD8 или трансмембранный домен CD28.

Внутриклеточный сигнальный домен CAR может содержать сигнальный домен DAP10. CAR может дополнительно содержать спейсерный домен между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом.

$\gamma\delta$ TCR способен связываться с комплексом фосфоантиген/бутирофилин 3A1; цепью А основного комплекса гистосовместимости класса I (MICA); цепью В основного комплекса гистосовместимости класса I (MICB); лигандом NKG2D 1-6 (ULBP 1-6); CD1c; CD1d; эндотелиальным рецептором белка С (EPCR); липогексапептидами; фикоэритрином или гистицил-тРНК-синтазой. CAR может содержать одну из следующих аминокислотных последовательностей:

SEQ ID NO: 1 (aCD33-Fc-DAP10 CAR)

MAVPTQVLGLLLWLTDAECDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYFNLVWYQ
QKPGKAPKLLIYDNRADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNY
PLTFGGGTGLEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGG
SLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISR
DNAKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFDYWGQGLTVTVSSMDPAEPK
SPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVWDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDLNGKEYCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGKKDPKFWLWVGGLACYSLLVTVAFIIFWVCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG

SEQ ID NO: 2 (aGD2-Fc-DAP10 CAR)

METDTLLLVWLLWVPGSTGQVQLQESGPGLVKPSQTLISITCTVSGFSLASYNHWW
RQPPGKLEWLGVIWAGGSTNYNSALMSRLTISKDNSKNQVFLKMSSLTAAQTAVY
YCAKRSDDYSWFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSENQMTQSPSSLSA
SVGDRVTMTCRASSSVSSYLHWYQQKSGKAPKVIYSTNLASGVPSRFSGSGS
GTDYTLTISSLQPEDFATYYCQYSGYPITFGQGTKEIKRSDPAEPKSPDKTHTCP
PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKF
WVLVWGGVLACYSLLVTVAFIIFWVCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG

В другом аспекте настоящее изобретение относится к CAR, содержащему:

- (i) антигенсвязывающий домен;
- (ii) трансмембранный домен; и
- (iii) внутриклеточный сигнальный домен;

где внутриклеточный сигнальный домен содержит костимуляторный внутриклеточный сигнальный домен, но не содержит эндодомена CD3.

Костимуляторный внутриклеточный сигнальный домен может быть выбран из сигнальных доменов DAP10, CD28, CD27, 41BB, OX40, CD30, IL2-R, IL7-R, IL21-R, NKp30, NKp44 и DNAM-1 (CD226). Во втором аспекте настоящее изобретение относится к CAR, содержащему антигенсвязывающий домен; трансмембранный домен; и внутриклеточный сигнальный домен; где внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен DAP10. Внутриклеточный сигнальный домен может состоять из сигнального домена DAP10, или в основном состоит из сигнального домена DAP10.

В конкретном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR по второму аспекту изобретения не содержит эндодомена CD3.

CAR по второму аспекту изобретения может представлять собой CAR, определенный в первом аспекте изобретения.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, определенный в первом или втором аспектах изобретения. В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, определенную в третьем аспекте изобретения.

Вектор может представлять собой ретровирусный вектор, лентивирусный вектор или транспозон. В пятом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения клетки по первому аспекту изобретения, который включает стадию введения в клетку последовательности нуклеиновой кислоты по третьему аспекту изобретения, или вектора по четвертому аспекту изобретения. Способ может включать стадию стимуляции клетки средством, способным стимулировать гамма-дельта Т-клетки. Средство, способное стимулировать $\gamma\delta$ Т-клетки, может быть выбрано, например, из изопентенилпирофосфата (IPP); аналогов IPP, таких как бромгидринпирофосфат и (Е)-4-гидрокси-3-метилбут-2-енилпирофосфат; и ингибиторов фарнезилпирофосфатсинтазы (FPPS), таких как аминокислоты (например, золедронат или памидронат).

Клетка может быть получена из образца, выделенного из организма индивидуума.

В шестом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей клетку по первому аспекту настоящего изобретения.

В седьмом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания, который включает стадию введения индивидууму фармацевтической композиции по шестому аспекту изобретения. Способ может включать стадию введения индивидууму средства, стимулирующего $\gamma\delta$ Т-клетки.

Средство, стимулирующее $\gamma\delta$ Т-клетки, может быть выбрано, например, из изопентенилпирофосфата (IPP); аналогов IPP, таких как бромгидринпирофосфат и (Е)-4-гидрокси-3-метилбут-2-енилпирофосфат; и ингибиторов фарнезилпирофосфатсинтазы (FPPS), таких как аминокислоты (например, золедронат или памидронат).

Способ может включать следующие стадии:

- (i) выделение из организма индивидуума образца, содержащего клетки;
- (ii) трансдукцию или трансфекцию клеток: образцом нуклеиновой кислоты по третьему аспекту настоящего изобретения, или вектором по четвертому аспекту настоящего изобретения; и
- (iii) введение индивидууму клеток, полученных на стадии (ii).

В восьмом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции по шестому аспекту настоящего изобретения для применения в лечении заболевания.

В девятом аспекте настоящее изобретение относится к применению клетки по первому аспекту настоящего изобретения в производстве лекарственного средства для лечения и/или профилактики заболевания.

Описанная здесь болезнь может представлять собой рак, микробную инфекцию или вирусную инфекцию. Таким образом, настоящее изобретение относится к $\gamma\delta$ Т-клетке, которая полностью активируется клеткой-мишенью с последующим ее уничтожением, где клетка-мишень экспрессирует первый антиген, способный связываться с эндогенным $\gamma\delta$ TCR (и тем самым стимулировать эффективный сигнал 1), и второй антиген, способный связываться с CAR (и тем самым стимулировать эффективный сигнал 2).

Таким образом, $\gamma\delta$ Т-клетки настоящего изобретения можно использовать для уменьшения нежелательных обусловленных мишенью внеопухолевых эффектов. В частности, нормальная клетка, которая экспрессирует низкие уровни ТАА, не активирует $\gamma\delta$ Т-клетку настоящего изобретения, поскольку она не экспрессирует сигнал опасности, распознаваемый эндогенным $\gamma\delta$ TCR, и, следовательно, не генерирует сигнал 1, необходимый для полной активации $\gamma\delta$ Т-клеток.

Описание чертежей

Фиг. 1 - схема сигнального пути, необходимого для полной активации $\gamma\delta$ Т-клетки, приводящей к уничтожению клетки-мишени. А) и В) Сигнальный путь, опосредованный только $\gamma\delta$ TCR, или только корецепторами, не приводит к полной активации $\gamma\delta$ Т-клетки. С) Сочетание сигнальных путей, опосредованных $\gamma\delta$ TCR и корецепторами, приводит к полной активации $\gamma\delta$ Т-клетки.

Фиг. 2 - схематическое изображение $\gamma\delta$ Т-клетки настоящего изобретения. А) Нормальная активация $\gamma\delta$ Т-клетки клеткой-мишенью. В) Блокирование сигнала 2 растворимыми лигандами NKG2D, секретируемыми раковыми клетками, препятствует полной активации $\gamma\delta$ Т-клеток. С) Полная активация $\gamma\delta$ Т-клетки настоящего изобретения под действием трансформированной клетки. D) Нормальные здоровые клетки не экспрессируют сигналы опасности, распознаваемые эндогенными рецепторами $\gamma\delta$ Т-клеток, и не вызывают полную активацию $\gamma\delta$ Т-клетки настоящего изобретения.

Фиг. 3 - примеры типичных CAR, которые можно использовать в настоящем изобретении.

Фиг. 4 - результаты проточной цитометрии, представленные в виде точечных диаграмм, иллюстрируют совместную экспрессию $\gamma\delta$ TCR (V62) и GD2-DAP10 CAR (Fc, маркер CD20 и маркер CD34) в $\gamma\delta$ Т-клетке.

Фиг. 5 - уничтожение клеточных линий GD2+ LAN1 и TC71 $\gamma\delta$ Т-клетками V52, трансдуцированными CAR aGD2-Fc-DAP10. А) Достоверное уничтожение линии клеток нейробластомы GD2+ LAN1 наблюдается только при использовании в качестве эффекторов CAR-трансдуцированных клеток, но не при использовании нетрансдуцированных (NT) клеток V52. В) Аддитивный эффект сочетания CAR aGD2-Fc-DAP10 с воздействием в течение 24 ч золедроновой кислоты, которая увеличивает продукцию фосфоантигенов, против линии клеток саркомы Юинга GD2+ TC71. С) Добавление CAR к $\alpha\beta$ Т-клеткам, у которых отсутствует сигнал 1, индуцируемый $\gamma\delta$ TCR в ответ на клеточный стресс, не влияет на цитотоксичность, тогда как в $\gamma\delta$ Т-клетках V52+ наблюдается эффект от добавления CAR. Это указывает на то, что один сигнал CAR недостаточен для активации Т-клеток. Планки погрешностей обозначают SEM для 3-6 независимых доноров.

Фиг. 6 - уничтожение клеточной линии GD2+ LAN1 и отсутствие уничтожения клеточной линии GD2- SKNSH. Планки погрешностей обозначают SEM для 3-6 независимых доноров.

Фиг. 7 - сохранение экспрессии CAR после продолжительного совместного культивирования и GD2-специфический рост. А) совместное культивирование начинают через 24 дня после трансдукции (обозначают D0). Серийный анализ клеток на наличие CAR (ось Y) и TCRV52 (ось X) проводят в присутствии облученных клеток нейробластомы GD2+ (LAN1) и GD2- (SK-N-SH). Показаны репрезентативные данные от 1 из 3 доноров. В) Рост gG2-Fc-DAP10-трансдуцированных клеток V52+ наблюдается только в присутствии облученных клеток-мишеней GD2+ (графическое представление данных, n=3 независимых донора, планки погрешностей обозначают SEM).

Фиг. 8 - анализ окрашивания методом проточной цитометрии демонстрирует, что уровни экспрессии CD33 в линиях клеток AML (Nomol, Sh1 и MV4; 11) и в свежeweделенных моноцитах являются эквивалентными.

Фиг. 9 - А) aCD33-DAP10-трансдуцированные клетки V52 щадят моноциты в отсутствии ZOL, в отличие от aCD33-CD28z-трансдуцированных клеток V52. В) aCD33-DAP10-трансдуцированные клетки

V52 уничтожают AML лучше, чем NT клетки V52, но щадят моноциты. Планки погрешностей обозначают SEM для 3 независимых доноров.

Фиг. 10 - нуклеотидные и аминокислотные последовательности CAR анти-GD2-Fc-DAP10.

Фиг. 11 - нуклеотидные и аминокислотные последовательности CAR анти-CD33-Fc-DAP10.

Фиг. 12 - aCD33-DAP10-трансдуцированные клетки V52 щадят гемопоэтические стволовые клетки, в отличие от CD33-CD28z-трансдуцированных клеток V52. Нормальный человеческий костный мозг культивируют в течение ночи с указанными Т-клетками CAR. Выжившие гемопоэтические стволовые клетки анализируют на способность образовывать миелоидные колонии в мягком агаре. Данные получают с использованием трансдуцированных клеток V52 трех независимых доноров.

Фиг. 13 - разная сшивка CAR "только костимуляция" и TCR $\gamma\delta$ приводит к разным цитокиновым ответам. Вверху: схема эксперимента. Биотинилированные гранулы (A) не покрывают антителами/покрывают нерелевантными антителами, или (B) покрывают антителами, обеспечивающими связывание либо с TCR (анти-CD3), либо с CAR (анти-Ig, связывающееся со спейсерным участком CAR); C) после сшивки измеряют активацию путем определения внутриклеточной секреции цитокинов. В качестве контроля используют стимуляторные гранулы анти-CD3/CD28 (Miltenyi). Внизу слева: типичные участки FACS; внизу справа: цитокиновые ответы на сшивку показывают, что сшивка CAR "только костимуляция" индуцирует TNF- α -ответ, однако для полного ответа, включающего продукцию и интерферона γ , и TNF- α , требуется также участие TCR. Данные приведены в виде средних значений от 5 доноров $\pm$ SD.

