

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042661**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.09

(21) Номер заявки
202091488

(22) Дата подачи заявки
2018.12.19

(51) Int. Cl. **C12N 15/09** (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

**(54) ИММУНОКОМПЕТЕНТНАЯ КЛЕТКА, КОТОРАЯ ЭКСПРЕССИРУЕТ МОЛЕКУЛУ
КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ, СПЕЦИФИЧЕСКИ РАСПОЗНАЮЩУЮ
ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ МЕЗОТЕЛИН, IL-7 И CCL19**

(31) **2017-247109**

(32) **2017.12.24**

(33) **JP**

(43) **2020.09.23**

(86) **PCT/JP2018/046888**

(87) **WO 2019/124468 2019.06.27**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**НОЙЛ-ИММЬОН БАЙОТЕК, ИНК.
(JP)**

(72) Изобретатель:
**Тамада Кодзи, Сакода Юкими, Адати
Кейси (JP)**

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

(56) **WO-A1-2016056228**
WO-A2-2013063419
WO-A1-2008143684
JP-A-2011504372
WO-A1-2017159736

**MORELLO, A. et al., "Mesothelin-targeted
CARs: driving T cells to solid tumors", Cancer
Discov., 2016, vol. 6, № 2, p. 133-146 (figures, tables)**
**ADACHI, K. et al., "IL-7 and CCL19
expression in CAR-T cells improves immune cell
infiltration and CAR-T cell survival in the tumor",
Nat. Biotechnol., April 2018, vol. 36, № 4, p. 346-351
(figures)**

(57) Целью изобретения является получение иммунокомпетентной клетки, специфичной к мезотелину. Изобретение предлагает иммунокомпетентную клетку, которая экспрессирует молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, интерлейкин 7 (IL-7) и лиганд 19 хемокина (мотив C-C) (CCL19). Предпочтительно, если молекула клеточной поверхности, специфически распознающая человеческий мезотелин, представляет собой химерный рецептор антигена (CAR), содержащий одноцепочечное антитело, трансмембранный участок и сигнальный участок, который индуцирует активацию иммунокомпетентной клетки; а вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи соединяются через пептидный линкер, последовательность которого содержит от 2 до 30 аминокислот.

B1**042661****042661****B1**

Область техники изобретения

Настоящее изобретение относится к иммунокомпетентной клетке, которая экспрессирует молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, интерлейкин 7 (IL-7) и лиганд 19 хемокина (мотив C-C) (CCL19), к фармацевтической композиции, содержащей иммунокомпетентную клетку, вектору экспрессии, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую мезотелин, нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19, а также к способу получения иммунокомпетентной клетки, которая экспрессирует молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, IL-7 и CCL19, включающему в себя введение в иммунокомпетентную клетку нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, нуклеиновой кислоты, кодирующей IL-7, и нуклеиновой кислоты, кодирующей CCL19.

Уровень техники изобретения

Злокачественные опухоли - это заболевания, которые поражают многих людей в мире; для их лечения, как правило, широко используют химиотерапию, радиотерапию или хирургическое лечение. Тем не менее существуют разные проблемы, такие как наличие побочных реакций, потеря некоторых функций, а также рецидивирование или метастазирование, которое не поддается лечению. Соответственно в последние годы проводится разработка иммунно-клеточной терапии с целью поддержания более высокого качества жизни (КЖ) пациентов. Указанная иммунно-клеточная терапия представляет собой терапевтический способ, который включает в себя сбор иммунокомпетентных клеток у пациента, проведение процедур для усиления иммунных функций иммунокомпетентных клеток, амплификацию клеток и возвращение этих клеток пациенту. А именно известен терапевтический способ, включающий в себя сбор Т-клеток у пациента, введение в Т-клетки нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный рецептор антигена (далее также называемый "CAR"), и возвращение Т-клеток обратно пациенту (см. непатентный документ 1). Указанный терапевтический способ в настоящее время проходит клинические испытания во всем мире, результаты которых свидетельствуют об эффективности, например, при злокачественных опухолях кроветворных органов, таких как лейкомия или лимфома.

Между тем авторы настоящего изобретения предлагают терапию с использованием иммунных клеток, обеспечивающую заметное подавление солидного рака путем совместной экспрессии IL-7 и CCL19 (см. патентные документы 1 и 2). Этот способ позволяет усиливать активацию эндогенных иммунокомпетентных клеток или их способность накапливаться на опухолевых клетках.

Известно, что мезотелин экспрессируется в клетках рака, такого как мезотелиома, колоректальный рак (рак прямой кишки и рак толстой кишки), рак поджелудочной железы, рак яичника, рак легких, рак молочной железы или рак головы и шеи. Описаны клетки CAR-T, специфичные к мезотелину (см. патентные документы 3 и 4).

Документы предшествующего уровня техники.

Патентные документы.

Патентный документ 1: международная публикация № WO 2016/056228.

Патентный документ 2: международная публикация № WO 2017/159736.

Патентный документ 3: заявка на патент США, публикация № 2014/0301993.

Патентный документ 4: не прошедшая экспертизу патентная заявка Японии, публикация № 2017-518053.