Подробное описание

$\gamma\delta$ Т-клетки.

Т-клетки подразделяют на две группы в зависимости от Т-клеточных рецепторных (TCR) компонентов. Гетеродимер TCR состоит из α - и β -цепи у 95% Т-клеток. Они распознают чужеродные антигены через посредство пептидов, презентируемых молекулами МНС на антигенпрезентирующих клетках, и имеют важное значение для адаптивного иммунитета. 5% Т-клеток содержат TCR, состоящие из γ - и δ -цепей, причем $\gamma\delta$ TCR являются независимыми от МНС и могут обнаруживать маркеры клеточного стресса, экспрессируемые опухолями, $\gamma\delta$ Т-клетки распознают патогены и трансформированные клетки в HLA-независимой манере. Отвечая на маркеры клеточного стресса (например, фосфоантигены, высвобождаемые трансформированными клетками в качестве побочных продуктов мевалонатного пути биосинтеза), $\gamma\delta$ Т-клетки выполняют присущие им цитотоксические, а также антигенпрезентирующие функции, особенно в присутствии антитело-опсонизированных клеток-мишеней, $\gamma\delta$ Т-клетки отвечают за "контроль стресс-индуцированного состояния лимфоидных клеток", т.е. непосредственно реагируют на инфекции или немикробный стресс при отсутствии необходимости клонального роста или дифференциации de novo.

Активация $\gamma\delta$ Т-клеток регулируется балансом между стимулирующими и ингибирующими сигналами. Они активируются под действием лигандов $\gamma\delta$ TCR (таких как фосфоантигены) в сочетании с МНС-ассоциированными лигандами члена 1 подсемейства К лектин-подобных рецепторов активаторных рецепторных киллерных клеток (KLRK1), также известного как NKG2D, такими как родственная полипептиду МНС класса I последовательность А (MICA), MICB и различные члены семейства UL16-связывающих белков (ULBP). Клетки $\gamma\delta$ также экспрессируют иммуноглобулиноподобные рецепторы киллерных клеток (KIR), которые могут быть либо активирующими, либо ингибирующими, в том числе иммуноглобулиноподобный рецептор киллерной клетки, содержащий 2 домена и 1 длинный цитоплазматический хвост (KIR2DL1), и иммуноглобулиноподобный рецептор киллерной клетки, содержащий 3 домена и 1 длинный цитоплазматический хвост (KIR3DL1).

Полная активация $\gamma\delta$ Т-клетки, которая приводит к эффективному уничтожению клетки-мишени, требует продуктивного генерирования сигнала 1 и сигнала 2 (фиг. 1 и 2A). $\gamma\delta$ Т-клетки генерируют сигнал 1 при активации Т-клеток под действием антигенов-сигналов опасности, присутствующих на трансформированных или инфицированных клетках. Указанные антигены-сигналы опасности распознаются посредством $\gamma\delta$ TCR. Сигнал 2, необходимый для активации $\gamma\delta$ Т-клеток, также обычно генерируется под действием молекул-сигналов опасности (таких как MICA), присутствующих на трансформированных или инфицированных клетках. Сигнал 2 может трансдуцироваться, например, через рецептор NKG2D и DAP 10 (фиг. 2A).

В качестве средств, позволяющих избежать обнаружения иммунной системой, раковые клетки часто секретируют растворимые лиганды NKG2D, эффективно блокирующие сигнал 2 в $\gamma\delta$ Т-клетках и тем самым предотвращающие активацию клеток и способствующие инфильтрации опухоли (фиг. 2B).

В первом аспекте настоящее изобретение относится к Т-клетке, которая экспрессирует $\gamma\delta$ TCR и CAR, где внутриклеточный сигнальный домен CAR обеспечивает костимуляторный сигнал для Т-клетки.

Таким образом, $\gamma\delta$ TCR и CAR располагаются таким образом, что $\gamma\delta$ TCR генерирует сигнал 1, а CAR генерирует сигнал 2 при связывании каждого рецептора, соответственно. В настоящем описании костимуляторный сигнал является синонимом сигнала 2, который необходим для полной активации $\gamma\delta$ Т-клеток.

Следовательно, $\gamma\delta$ Т-клетка в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения полностью активируется только клеткой-мишенью, которая экспрессирует первый антиген, способный связываться с $\gamma\delta$ TCR (и посредством этого стимулировать эффективный сигнал 1), и второй антиген, способный связываться с CAR (и посредством этого стимулировать эффективный сигнал 2) (фиг. 2C), с последующим уничтожением указанной клетки-мишени. В отсутствие связывания антигена с $\gamma\delta$ TCR сигнал 1 не генерируется и полная активация $\gamma\delta$ Т-клеток не достигается. Другими словами, в отсутствие связывания антигена с $\gamma\delta$ TCR $\gamma\delta$ Т-клетка не приобретает способность к уничтожению клетки-мишени (фиг. 2D). В отсутствие связывания антигена с CAR сигнал 2 не генерируется и полная активация $\gamma\delta$ Т-клеток не достигается. Другими словами, в отсутствие связывания антигена с CAR $\gamma\delta$ Т-клетка не приобретает способность к уничтожению клетки-мишени.

$\gamma\delta$ Т-клетка настоящего изобретения может экспрессировать любой $\gamma\delta$ TCR. Примеры лигандов $\gamma\delta$ TCR известны в данной области (см., например, Vantourout, P. & Hayday, A. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 88-100 (2013)).

В качестве примера $\gamma\delta$ TCR, экспрессируемый клеткой настоящего изобретения, может распознавать фосфоантигены (такие как изопентенилпирофосфат (IPP), пирофосфат бромгидрина (BrHPP) и (E)-4-гидрокси-3-метилбут-2-енилпирофосфат (HMBPP)); цепь А основного комплекса гистосовместимости класса I (MICA); цепь В основного комплекса гистосовместимости класса I (MICB); лиганд NKG2D 1-6 (ULBP 1-6); CD1c; CD1d; эндотелиальный рецептор белка С (EPCR); липогексапептиды; фикорейтрин или гистидил-тРНК-синтазу.

Одним из преимуществ клетки настоящего изобретения является то, что она содержит CAR, состоящий из (i) антигенсвязывающего домена, способного связывать определенный антиген, и (ii) конкретного костимуляторного эндодомена. Как таковая, клетка настоящего изобретения более склонна к активации в окружающей среде, содержащей антиген, способный связываться с CAR, поскольку связывание антигена с CAR приводит к инициации сигнального пути через костимуляторный эндодомен и генерированию сигнала 2. Например, если антигенсвязывающий домен CAR специфичен к ТАА, клетка настоящего изобретения обладает повышенной склонностью к активации в опухолевой среде, где ТАА экспрессируется благодаря костимуляторному сигналу, генерируемому CAR.

Химерный антигенный рецептор.

Т-клетка настоящего изобретения экспрессирует химерный антигенный рецептор (CAR). Химерные антигенные рецепторы (CAR) представляют собой рекомбинантные рецепторы, посредством которых иммунной эффекторной клетке прививают произвольную специфичность. В случае классического CAR Т-клетке прививают специфичность моноклонального антитела. Нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR, можно трансфицировать в Т-клетки, с использованием, например, ретровирусных векторов. Таким образом можно получить большое число специфичных к раку Т-клеток, подходящих для адоптивного переноса. Результаты фазы I клинических исследований демонстрируют эффективность данного подхода.

Домен CAR, связывающий целевой антиген, обычно присоединяют к сигнальному эндодомену через спейсер и трансмембранный домен. Связывание CAR с целевым антигеном приводит к передаче активирующего сигнала Т-клетке, на которой он экспрессируется.

Существующие конструкции CAR содержат эндодомены, полученные из внутриклеточных участков либо γ -цепи Fc ϵ R1, либо CD3C. Следовательно, указанные рецепторы первого поколения передают иммунологический сигнал 1, который является достаточным для инициации уничтожения Т-клеткой клеток-мишеней, но не способен полностью активировать Т-клетку с достижением ее пролиферации и выживания. Для преодоления данной проблемы сконструируют сложные эндодомены: внутриклеточный домен Т-клеточной костимуляторной молекулы присоединяют к внутриклеточному домену CD3C с получением рецепторов второго поколения, которые после распознавания антигена могут одновременно передавать активирующий и костимуляторный сигналы. В качестве костимуляторного домена чаще всего используют домен CD28. Он генерирует наиболее мощный костимуляторный сигнал, а именно иммунологический сигнал 2, который иницирует пролиферацию Т-клеток. Также описано несколько рецепторов, которые содержат эндодомены семейства рецепторов TNF, таких как близкородственные OX40 и 41BB, которые передают сигналы выживания. В настоящее время описаны еще более эффективные CAR третьего поколения, которые содержат эндодомены, способные передавать сигналы активации, пролиферации и выживания.

$\gamma\delta$ Т-клетка настоящего изобретения содержит CAR, в состав которого входит костимуляторный сигнальный эндодомен, который после связывании целевого антигена передает сигнал $\gamma\delta$ Т-клетке.

CAR Т-клетки настоящего изобретения могут содержать сигнальный пептид, который при экспрессии CAR внутри клетки, такой как Т-клетка, обеспечивает направление образовавшегося белка в эндоплазматический ретикулум и затем на поверхность клетки, где он экспонируется. Ядро сигнального пептида может содержать длинный участок гидрофобных аминокислот, который имеет тенденцию образовывать одинарную альфа-спираль. Сигнальный пептид может начинаться с короткой положительно заряженной последовательности аминокислот, которая помогает обеспечить правильную топологию поли-

пептида во время транслокации. В конце сигнального пептида обычно находится последовательность аминокислот, которая распознается и расщепляется сигнальной пептидазой. Сигнальная пептидаза может осуществлять расщепление во время или после завершения транслокации с образованием свободного сигнального пептида и зрелого белка. Затем свободные сигнальные пептиды расщепляются специфическими протеазами.

Сигнальный пептид может находиться на аминоконце молекулы. Сигнальный пептид может содержать последовательность SEQ ID NO: 6, 7 или 8, или ее вариант, несущий 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотные мутации (вставки, замены или добавления), при условии, что сигнальный пептид сохраняет способность функционировать, обеспечивая экспрессию CAR на клеточной поверхности.

SEQ ID NO: 6: MGTSLLCWMALCLLGADHADG.

Сигнальный пептид SEQ ID NO: 6 является компактным и высокоэффективным. Предполагается, что он эффективно удаляется сигнальной пептидазой, которая обеспечивает 95% расщепления после концевого глицина.

SEQ ID NO: 7: MSLPVTAYPLAYHAARP.

Сигнальный пептид SEQ ID NO: 7 получают из IgG1.

SEQ ID NO: 8: MAVPTQVLGYLWLTDARC.

Сигнальный пептид SEQ ID NO: 8 получают из CD8.

Костимуляторный внутриклеточный сигнальный домен.

Внутриклеточный домен/эндодомен представляет собой сигнал-передающий фрагмент классического CAR.

$\gamma\delta$ Т-клетка настоящего изобретения содержит CAR, в состав которого входит костимуляторный сигнальный эндодомен, способный передавать сигнал 2 $\gamma\delta$ Т-клетке после связывания целевого антигена. Соответственно, $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего изобретения содержит CAR, который не передает сигнал 1 $\gamma\delta$ Т-клетке после связывания целевого антигена. Известно, что костимуляторные рецепторы Т-клеток индуцируют качественные и количественные изменения, которые снижают пороговые значения активации, предотвращают анергию Т-клеток и усиливают функцию Т-клеток. В данной области известен ряд корецепторов $\gamma\delta$ Т-клеток. Эффективная передача сигнала через один или более из указанных рецепторов может привести к полной активации $\gamma\delta$ Т-клеток и уничтожению клеток-мишеней.

$\gamma\delta$ Т-клетка настоящего изобретения содержит внутриклеточный сигнальный домен корецептора $\gamma\delta$ Т-клеток, который после связывания антигена с антигенсвязывающим доменом CAR обеспечивает генерирование продуктивного сигнала 2 в $\gamma\delta$ Т-клетке.

Внутриклеточный сигнальный домен может содержать, например, сигнальный домен DAP10, CD28, CD27, 41BB, OX40, CD30, IL2-R, IL7-R, IL21-R, NKp30, NKp44 или DNAM-1 (CD226).

Внутриклеточный сигнальный домен может содержать сигнальный домен DAP10.

DAP10 представляет собой сигнальную субъединицу, ассоциированную с рецептором NKG2D (см. фиг. 1). Он является эксклюзивным партнером по связыванию и промежуточным соединением в сигнальном пути NKG2D, кроме того, он содержит мотив активации YxxM, который запускает каскад липидкиназы.

Ниже показан пример аминокислотной последовательности сигнального домена DAP10:

SEQ ID NO: 3 - CARPRRSPAQEDGKVIINMPGRG

Другие примеры костимуляторных доменов показаны как SEQ ID NO: 9-19

SEQ ID NO: 9 (эндодомен CD28)
KRSRLHSDYMNTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY

SEQ ID NO: 10 (эндодомен CD27)
QRRKYRSNKGESPVPEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP

SEQ ID NO: 11 (эндодомен 41BB)
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL

SEQ ID NO: 12 (эндодомен OX40)
RRDQRLPPDAHKKPPGGGSRFTPIQEEQADAHSTLAKI

SEQ ID NO: 13 (эндодомен CD30)
HRRACRKRIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGASVTEPVAEERGLMSQ
PLMETCHSVGAAYLESPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKADTVIVGT
KAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPASASG
K

SEQ ID NO: 14 (эндодомен IL2-R)
TWQRRQRKSRRTI

SEQ ID NO: 15 (эндодомен IL7-R)
KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKPRKNLNVSNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGF
LQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDWITPESFGRDSSLTCLAGNVACDAPILSSSRSL
DCRESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPFSLQSGILTLNPVAQGPILTSLGNSQEEAYVTM
SSFYQNQ

SEQ ID NO: 16 (эндодомен IL21-R)
SLKTHPLWRLWKIWA VSPERFFMPLYKGCSDGFKWVGAPFTGSSLELGPWSPEVPS
TLEVYSCHPPRSPAKRLQLTELQEPALVESDGVKPSFWPTAQNSGGSAYSEERDRPYGLVSI
DTVTVLDAEGPCTWPCSCEDDGYPALDLDAGLEPSPGLEDPLLDAGTTVLSCGCVSAGSPGLGG
PLGSLLDRLKPLADGEDWAGGLPWGGRSPGGVSESEAGSPLAGLMDTFDGSFVGSDCSSPVE
CDFTSPGDEGPPRSYLRQWVIPPPLSSPGPQAS

SEQ ID NO: 17 (эндодомен NKp30)
GSTVYYQKCLTWKGPQRQLPAWPAFLPPPCGSSAHLPLPPVPGG

SEQ ID NO: 18 (эндодомен NKp44)
WWGDIWWTMMELRSLDTQKATCHLQQVTDLPWTSVSSPVEREILYHTVARTKISDDDD
ENTL

SEQ ID NO: 19 (эндодомен DNAM-1 (CD226))
NRRRRRERRLDFTESWDTQKAPNNYRSPISTSQPTNQSMDDTREDIYVNYPTFSRRPKT
RV.

Внутриклеточный сигнальный домен может содержать описанный здесь костимуляторный сигнальный домен, по существу, состоять из, или состоять из такого костимуляторного сигнального домена.

Внутриклеточный сигнальный домен может содержать последовательность, описанную как SEQ ID NO: 3 или 9-19, или ее вариант.

Вариант может содержать последовательность, по меньшей мере на 75% идентичную последовательности SEQ ID NO: 3 или 9-19, при условии, что указанная последовательность образует эффективный костимуляторный сигнальный домен.

Вариант может содержать последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности SEQ ID NO: 3 или 9-19, при условии, что указанная последовательность образует эффективный костимуляторный сигнальный домен.

Вариант может содержать последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 3 или 9-19, при условии, что указанная последовательность образует эффективный костимуляторный сигнальный домен.

Вариант может содержать последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 3 или 9-19, при условии, что указанная последовательность образует эффективный костимуляторный сигнальный домен.

Вариант может содержать последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 3 или 9-19, при условии, что указанная последовательность образует эффективный костимуляторный сигнальный домен.

Вариант может содержать последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 3 или 9-19, при условии, что указанная последовательность образует эффективный костимуляторный сигнальный домен.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать последовательность, описанную в SEQ ID NO: 3, или ее вариант, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 99% идентичный последовательности SEQ ID NO: 3, при условии, что указанная последовательность образует эффективный костимуляторный сигнальный домен.

В одном варианте осуществления эндодомен не содержит эндодомен CD3. Например, эндодомен не содержит эпсилон-цепь CD3, гамма-цепь CD3 и/или дельта-цепь CD3. В конкретном варианте осуществления эндодомен не содержит эндодомен CD3-дзета.

Пример эндодомена CD3-дзета описан в SEQ ID NO: 26.

SEQ ID NO: 26 (эндодомен CD3-дзета).

RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKPNPQEGLY-NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR.

Описанный здесь эндодомен CD3-дзета может содержать последовательность SEQ ID NO: 26, или состоять из последовательности SEQ ID NO: 26, или ее варианта, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичного последовательности SEQ ID NO: 26 и способного образовывать эффективный трансмембранный домен/внутриклеточный сигнальный домен Т-клеток.

Антигенсвязывающий домен.

Антигенсвязывающий домен представляет собой фрагмент CAR, который распознает антиген. В данной области известно множество антигенсвязывающих доменов, включающих в себя домены, в основе которых лежат антигенсвязывающие участки антител, миметиков антител и рецепторов Т-клеток. Например, антигенсвязывающий домен может содержать: одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), полученный из моноклонального антитела; природный лиганд целевого антигена; пептид, обладающий достаточным сродством к мишени; однодоменное антитело; искусственное отдельное связующее средство, такое как Dargrin (сконструированный белок с анкириновым повтором); или одноцепочечный фрагмент, полученный из Т-клеточного рецептора.

Антигенсвязывающий домен может содержать домен, в основе которого не лежит антигенсвязывающий участок антитела. Например, антигенсвязывающий домен может содержать домен белка/пептида, который является растворимым лигандом рецептора опухолевой клетки (например, растворимого пептида, такого как цитокин или хемокин); или внеклеточный домен заякоренного в мембране лиганда, или рецептора, чей партнер по связыванию экспрессируется на опухолевой клетке.

В качестве иллюстрации описанные здесь примеры относятся к CAR, которые связывают GD2 и CD33 соответственно.

Основой антигенсвязывающего домена может являться природный лиганд антигена. Антигенсвязывающий домен может содержать аффинный пептид из комбинаторной библиотеки или сконструированный de novo аффинный белок/пептид.

Опухоль-ассоциированный антиген (ТАА).

Антигенсвязывающий домен может связываться с опухоль-ассоциированным антигеном (ТАА).

В данной области известен широкий диапазон ТАА и CAR, используемый в настоящем изобретении, может содержать любой антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с любым ТАА.

Например, CAR, используемый в настоящем изобретении, может специфически связываться с ТАА, перечисленными в табл. 1.

Таблица 1

Антиген	Соответствующая опухоль
CD20	В-клеточные лимфомы, CLL
CD19	Пре-В ALL, В-клеточная лимфома, CLL
CD22	Пре-В ALL, В-клеточные лимфомы, CLL
CD30	Ходжкинская лимфома, ALCL
CD52	Т-клеточная AML, Пре-В ALL
CD70	Ходжкинская лимфома, DLCL, почечноклеточная карцинома, EBV+ глиобластома, недифференцированная носоглоточная саркома
CD33	AML, MDS, APL, CML, JMML, ALL (только 18%)
CD47	Пре-В ALL, Т клеточная ALL, AML
Рецептор IL7	Пре-В ALL, В-клеточные лимфомы
TSLPR	Пре-В ALL (7%), Пре-В aLL при синдроме Дауна (60%)
ROR1	Пре-В ALL, CLL мантийноклеточная лимфома

GD2	Нейробластома, остеосаркома, саркома Юинга, саркомы мягких тканей, меланома
IL13Ra2	Глиобластома, DIPG, меланома, различные карциномы, мезотелиома
VEGFR2	Сосудистая сеть опухоли
HER2	Остеосаркома, рак толстой кишки, рак молочной железы
ALK	Нейробластома, нейроэктодермальные опухоли, глиобластома, рабдомиосаркома, меланома
EGFRvIII	Глиома
FGFR4	Рабдомиосаркома
B7-H3	Нейробластома
Глипикан-3/глипикан-5	Опухоль Вильмса, нейробластома, рабдомиосаркома, карцинома печени, меланома
FOLR1	Рабдомиосаркома, остеосаркома

Проблема, связанная с использованием ТАА в качестве мишени в терапии рака, заключается в том, что ТАА может экспрессироваться на низком уровне в нормальных тканях. Например, GD2 представляет собой ТАА нейробластомы, однако он также экспрессируется на нервах; PSMA представляет собой ТАА рака простаты, но также обнаруживается на нормальных клетках почек, печени и толстой кишки, и на астроцитах мозга. Эта проблема более выражена в солидных опухолях, в которых наблюдается недостаток высокоселективных мишеней.

Экспрессия ТАА на нормальных здоровых клетках может приводить к "обусловленным мишенью внеопухолевым" побочным эффектам. Настоящее изобретение уменьшает эти эффекты, поскольку $\gamma\delta$ Т-клетка настоящего изобретения активируется только клетками, которые экспрессируют молекулы, являющиеся лигандами как $\gamma\delta$ TCR, так и CAR. Следовательно, нормальные здоровые клетки, которые экспрессируют ТАА на низких уровнях, не активируют $\gamma\delta$ Т-клетку настоящего изобретения, потому что они не экспрессируют антиген сигнала опасности, способный связываться с $\gamma\delta$ TCR (фиг. 2D). Антиген-связывающий домен CAR может связываться с GD2, CD33, CD19 или EGFR.

Дисиалоганглиозид (GD2, например, как показано pubchem: 6450346) представляет собой глико-финголипид, который содержит сиаловую кислоту и экспрессируется в основном на поверхности клетки. Функция этого углеводного антигена не совсем ясна; однако считается, что он играет важную роль в прикреплении опухолевых клеток к белкам внеклеточного матрикса. GD2 плотно, гомогенно и почти повсеместно экспрессируется на клетках нейробластомы. В нормальных тканях экспрессия GD2 в значительной степени ограничена меланоцитами кожи и периферическими боковыми волокнами миелиновых оболочек. В ЦНС GD2, по-видимому, экспрессируется как эмбриональный антиген, однако он также слабо обнаруживается в рассеянных олигодендроцитах и внутри заднего гипоталамуса.

Антигенсвязывающий домен может содержать последовательность, описанную в SEQ ID NO: 20, или ее вариант, при условии, что вариант сохраняет способность связываться с GD2.

SEQ ID NO: 20

METDTLLLVLLLVPGSTGQVQLQESGPGLVKPSQTLTITCTVSGFSLASYNHIVVRQ
PPGKGLEWLVGIWAGGSTNYNSALMSRLTISKDNSKNQVFLKMSSLTAADTAVYYCAKRSDDY
WFAWYWGQGLTIVTSSGGGGSGGGSGGGSENQMTQSPSSLSASVGDVDTMTCRASSVSSSYL
HWYQQKSGKAPKPVWISTSNLASGVPSRFSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCQYSGYPIT
FGQGTKVEIKRS

Антигенсвязывающий домен может содержать последовательность, описанную в SEQ ID NO: 20, или ее вариант, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 99% идентичный последовательности SEQ ID NO: 20, при условии, что вариант сохраняет способность связываться с GD2.

CD33 (который можно найти, например, под номером доступа Uniprot P20138) предположительно является молекулой адгезии клеток, полученных из миеломоноцитов, которые опосредуют зависимое от сиаловой кислоты связывание с клетками. Обычно он считается миелоид-специфичной молекулой, однако его также можно обнаружить на некоторых лимфоидных клетках. Антигенсвязывающий домен может содержать последовательность, описанную в SEQ ID NO: 21, или ее вариант, при условии, что вариант сохраняет способность связываться с GD2.

SEQ ID NO: 21

MAVPTQVLGLLLWLTDAQCIDMTQSPSSLSASVGDVDTITCRASEDIYFNLVWYQK
PGKAPKLLIYDTNRLADGVPSRFSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGTK
LEIKRSGGGSGGGSGGGSGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMHW
IRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQD
AYTGGYFDYWGQGLTIVTSSM

Антиген-связывающий домен может содержать последовательность, описанную в SEQ ID NO: 21,

или ее вариант, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 99% идентичный последовательности SEQ ID NO: 21, при условии, что вариант сохраняет способность связываться с GD2.

Человеческий антиген CD19 представляет собой трансмембранный гликопротеин размером 95 кД, принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулинов (например, как показано Uniprot P15391). CD19 экспрессируется на ранней стадии дифференциации В-клеток и утрачивается только на конечной стадии дифференциации В-клеток в плазматические клетки. Следовательно, CD19 экспрессируется на всех злокачественных В-клетках, кроме множественной миеломы. CD19 также экспрессируется в нормальном компартменте В-клеток.

EGFR (который можно найти, например, под номером доступа Uniprot P00533) представляет собой рецепторную тирозинкиназу, которая связывает лиганды семейства EGF и активирует несколько сигнальных каскадов, преобразующих внеклеточные сигналы в соответствующие клеточные ответы. Известные лиганды включают EGF, TGFA/TGF-альфа, амфирегулин, эпиген/EPGN, BTC/бетацеллюлин, эпирегулин/EREG и HBEGF/гепаринсвязывающий EGF. EGFR экспрессируется на высоких уровнях многими раковыми клетками. Однако он также экспрессируется нормальными здоровыми клетками.

Спейсерный домен.

CAR может содержать спейсерную последовательность, которая соединяет антигенсвязывающий домен с трансмембранным доменом и пространственно разделяет антигенсвязывающий домен и эндодом. Гибкий спейсер позволяет антигенсвязывающему домену располагаться в разных направлениях, что облегчает связывание.

Спейсерная последовательность может содержать, например, участок Fc IgG1, шарнирный участок IgG1, каркас человеческого CD8 или каркас мышинового CD8. Спейсер также может содержать альтернативную линкерную последовательность, которая имеет такую же длину и/или обеспечивает такое же расстояние между доменами, как и участок Fc IgG1, шарнирный участок IgG1 или каркас CD8. Спейсер, в основе которого лежит человеческий IgG1, может быть изменен путем удаления Fc-связывающих мотивов.

Примеры аминокислотных последовательностей указанных спейсеров приведены ниже:

SEQ ID NO: 22 (шарнир-CH₂CH₃ человеческого IgG1)

AEPKSPDKTHTCPFCAPPVAGPSVFLFPKPKDTLMIARTPEVTCWVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD

SEQ ID NO: 23 (каркас человеческого CD8)

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

SEQ ID NO: 24 (шарнир человеческого IgG1)

AEPKSPDKTHTCPFCPKDPK.

Спейсер может представлять собой вариант одной из последовательностей SEQ ID NO: 22-24, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95 или при не менее на 99% идентичный одной из последовательностей SEQ ID NO: 22-24, который способен поддерживать функциональную активность аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 9-11.

Трансмембранный домен.

Трансмембранный домен представляет собой последовательность CAR, которая пересекает мембрану.

Трансмембранный домен может представлять собой любую белковую структуру, которая является термодинамически стабильной в мембране. Обычно это альфа-спираль, состоящая из нескольких гидрофобных остатков. Трансмембранный домен любого трансмембранного белка можно использовать для получения трансмембранного фрагмента настоящего изобретения. Наличие и протяженность трансмембранного домена белка могут определить специалисты в данной области с использованием алгоритма ТМММ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>). Кроме того, поскольку трансмембранный домен белка представляет собой относительно простую структуру, т.е. полипептидную последовательность, способную образовать гидрофобную альфа-спираль, длина которой достаточна для того, чтобы пересечь мембрану, также можно использовать искусственно сконструированный ТМ домен (US 7052906 B1 описывает синтетические трансмембранные компоненты). Трансмембранный домен можно получить из любого трансмембранного белка типа I. Трансмембранный домен может представлять собой синтетическую последовательность, теоретически способную образовывать гидрофобную спираль.

Трансмембранный домен можно получить из CD28, причем такой домен обеспечивает высокую стабильность рецептора.

Трансмембранный домен может содержать последовательность, описанную в SEQ ID NO: 25.

SEQ ID NO: 25 (трансмембранный домен CD28).

FWVLVWGGVLACYSLLVTVAFIIFWV.

Нуклеиновая кислота.

Настоящее изобретение также относится к нуклеотидной последовательности, которая кодирует описанный здесь CAR.

Нуклеотидная последовательность может кодировать CAR, имеющую аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 4 (CAR aCD33-Fc-DAP10)

ATGGCCGTGCCCCACTCAGGTCTGGGGTTGTTGCTACTGTGGCTTACAGATGCCAGATG
TGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTCGGAGATCGCGTCACCATC
ACCTGTCGAGCAAGTGAGGACATTTATTTTAATTTAGTGTGGTATCAGCAGAAACAGGAAAGG
CCCTAAGCTCCTGATCTATGATACAAATCGCTTGGCAGATGGGGTCCCATCACGGTTCAGTGG
CTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCATAGTAGCCTGCAACCCGAAGATTTTCGCAACC
TATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGCTCACGTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAATCA
AAAGATCTGGTGGCGGAGGGTCAGGAGGCGGAGGCAGCGAGGCGGTGGCTCGGAGGCGGAGG
CTCGAGATCTGAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGCGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGTCCCTG
AGGCTCTCTGTGCAGCCTCAGGATTCAGTCTCAGTAATTATGGCATGCACTGGATCAGGCAGG
CTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTATCG
AGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAGCACCTCTACCTTCAA
ATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCACAGGACGCTTATACGG
GAGGTTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAACGCTGGTCACAGTCTCGTCTATGGATCCCGCCGA
GCCCAAATCTCTGACAAAATCACAATGCCACCGTCCCGAGCACCTCCCGTGGCGGCCCGG
TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCGCCGGACCCCTGAGGTCA
CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGG
CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG
GTCAGCGTCTCACCCTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCT
CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
ACCACAGGTGTACACCTTCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACC
TGCTGTGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGG
AGAACAATACAAAGACACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGCTCTCTCTCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG
GCCCTGCACAATCACTATACCCAGAAATCTCTGAGTCTGAGCCAGGCAAGAGGACCCCAAGT
TCTGGGTCTGGTGGTGGGAGGCGTGTGGCCTGTACTCTCTCTCTGAGCGTGGCCTT
CATCATCTTCT

SEQ ID NO: 5 (CAR aGD2-Fc-DAP10)

ATGGAGACCGACACCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCAGGCAGCACCCG
CCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGCTGGTGAAGCCAGCCAGACCTGAGCATCACC
TGACACCGTGAAGCGGCTTCAAGCTGGCCAGCTACAACATCCACTGGGTGCGGCAGCCCCAGGCA
AGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGCTGGCGGCAGCACCAACTACAACAGCGCCTGAT
GAGCCGGGTGACCATCAGCAAGGACAACAGCAAGAACCAGGTGTTCTGAAGATGAGCAGCTG
ACAGCCGCGGACACCGCGTGTACTACTGCGCCAAGCGGAGCGACGACTACAGCTGGTTCGCCT
ACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTC
TGGCGGAGGCGGAGCAGAGAACCATGACCCAGAGCCAGCAGCTTGAAGCGCAGCGTGGGC
GACCGGGTGACCATGACCTGCAGAGCCAGCAGCAGCGTGAGCAGCAGTACCTGCACTGGTACC
AGCAGAAGAGCGGCAAGGCCCAAGGTGTGGATCTACAGCACCAGCAACCTGGCCAGCGGCGT
GCCAGCGGTTACGCGGCAGCGGAGCGGACCGACTACACCTGACCATCAGAGCCTGCAG
CCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCGGCTACCCCATCACCTTCGGCCAGG
GCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGTGGATCCCGCCAGGCCAAATCTCTGACAAAATCACAC
ATGCCACCGTGGCCAGCACCTCCCGTGGCGGCGCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCC
AAGGACACCTCATGATCGCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGC
AAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGCGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCGTCTGCACAG
GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCG
AGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATC
CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGC
GACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAATACAAGACCACGCTCCCG
TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAATCACTATACCCAGAAA
TCTCTGAGTCTGAGCCAGGCAAGAGACCCCAAGTCTGGGTCTGGTGGTGGGAGGCGG
TGCTGGCCTGTACTCTCTCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGTGCGCCAGACC
ACGGCGGAGCCAGCCAGGAGGACGGCAAGGTGTACATCAACATGCCCGCGCGGCTGA

Нуклеотидная последовательность может кодировать такую же аминокислотную последовательность, как и SEQ ID NO: 1 или 2, но может иметь другую нуклеотидную последовательность вследствие вырожденности генетического кода. Нуклеотидная последовательность может быть по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, при условии, что она кодирует CAR, определенный в первом аспекте настоящего изобретения.

Вариант.

Сравнение последовательностей проводят визуально или, чаще всего, с помощью легко доступных программ сравнения последовательностей. С помощью таких общедоступных и коммерчески доступных компьютерных программ можно рассчитать идентичность двух или более последовательностей. Идентичность последовательностей можно рассчитать по непрерывным последовательностям, при этом одну последовательность выравнивают с другой последовательностью и каждую аминокислоту одной последовательности непосредственно сравнивают с соответствующей аминокислотой другой последовательности, каждый раз по одному остатку. Такой способ называют выравниванием "без использования пробелов". Как правило, такому выравниванию без использования пробелов подвергают только последовательности, содержащие относительно небольшое число остатков (например, менее 50 смежных аминокислот). Хотя это очень простой и надежный способ, он не позволяет учитывать, что, например, в паре последовательностей, в остальном идентичных, одна вставка или делеция приводит к вытеснению следующих аминокислотных остатков из выравнивания, что потенциально может привести к значительному уменьшению % гомологии при проведении глобального выравнивания. Следовательно, большую часть методов сравнения последовательностей разрабатывают так, чтобы достичь оптимального выравнивания, которое учитывает все возможные вставки и делеции, и не использовать лишние штрафы при определении общего балла гомологии. Этого достигают путем вставки "пробелов" при выравнивании последовательностей, чтобы попытаться максимизировать локальную гомологию.

Однако в этих более сложных методах вводят "штрафы" за каждый пробел, который возникает при выравнивании, так что при одинаковом числе идентичных аминокислот выравнивание последовательностей с минимально возможным числом пробелов, отражающим более высокое родство двух сравниваемых последовательностей, дает более высокий балл, чем выравнивание, проводимое с большим числом пробелов. Обычно используют "оценку аффинного пробела", в соответствии с которой за существование пробела назначают относительно высокую стоимость и меньший штраф за каждый последующий остаток в пробеле. Это наиболее часто используемая система подсчета баллов за пробелы. Высокие штрафы за пробелы, конечно, обуславливают оптимизированное выравнивание с меньшим числом пробелов. Большинство программ для выравнивания позволяют изменять штрафы за пробелы. Однако при использовании такого программного обеспечения для сравнения последовательностей предпочтительно использовать значения по умолчанию. Например, при использовании пакета GCG Wisconsin Bestfit (см. ниже) значение по умолчанию штрафа за пробел для аминокислотных последовательностей составляет -12 для пробела и -4 для каждого удлинения. Следовательно, для вычисления максимального % идентичности последовательностей вначале нужно осуществить оптимальное выравнивание с учетом штрафов за пробелы. Подходящей компьютерной программой для проведения такого выравнивания является пакет GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, U.S.A, Devereux et al., 1984, *Nucleic Acids Research* 12: 387). Примеры других программ, которые могут выполнять сравнение последовательностей, включают в себя, без ограничения, пакет BLAST (см. Ausubel et al., 1999 *ibid* Chapter 18), FASTA (Atschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.*, 403-410) и набор инструментов сравнения GENEWORKS. И BLAST, и FASTA позволяют проводить поиск как вне интернета, так и в интернете (см. Ausubel et al., 1999 *ibid*, pages 7-58 to 7-60). Однако предпочтительно использовать программу GCG Bestfit. Хотя можно измерить конечное значение идентичности последовательностей, сам процесс выравнивания обычно не основан на сравнении пар "все или ничего". Вместо этого, как правило, используют приведенную матрицу оценок подобия, с помощью которой присваивают оценки при каждом парном сравнении с учетом химического сходства или эволюционного расстояния. Широко используемым примером такой матрицы является матрица BLOSUM62, которая используется по умолчанию в пакете программ BLAST. Программы GCG Wisconsin обычно используют либо общедоступные значения по умолчанию, либо пользовательскую таблицу сравнения символов, если она поставляется (более подробную информацию можно найти в Руководстве пользователя). В пакете GCG предпочтительно используют общедоступные значения по умолчанию, тогда как в другом программном обеспечении используют матрицы по умолчанию, например BLOSUM62.

После того как программное обеспечение выполнит оптимальное выравнивание, можно рассчитать процент идентичности последовательностей. Программное обеспечение обычно делает это как часть сравнения последовательностей и генерирует числовой результат.

Термин "вариант" в соответствии с настоящим изобретением относится к аминокислотной последовательности, полученной из исходной последовательности путем замещения, изменения, модификации, замены, делеции или добавления одной аминокислоты (или более аминокислот), и сохраняющей, по существу, такую же активность, как и немодифицированная последовательность.

Консервативные замены можно осуществить, например, руководствуясь приведенной ниже таблицей. Аминокислоты, указанные в одном блоке второй колонки и, предпочтительно, в одной строке третьей колонки, можно заменять друг на друга:

Алифатические	Неполярные	G A P
		I L V
	Полярные незаряженные	C S T M
		N Q
	Полярные заряженные	D E
		K R
Ароматические		H F W Y

Специалисту в данной области известно, что многочисленные разные полинуклеотиды и нуклеиновые кислоты могут кодировать один и тот же полипептид в результате вырожденности генетического кода. Кроме того, следует понимать, что квалифицированные специалисты могут с помощью рутинных методов осуществить нуклеотидные замены, которые не влияют на последовательность полипептида, кодируемого описанными здесь полинуклеотидами, чтобы отобразить использование кодона конкретным организмом-хозяином, в котором должны экспрессироваться полипептиды.

Описанная здесь нуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность может содержать показанную здесь нуклеотидную последовательность или аминокислотную последовательность, или состоять из или, по существу, состоять из показанной здесь нуклеотидной последовательности или аминокислотной последовательности.

Вектор.

Настоящее изобретение также относится к вектору, который содержит нуклеотидную последовательность настоящего изобретения. Такой вектор можно использовать для введения нуклеотидной последовательности в клетку-хозяина, так чтобы она экспрессировалась и продуцировала молекулу по первому аспекту изобретения.

Вектор может представлять собой, например, плазмидный или вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор или лентивирусный вектор. Вектор может обладать способностью трансфицировать или трансдуцировать Т-клетку.

Вектор также может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую суицидальный ген, такой как iCasp9 или RQR8. Суицидальный ген отвечает за генетически кодируемый механизм, обеспечивающий избирательное уничтожение адоптивно перенесенных клеток, таких как Т-клетки, в условиях неприемлемой токсичности.

Активация каспазы 9 приводит к апоптозу клеток. После каспазы 9 механизм активации используется молекулой iCasp9. Все, что нужно для активации каспазы 9 - это преодоление энергетического барьера с последующей гомодимеризацией каспазы 9. Гомодимер подвергается конформационному изменению и протеолитический домен одного из пары димеров становится активным. Физиологически это происходит путем связывания домена CARD каспазы 9 с APAF-1. В iCasp9 домен APAF-1 заменяется на модифицированный FKBP12, содержащий мутацию, обеспечивающую избирательное связывание химического индуктора димеризации (CID). Присутствие CID приводит к гомодимеризации и активации. Основу iCasp9 составляет модифицированная человеческая каспаза 9, гибридная с белком, связывающим человеческий FK506 (FKBP) (Straathof et al (2005) Blood 105: 4247-4254). Это обеспечивает в определенных условиях димеризацию в присутствии небольшой молекулы CID, известной как AP1903. Экспрессия RQR8 делает Т-клетки восприимчивыми к антителу против CD20, ритуксимабу, но данная молекула является более компактной, чем полноразмерная молекула CD20 (Philip, B. et al. (2014) Blood doi: 10.1182/blood-2014-01-545020).

Фармацевтическая композиция.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей вектор или Т-клетку, экспрессирующие CAR настоящего изобретения, а также фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель и, необязательно, один или более других фармацевтически активных полипептидов и/или соединений. Такая композиция может находиться, например, в виде формы, подходящей для внутривенной инфузии.

Способ.

Настоящее изобретение также относится к способу получения клетки настоящего изобретения, который включает стадию введения в клетку нуклеотидной последовательности или вектора настоящего изобретения.

CAR-экспрессирующие клетки настоящего изобретения можно либо получить ex vivo, либо выделить из собственной периферической крови пациента (1 группа), либо в условиях трансплантации гематопоетических стволовых клеток из периферической крови донора (2 группа), либо из периферической крови независимого донора (3 группа). Альтернативно CAR-экспрессирующие Т-клетки можно получить путем ex-vivo дифференцировки индуцируемых клеток-предшественников или эмбриональных клеток-предшественников в Т-клетки. В этих случаях CAR-экспрессирующие Т-клетки получают путем введения ДНК или РНК, кодирующей CAR, с помощью одного из многих способов, такого как трансдукция посредством вирусного вектора, трансфекция ДНК или РНК.

Способ может дополнительно включать стимуляцию клетки средством, стимулирующим $\gamma\delta$ Т-

клетки. Используемый здесь термин "средство, стимулирующее $\gamma\delta$ Т-клетки" относится к любому средству, способному избирательно стимулировать пролиферацию и/или выживание $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующих в смешанной исходной популяции клеток. Таким образом, полученная популяция клеток обогащена $\gamma\delta$ Т-клетками, т.е. она содержит более высокое число $\gamma\delta$ Т-клеток, например конкретных $\gamma\delta$ Т-клеток, экспрессирующих конкретный рецептор $\gamma\delta$ TCR, чем исходная популяция клеток. Популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, полученные по способу настоящего изобретения, могут быть обогащены $\gamma\delta$ Т-клетками, например конкретными $\gamma\delta$ Т-клетками, экспрессирующими конкретный рецептор $\gamma\delta$ TCR. Т.е. популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, полученная по способу настоящего изобретения, содержит повышенное число $\gamma\delta$ Т-клеток. Например, популяция $\gamma\delta$ Т-клеток настоящего изобретения содержит более высокое число $\gamma\delta$ Т-клеток, экспрессирующих конкретный рецептор $\gamma\delta$ TCR, чем популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, присутствующая в образце, выделенном от индивидуума. Т.е. состав популяции $\gamma\delta$ Т-клеток отличается от состава "природной" популяции Т-клеток (т.е. популяции, которая не подвергалась описанным здесь стадиям экспансии) более высоким процентом или более высокой долей $\gamma\delta$ Т-клеток.

Популяция $\gamma\delta$ Т-клеток настоящего изобретения может содержать по меньшей мере примерно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% $\gamma\delta$ Т-клеток. Популяция $\gamma\delta$ Т-клеток настоящего изобретения может содержать по меньшей мере примерно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% $\gamma\delta$ Т-клеток, экспрессирующих конкретный рецептор $\gamma\delta$ TCR.

В качестве примера средство, стимулирующее $\gamma\delta$ Т-клетки, может представлять собой изопентенилпирофосфат (IPP); аналог IPP (например, бромгидринпирофосфат или (Е)-4-гидрокси-3-метилбут-2-енилпирофосфат); ингибитор фарнезилпирофосфатсинтазы (FPPS) или аминокислотобисфосфонат, такой как золедронат или памидронат.

Средство, стимулирующее $\gamma\delta$ Т-клетки, можно использовать в сочетании с общим Т-клеточным митогеном, например митогенным цитокином, таким как IL-2.

Другие способы стимуляции $\gamma\delta$ Т-клеток известны в данной области техники и включают в себя, например, применение конканавалина А (Siegers, G. M. et al., PLoS ONE 6, e16700 (2011)), антител против $\gamma\delta$ TCR, иммобилизованных на пластиковой основе; рекомбинантных искусственных антиген-презентирующих клеток в качестве слоя поддерживающих клеток и искусственных антиген-презентирующих клеток, покрытых антителом против $\gamma\delta$ TCR (Fisher, J. et al., Clin. Cancer Res. (2014)).

Способ лечения.

Способ лечения заболевания относится к терапевтическому использованию вектора или Т-клетки настоящего изобретения. В данном способе вектор или Т-клетку вводят индивидууму, имеющему заболевание или состояние, с целью уменьшения, облегчения или улучшения по меньшей мере одного симптома, связанного с заболеванием, и/или замедления, уменьшения или блокирования развития заболевания.

CAR-экспрессирующие клетки настоящего изобретения можно либо получить *ex vivo*, либо выделить из собственной периферической крови пациента (1 группа), либо в условиях трансплантации гематопоетических стволовых клеток из периферической крови донора (2 группа), либо из периферической крови независимого донора (3 группа). Альтернативно CAR-экспрессирующие Т-клетки можно получить путем *ex-vivo* дифференцировки индуцируемых клеток-предшественников или эмбриональных клеток-предшественников в Т-клетки. В этих случаях CAR-экспрессирующие Т-клетки получают путем введения ДНК или РНК, кодирующей CAR, с помощью одного из многих способов, такого как трансдукция посредством вирусного вектора, трансфекция ДНК или РНК.

В одном варианте осуществления образец, содержащий $\gamma\delta$ Т-клетку, можно предварительно выделить из организма индивидуума.

CAR-экспрессирующую Т-клетку настоящего изобретения можно получить с помощью описанного здесь способа. В частности, CAR-экспрессирующую Т-клетку, подходящую для применения в способе лечения заболевания, можно получить с помощью способа, включающего стадии трансдукции Т-клетки посредством вирусного вектора или трансфекции ДНК или РНК, кодирующей костимуляторный CAR, как описано в данном документе, и выращивания $\gamma\delta$ Т-клеток с использованием средства, стимулирующего $\gamma\delta$ Т-клетки.

В качестве средства, стимулирующего $\gamma\delta$ Т-клетки, можно использовать, например, изопентенилпирофосфат (IPP); аналог IPP (например, бромгидринпирофосфат или (Е)-4-гидрокси-3-метилбут-2-енилпирофосфат); ингибитор фарнезилпирофосфатсинтазы (FPPS) или аминокислотобисфосфонаты, такие как золедронат или памидронат.

Т-клетки, экспрессирующие молекулу CAR настоящего изобретения, можно использовать для лечения разных заболеваний, таких как, например, рак, микробная инфекция и вирусная инфекция. Рак может представлять собой, например, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак почек (почечноклеточный), рак легких, рак мозга, меланому, лейкемию, лимфому, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы или рак щитовидной железы. Способы примене-

ния в соответствии с настоящим изобретением можно осуществлять на практике в сочетании с другими композициями. Например, если подлежащее лечению заболевание представляет собой рак, композицию настоящего изобретения можно вводить в сочетании с другими способами лечения рака, такими как химиотерапия и/или лучевая терапия.

Композицию настоящего изобретения можно вводить в сочетании со средством, стимулирующим $\gamma\delta$ Т-клетки, таким как изопентенилпирофосфат (IPP); аналог IPP (например, бромгидринпирофосфат или (Е)-4-гидрокси-3-метилбут-2-енилпирофосфат); ингибитор фарнезилпирофосфатсинтазы (FPPS) или аминокислоты, такие как золедронат или памидронат.

В частности, золедронат и памидронат можно использоваться для размножения *in vivo* $\gamma\delta$ Т-клеток V52+ в сочетании с IL-2. Существует ряд клинических испытаний фазы I, в которых используется этот подход (см. Fisher et al.; OncoImmunology, 3; e27572).

Термин "в сочетании" может относиться к введению другого терапевтического средства или средства, стимулирующего $\gamma\delta$ Т-клетки до введения, одновременно с введением или после введения композиции настоящего изобретения. Далее изобретение описывается посредством Примеров, предназначенных для оказания содействия специалисту в данной области техники при осуществлении изобретения, но не для ограничения каким-либо образом объема изобретения.

Примеры

Пример 1. Получение $\gamma\delta$ Т-клеток, экспрессирующих костимуляторный CAR.

PBMC выделяют из крови здоровых доноров путем разделения в градиенте плотности фиколла. Затем их культивируют в среде RPMI 1640, дополнительно содержащей 10% FCS, 1% пенициллина/стрептомицина, 100 мкг/мл человеческого IL-2 и 5 мкМ золедроновой кислоты, в течение 5 дней.

Через 5 дней клетки трансдуцируют ретровирусом, содержащим конструкцию CAR, гибридованную с RQR8, который действует как маркерный ген, а также обеспечивает чувствительный к ритуксимабу (aCD20) суицидальный ген. Описанный здесь иллюстративный CAR содержит aGD2-специфичный scFv, линкер на основе Fc-фрагмента IgG1, трансмембранный домен, полученный из CD28, и эндодомен DAP10 (см. фиг. 10).

Второй иллюстративный CAR содержит CD33-специфичный scFv, линкер на основе Fc-фрагмента IgG1, трансмембранный домен, полученный из CD28, и эндодомен DAP10 (см. фиг. 11). Показана совместная экспрессия CAR анти-GD2-Fc-DAP10 и эндогенного TCR $\gamma\delta$ Т-клетки (фиг. 4).

Пример 2. Уничтожение клеточных линий GD2+ LAN1 и TC71 $\gamma\delta$ Т-клетками V52, трансдуцированными CAR aGD2-Fc-DAP10.

Известно, что обе клеточные линии LAN1 и TC71 экспрессируют GD2.

Значимое уничтожение клеточной линии нейробластомы GD2+ LAN1 наблюдается только при использовании в качестве эффекторов CAR-трансдуцированных клеток, но не при использовании нетрансдуцированных (NT) клеток V52 (фиг. 5A).

Наблюдается аддитивный эффект против клеточной линии саркомы Юинга GD2+ TC71 при использовании CAR aGD2-Fc-DAP10 в сочетании с обработкой золедроновой кислотой в течение 24 ч (фиг. 5B).

Добавление CAR к $\alpha\beta$ Т-клеткам, у которых отсутствует сигнал 1, генерируемый $\gamma\delta$ TCR в ответ на клеточный стресс, не влияет на цитотоксичность, в отличие от добавления CAR к $\gamma\delta$ Т-клеткам V52+ (фиг. 5C). Это указывает на то, что один сигнал CAR недостаточен для активации Т-клеток.

Экспрессия CAR aGD2-Fc-DAP10 в $\gamma\delta$ Т-клетках не приводит к GD2-специфическому уничтожению GD2-отрицательных клеток SK-N-SH (фиг. 6).

Пример 3. Сохранение экспрессии CAR после продолжительного совместного культивирования и GD2-специфического роста.

Через 24 дня после трансдукции начинают совместное культивирование и проводят серийные анализы клеток на присутствие CAR и TCRV52 в присутствии облученных клеток нейробластомы GD2+ (LAN1) и GD2- (SK-N-SH) (фиг. 7A). Рост трансдуцированных клеток V52+ aGD2-Fc-DAP10 наблюдается только в присутствии облученных клеток-мишеней GD2+ (фиг. 7B).

Пример 4. Специфическое уничтожение клеток AML CD33+, но не моноцитов CD33+, $\gamma\delta$ Т-клетками, экспрессирующими CAR анти-CD33-DAP10.

Эквивалентные уровни экспрессии CD33 наблюдаются в трех линиях AML и моноцитах (фиг. 8).

$\gamma\delta$ Т-клетки V52 трансдуцируют конструкцией CAR анти-CD33-Fc-DAP10, или анти-CD33-Fc-CD28-CD3z.

Конструкция CAR анти-CD33-Fc-CD28-CD3z обеспечивает сигнал 1 и сигнал 2 в присутствии CD33. Анти-CD33-Fc-DAP10 генерирует сигнал 2 в присутствии CD33.

Клетки, трансдуцированные CAR aCD33-CD28-CD3z, уничтожают все CD33-положительные клетки и не шадят здоровые моноциты. Клетки, трансдуцированные CAR aCD33-Fc-DAP10, не уничтожают моноциты (фиг. 9A). Наблюдается значительное увеличение уничтожения AML, но не увеличение уничтожения моноцитов под действием $\gamma\delta$ Т-клеток V52, трансдуцированных CAR aCD33-Fc-DAP10, по сравнению с нетрансдуцированными контролями (фиг. 9B).

Все публикации, упомянутые в вышеприведенном описании, включены в настоящий документ по-

средством ссылки. Специалисты в данной области смогут осуществить разные модификации и вариации описанных способов и систем настоящего изобретения, не отступая от объема и сущности изобретения. Хотя изобретение описано со ссылкой на конкретные предпочтительные варианты осуществления, следует понимать, что заявляемое изобретение не должно чрезмерно ограничиваться такими конкретными вариантами осуществления. И действительно, предполагается, что разные модификации описанных способов осуществления изобретения, очевидные для специалистов в области молекулярной биологии, клеточной иммунологии или в смежных областях техники, входят в объем приведенной ниже формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Т-клетка, которая экспрессирует Т-клеточный рецептор (TCR) гамма-дельта и химерный антигенный рецептор (CAR), где TCR используется для обеспечения сигнала 1 для активации гамма-дельта Т-клетки, а CAR используется для обеспечения костимуляторного сигнала 2, где указанный CAR содержит:

- (i) антигенсвязывающий домен;
- (ii) трансмембранный домен; и
- (iii) костимуляторный внутриклеточный сигнальный домен;

где, после связывания антигена с антигенсвязывающим доменом CAR, внутриклеточный сигнальный домен генерирует костимуляторный сигнал (т.е. сигнал 2) для гамма-дельта Т-клетки и не передает сигнал 1 указанной гамма-дельта Т-клетке при связывании антигена-мишени,

где TCR гамма-дельта и CAR расположены так, что TCR гамма-дельта обеспечивает сигнал 1, а CAR обеспечивает сигнал 2 при связывании с каждым рецептором, соответственно, где указанная гамма-дельта Т-клетка будет полностью активирована и способна убивать клетки-мишени, только когда она экспрессирует первый антиген, способный связываться с TCR гамма-дельта, и второй антиген, способный связываться с CAR; и

где внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен DAP10, CD30, IL2-R, IL7-R, IL21-R, NKp30, NKp44 или DNAM-1 (CD226).

2. Клетка по п.1, где антигенсвязывающий домен способен связываться с опухоль-ассоциированным антигеном (ТАА).

3. Клетка по п.1, где антигенсвязывающий домен способен связываться с GD2, CD33, CD19 или EGFR.

4. Клетка по любому из предшествующих пунктов, где трансмембранный домен содержит каркас CD8 или трансмембранный домен CD28.

5. Клетка по любому из пп.1-4, где внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен DAP10.

6. Клетка по любому из предшествующих пунктов, где CAR дополнительно содержит спейсерный домен между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, например каркас CD8 или участок Fc.

7. Клетка по любому из предшествующих пунктов, где гамма-дельта TCR способен связываться с фосфоантигеном; цепью А основного комплекса гистосовместимости класса I (MICA); цепью В основного комплекса гистосовместимости класса I (MICB); лигандом NKG2D 1-6 (ULBP 1-6); CD1c; CD1d; эндотелиальным рецептором белка С (EPCR); липогексапептидом; фикорейтрином или гистидил-тРНК-синтазой.

8. CAR для обеспечения костимуляторного сигнала 2 гамма-дельта Т-клетке при связывании антигена с антиген-распознающим доменом CAR, где сигнал 1 для активации гамма-дельта Т-клетки обеспечивается эндогенным TCR, где указанный CAR, по существу, состоит из или содержит:

- (i) антигенсвязывающий домен;
- (ii) трансмембранный домен; и
- (iii) внутриклеточный сигнальный домен;

где внутриклеточный сигнальный домен содержит костимуляторный внутриклеточный сигнальный домен, но не содержит эндодомен CD3, так что при использовании указанная гамма-дельта Т-клетка будет полностью активирована и способна убивать клетки-мишени, только когда она экспрессирует первый антиген, способный связываться с TCR гамма-дельта, и второй антиген, способный связываться с CAR, и

где костимуляторный внутриклеточный сигнальный домен выбран из сигнального домена DAP10, CD30, IL2-R, IL7-R, IL21-R, NKp30, NKp44 или DNAM-1 (CD226).

9. CAR для обеспечения костимуляторного сигнала 2 гамма-дельта Т-клетке при связывании антигена с антиген-распознающим доменом CAR, где сигнал 1 для активации гамма-дельта Т-клетки обеспечивается эндогенным TCR, где указанный CAR, по существу, содержит:

- (i) антигенсвязывающий домен;
- (ii) трансмембранный домен; и
- (iii) внутриклеточный сигнальный домен;

где внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен DAP10, но не содержит эндо-домен CD3, так что при использовании указанная гамма-дельта Т-клетка будет полностью активирована и способна убивать клетки-мишени, только когда она экспрессирует первый антиген, способный связываться с TCR гамма-дельта, и второй антиген, способный связываться с CAR.

10. Нуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, определенный в любом из предшествующих пунктов.

11. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность по п.10.

12. Вектор по п.11, который представляет собой ретровирусный вектор, лентивирусный вектор или транспозон.

13. Способ получения клетки по любому из пп.1-7, который включает стадию введения в клетку РВМС: нуклеотидной последовательности по п.10 или вектора по п.11 или 12.

14. Способ по п.13, где клетку стимулируют средством, стимулирующим гамма-дельта Т-клетки.

15. Способ по п.14, где средство, стимулирующее гамма-дельта Т-клетки, выбрано из изопентенил-пирофосфата (IPP); аналогов IPP; и ингибиторов фарнезилпирофосфатсинтазы (FPPS).

16. Способ по п.14 или 15, где клетку получают из образца, выделенного из организма индивидуума.

17. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики рака, содержащая клетку по любому из пп.1-7, CAR по п.8 или 9, нуклеотидную последовательность по п.10 или вектор по п.11 или 12.

18. Способ лечения рака, который включает стадию введения индивидууму фармацевтической композиции по п.17.

19. Способ по п.18, который включает стадию введения индивидууму средства, стимулирующего гамма-дельта Т-клетки.

20. Способ по п.19, где средство, стимулирующее гамма-дельта Т-клетки, выбрано из изопентенил-пирофосфата (IPP); аналогов IPP; и ингибиторов фарнезилпирофосфатсинтазы (FPPS).

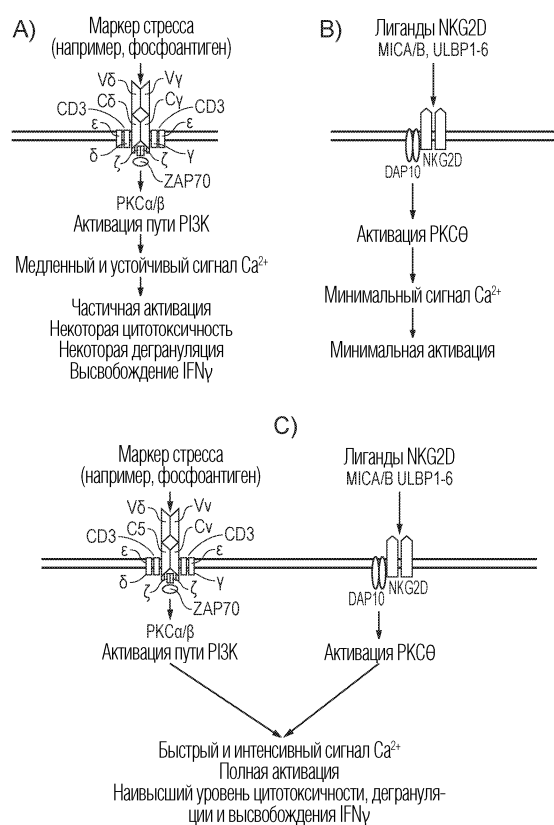
21. Способ по любому из пп.18-20, который включает следующие стадии:

(i) выделение из организма индивидуума образца, содержащего клетку;

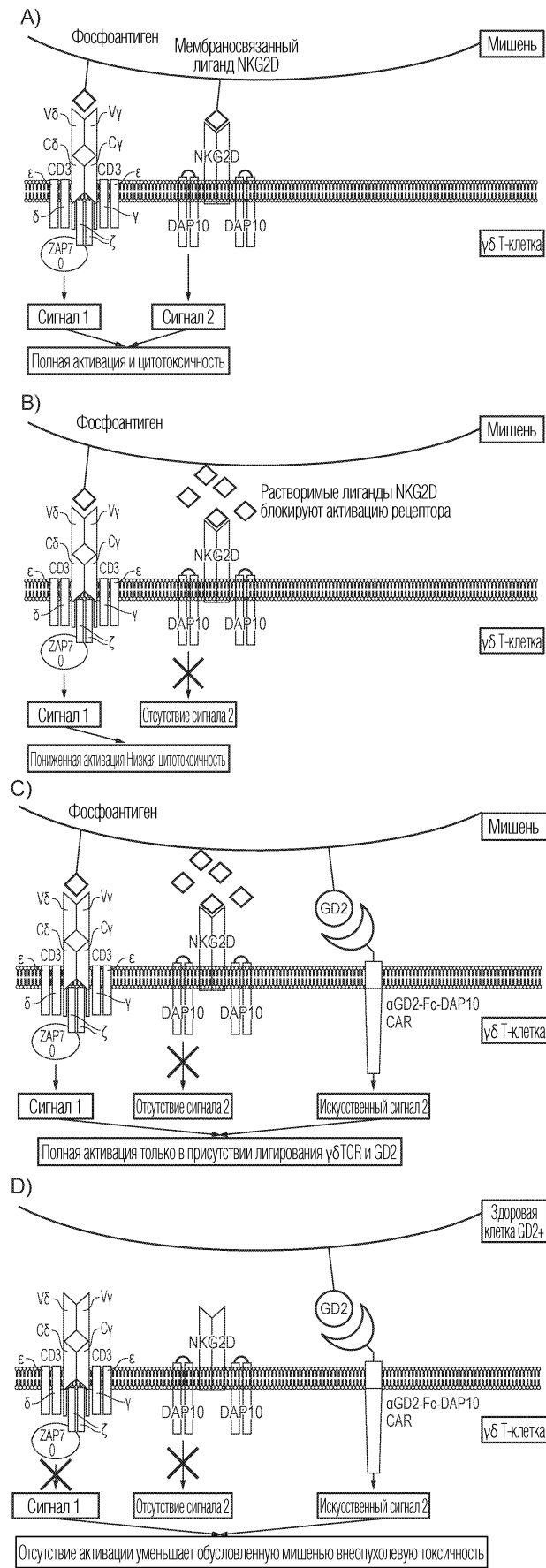
(ii) трансдукция или трансфекция клеток: нуклеиновой кислотой по п.10 или вектором по п.11 или 12; и

(iii) введение индивидууму клеток по стадии (ii).

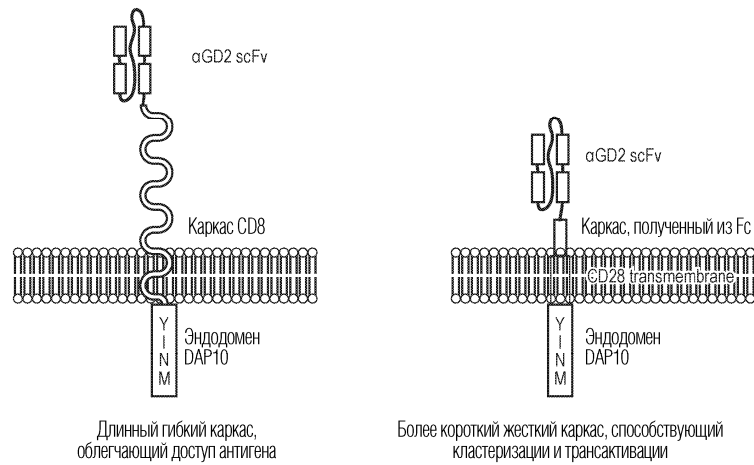
22. Применение клетки по любому из пп.1-7 в производстве лекарственного средства для лечения и/или профилактики рака.



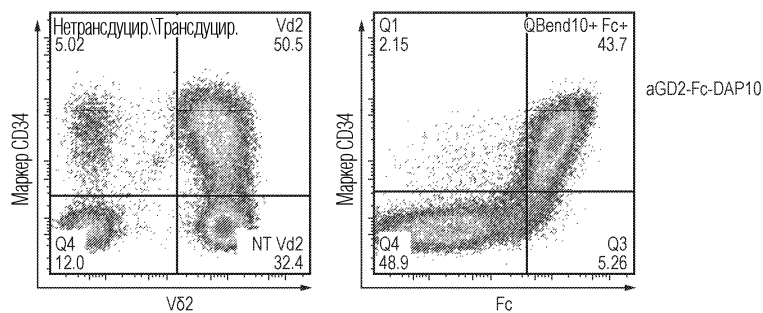
Фиг. 1



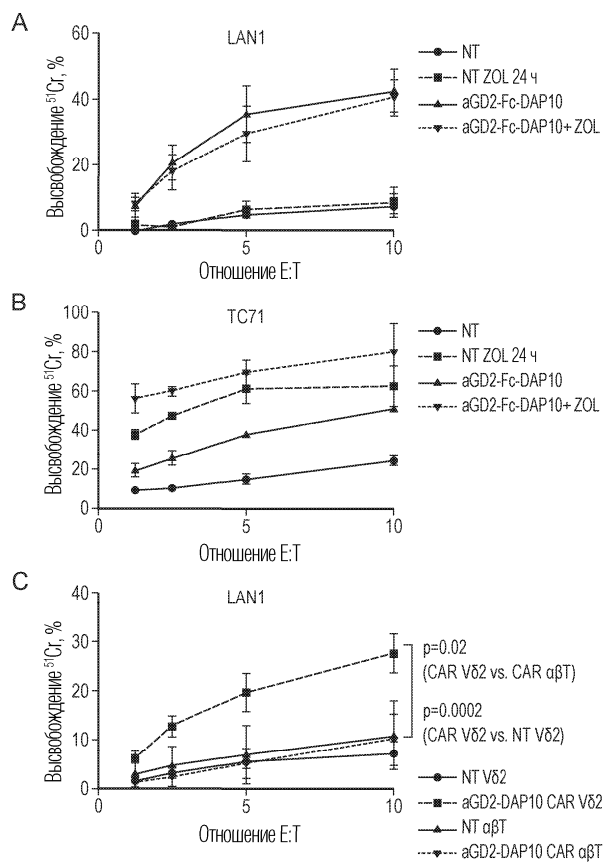
Фиг. 2



Фиг. 3

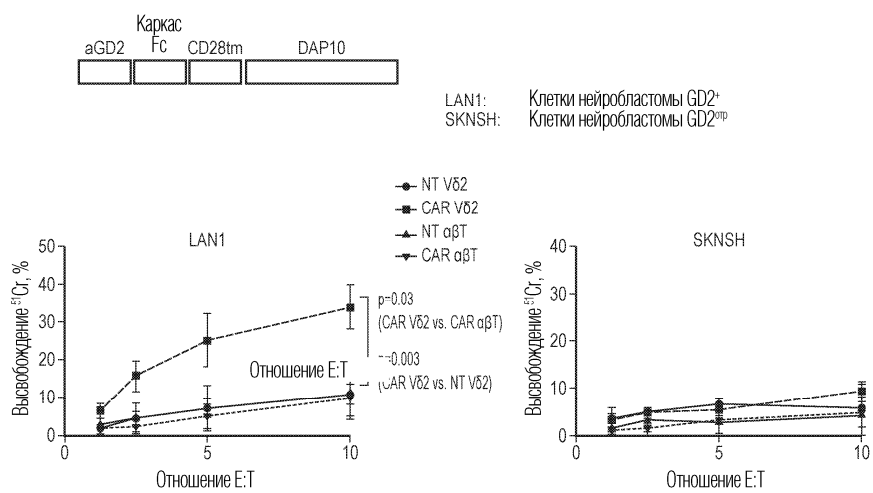


Фиг. 4

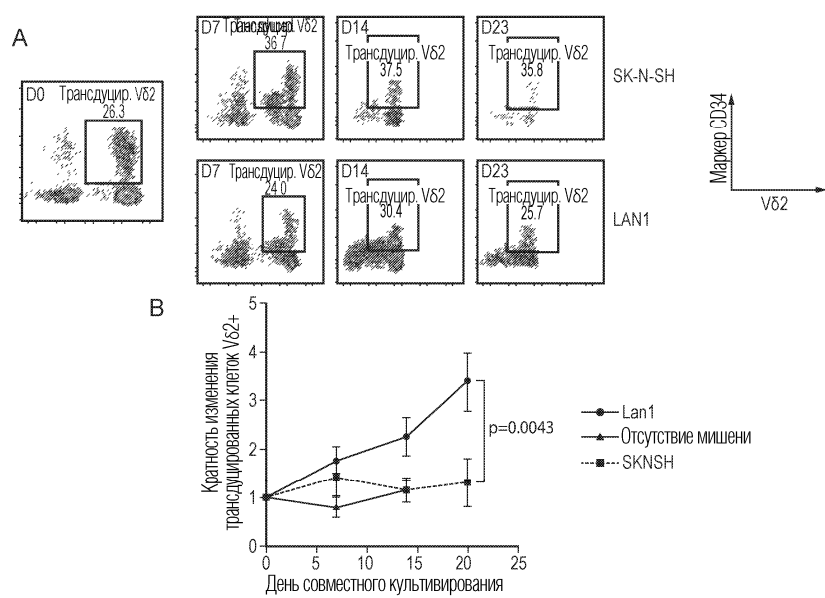


Плankи погрешностей обозначают SEM для n=3-6 независимых доноров

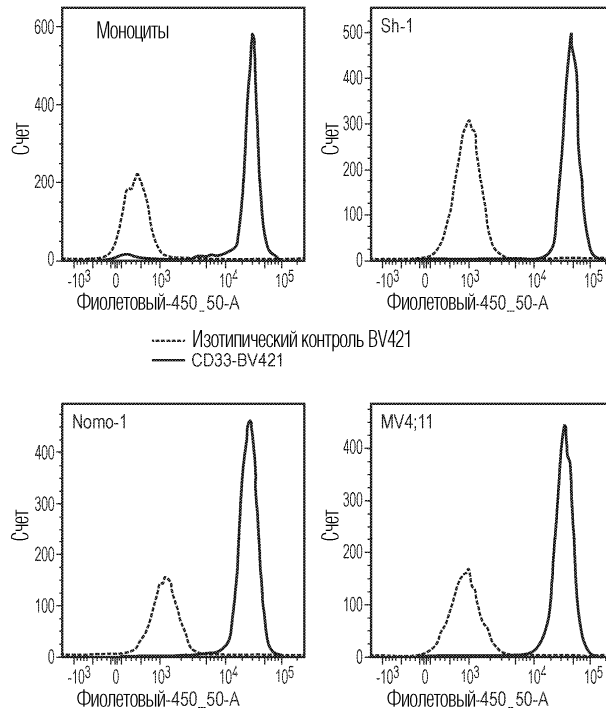
Фиг. 5



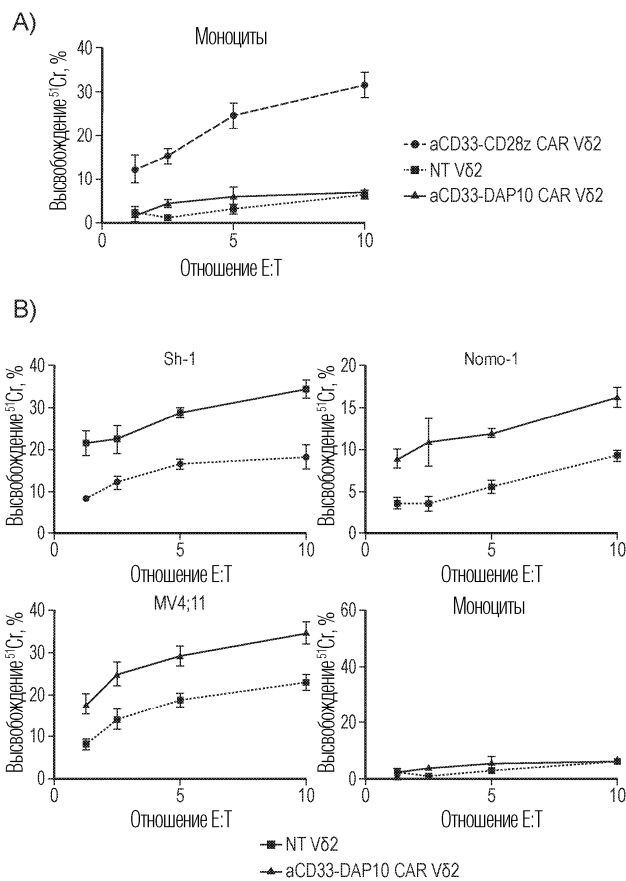
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

Нуклеотидная последовательность CAR aGD2-Fc-DAP10 (SEQ ID NO: 5)

```

ATGGAGACCCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCA
GGCAGCACCCGGCCAGGTGCAGCTGCAGAGTCTGGCCAGGCCTGGT
GAAGCCCAAGCCAGACCCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCTTCA
CCTGGCCAGCTACAACATCCACTGGGTGCGGCAGCCCCAGGCAAGGG
CCTGGAGTGGCTGGCCGTGATCTGGGCTGGCGGCAGCACCAACTACAA
CAGCGCCCTGATGAGCCGGCTGACCATCAGCAAGGACAACAGCAAGAA
CCAGGTGTTCTGAAGATGAGCAGCCTGACAGCCGCCGACACCGCCGT
GTACTACTGCCCAAGCGGAGCGACGACTACAGCTGGTTCCGCTACTG
GGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTG
GCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCAGCGAGAACAGATGACCCAG
AGCCCAAGCAGCTTGAGCGCCAGCGTGCGGCGACCGGTGACCATGACC
TGACAGGCGCAGCAGCGTGAGCAGCAGCTACCTGCACTGGTACCCAG
CAGAAGAGCGGCAAGGCCCAAGGTGTGGATCTACAGCACCAAGCAAC
CTGGCCAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCAC
CGACTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCAC
CTACTACTGCCAGCAGTACAGCGGCTACCCATCACCTTCGGCCAGGGC
ACCAAGGTGGAGATCAAGCGGTCTGATCCCGCCGAGGCCAAATCTCCT
GACAAAATCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTCCCGTGGCCGGC
CCGTGAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCCAAGGACACCCCTCATGATCG
CCCGGACCCCTGAGGTCACTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG
ACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
TGCCAAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCAGCTACCGTGT
GGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
GTACAAGTGCAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCGCCATCGAGAAA
ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGTGACACG
CTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACC
TGGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGCAACCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGA
GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTATGCTCCGTGATGATGAGG
CCCTGCACAATCACTATACCCAGAAATCTTGAGTCTGAGCCAGGCCAA
GAAGGACCCCAAGTCTGGGTCTGGTGGTGGTGGGAGGCGTGTGGC
CTGTTACTCTCTCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTCTGGGTGTGC
GCCAGACCACGGCGGAGCCAGCCAGGAGGACGGCAAGGTGTACAT
CAACATGCCCGGCCGCGGCTGA

```

Аминокислотная последовательность CAR aGD2-Fc-DAP10 (SEQ ID NO: 2)

```

METDTLLWLLWWPGSTGQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLAS
YNIHWVRQPPGKGLEVLGVIWAGGSTNYNSALMSRLTISKDNSKNQVFLKM
SSLTAADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGG
GSENMQTQSPSSLSASVGDRTMTCRASSSVSSYLHWYQOKSGKAPKV
WIYSTNLASGVPSRFSGSGSDTYLTISLQPEDFATYYCQOYSGYPITF
GQGTKEIKRSDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIA
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
MLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVLV
VGGVLACYSLLVTVAFIIFWFCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG

```

Пояснение

scFV против GD2?
 Спейсер CH2CH3, содержащий мутацию PPVA, предотвращающую связывание с Fcγ1
 Трансмембранный домен CD28
 Эндодомен DAP10

Фиг. 10

Нуклеотидная последовательность CAR aCD33-Fc-DAP10 (SEQ ID NO: 4)

```

ATGGCCGTGCCAC TCAGGTCTGGGGTTGTTGCTACTGTGGC TTACAG
ATGCCAGATGTGACATCCAGATGACACAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCA
TCTGTCCGAGATCGCGTCACCATCACCTGTCCAGCAAGTGAGGACATTT
ATTTAATTTAGTGTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGGCCCTAAGCTC
CTGATCTATGATACAAATCGCTTGGCAGATGGGGTCCCATCACGGTTCA
GTGGCTCTGGATCTGGCACACAGTATACTCTAACCATAAGTAGCCTGCA
ACCCGAAGATTTCGAACCTATTATTGTCAACACTATAAGAATTATCCGCT
CACGTTCCGTGAGGGACCAAGCTGGAATCAAAGATCTGGTGGCGG
AGGGTCAGGAGGCGGAGGCAGCGGAGGCGGTGGCTCGGGAGGCGGA
GGCTCGAGATCTGAGGTGCACTTGGTGGAGTCTGGGGGCGGCTTGGTG
CAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCTGTGCAGCCTCAGGATTCACCT
TCAGTAATTATGGCATGCACTGGATCAGGCAGGCTCCAGGGAAGGCTCT
GGAGTGGGTCTCGTCTATTAGTCTTAATGGTGGTAGCACTTACTATCGAG
ACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGGGACAATGCAAAAAGCAC
CCTCTACCTTCAAATGAATAGTCTGAGGGCCGAGGACACGGCCGTCTAT
TACTGTGCAGCACAGGACGCTTATACGGGAGGTTACTTTGATTACTGGG
GCCAAGGAACGCTGGTCACAGTCTCGTCTATGATCCCGCCGAGCCCA
AATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTCCCGT
GGCCGGCCCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCTG
ATGATCGCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CAGCAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGCGGTGGAG
GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCAGC
TACCGTGTGGTCAGGCTCCTACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGATACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCAT
CGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCCACAGGT
GTACACCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTACCAAGAACCAGGTCAG
CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCG
GTGCTGGACTCCGACGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG
ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGC
ATGAGGCCCTGCACAATCACTATACCCAGAAATCTCTGAGTCTGAGCCC
AGGCAAGAAGGACCCCAAGTTCTGGGTCTGGTGGTGGTGGGAGGCGT
GCTGGCCTGTTACTCTCTCTGTTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGG
GTGTGCCGACAGCACGCGGAGCCAGCCAGGAGGACGGCAAGGT
GTACATCAACATGCCCGGCCGCGGCTGA

```

Аминокислотная последовательность CAR aCD33-Fc-DAP10 (SEQ ID NO: 1)

```

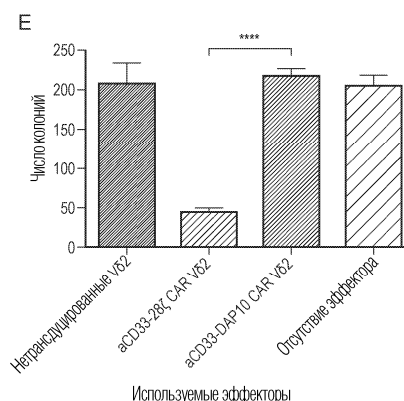
MAVPTQVLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYFN
LVVYQQKPGKAPKLLIYDNRADGVPSRFSGSGSTQYTLTISSLQPEDFA
IYYCQHYKNYPLTFGQGTLEIKRSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSRSEV
QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKLEWVSSIS
LNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMSLRADTAIVYCAAQDAYT
GGYFDYWGGTLVTVSSMDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPP
KPKDTLMIAITPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDVLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
MTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD
PKFVWLTVVGGVLACYSLLVTVAIFIFWMCARPRRSPAQEDGKVYINMPGR
G

```

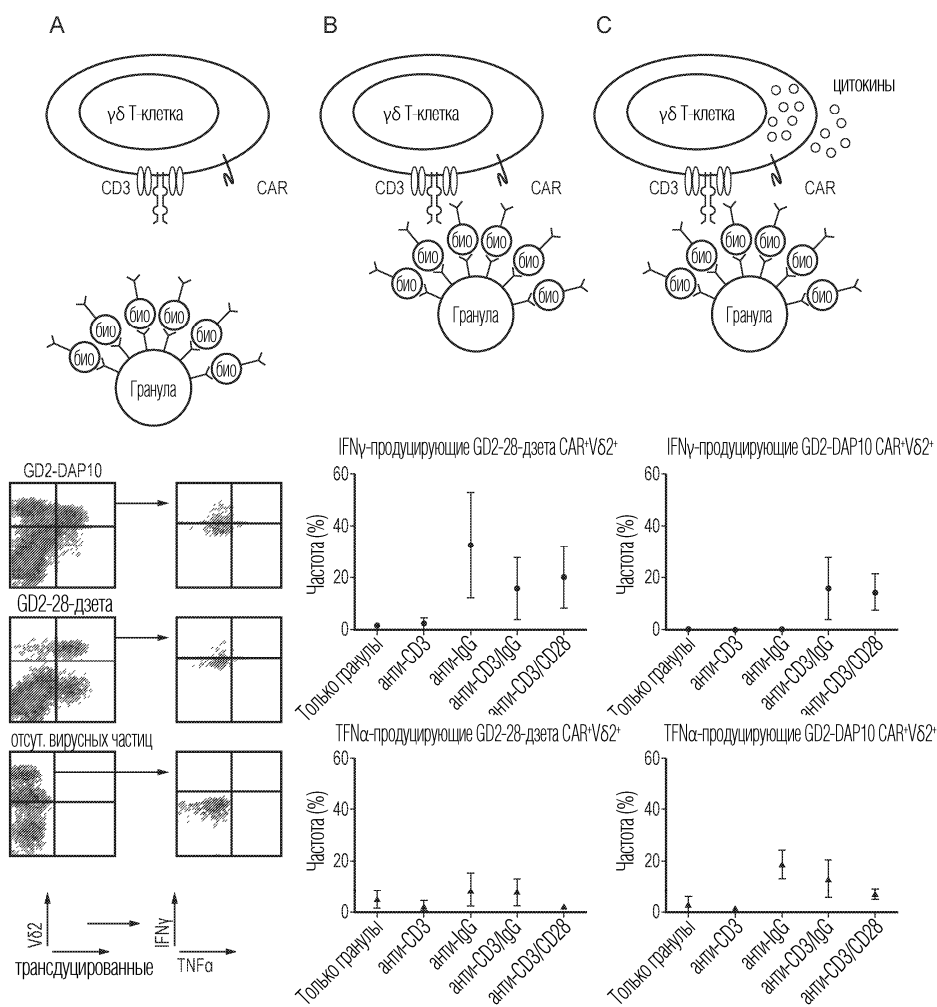
Пояснение

scFV против CD33;
 Спейсер CH2CH3, содержащий мутацию PPVA, предотвращающую связывание с Fcγ2;
 Трансмембранный домен CD28;
 Эндодомен DAP10

Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2