Непатентные документы.

Непатентный документ 1: Yozo Nakazawa, The Shinshu, Medical Journal, 61 (4): 197-203 (2013).

Сущность изобретения

Цель изобретения.

Разработку способов, которые могут быть адаптированы для лечения солидного рака, при котором обычная иммунная клеточная терапия не дает достаточных терапевтических эффектов, осуществляют путем разработки терапии на основе иммунокомпетентных клеток с использованием CAR-экспрессирующих Т-клеток, TCR-экспрессирующих Т-клеток и т.п., которые совместно экспрессируют IL-7 и CCL19, как описано выше, с заметным улучшением способности иммунокомпетентных клеток размножаться, способности иммунокомпетентных клеток выживать или способности иммунокомпетентных клеток хозяина накапливаться. С другой стороны, разработка CAR-экспрессирующих иммунокомпетентных клеток, специфичных к мезотелину, экспрессируемых на высоком уровне в раковых клетках (например, в клетках мезотелиомы и рака поджелудочной железы), еще не дала удовлетворительных клинических результатов из-за недостаточного локального накопления иммунокомпетентных клеток на раковой опухоли и риска рецидивирования опухоли, связанного с кратковременным проявлением противоопухолевых эффектов и т.д. Соответственно целью настоящего изобретения является создание новой иммунокомпетентной клетки, специфичной к мезотелину.

Средства достижения цели.

Авторы настоящего изобретения изучили дополнительные возможности собственных ранее разработанных Т-клеток, которые экспрессируют CAR, IL-7 и CCL19. В результате авторы настоящего изобретения завершили настоящее изобретение, обнаружив, что CAR, содержащий одноцепочечное анти-

ло, специфически связывающееся с человеческим мезотелином и содержащее определенную аминокислотную последовательность, специфически распознающую человеческий мезотелин, в качестве молекулы клеточной поверхности, может селективно проявлять цитотоксическую активность против раковых клеток, экспрессирующих мезотелин, и подавлять снижение выживаемости, вызванное опухолью, образованной раковыми клетками, экспрессирующими мезотелин.

А именно настоящее изобретение включает в себя следующие пункты.

1. Имунокомпетентная клетка, которая экспрессирует молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, интерлейкин 7 (IL-7) и лиганд 19 хемокина (C-C мотив) (CCL19).

2. Имунокомпетентная клетка по п.1, где имунокомпетентная клетка представляет собой имунокомпетентную клетку, выделенную из живого организма.

3. Имунокомпетентная клетка по п.1 или 2, где имунокомпетентная клетка содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7, и экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19.

4. Имунокомпетентная клетка по п.3, где экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая IL-7, и экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая CCL19, представляют собой экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую человеческий IL-7, и экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую человеческий CCL19.

5. Имунокомпетентная клетка по п.3 или 4, где экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая IL-7, и экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая CCL19, интегрированы в геном.

6. Имунокомпетентная клетка по любому из пп.1-5, где молекула клеточной поверхности, специфически распознающая человеческий мезотелин, представляет собой химерный рецептор антигена (CAR), содержащий одноцепочечное антитело, трансмембранный участок и сигнальный участок, который индуцирует активацию имунокомпетентной клетки.

7. Имунокомпетентная клетка по п.6, где одноцепочечное антитело, входящее в состав CAR, представляет собой одно из следующих одноцепочечных антител:

(1-1) одноцепочечное антитело, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 14, и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 15, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит CDR1 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 16, CDR2 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 17, и CDR3 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 18;

(2-1) одноцепочечное антитело, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 14, и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 15, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит CDR1 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 19, CDR2 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 17, и CDR3 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 18; и

(3-1) одноцепочечное антитело, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 20, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 21, и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 22, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит CDR1 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 23, CDR2 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 24, и CDR3 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 25.

8. Имунокомпетентная клетка по п.6 или 7, где одноцепочечное антитело, входящее в состав CAR, представляет собой одно из следующих одноцепочечных антител:

(1-2) одноцепочечное антитело, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, который состоит из аминокислотной последовательности, на 85% или более идентичной аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 1, и вариабельный участок легкой цепи, который состоит из аминокислотной последовательности, на 85% или более идентичной аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 2;

(2-2) одноцепочечное антитело, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, который состоит из аминокислотной последовательности, на 85% или более идентичной аминокислотной последователь-

легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 2;

(5-4) одноцепочечное антитело, последовательно содержащее переменный участок легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 2, пептидный линкер, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 27, и переменный участок тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 1;

(6-4) одноцепочечное антитело, последовательно содержащее переменный участок тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 5, пептидный линкер, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 26, и переменный участок легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 6;

(7-4) одноцепочечное антитело, последовательно содержащее переменный участок легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 6, пептидный линкер, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 26, и переменный участок тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 5;

(8-4) одноцепочечное антитело, последовательно содержащее переменный участок тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 5, пептидный линкер, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 27, и переменный участок легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 6; и

(9-4) одноцепочечное антитело, последовательно содержащее переменный участок легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 6, пептидный линкер, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 27, и переменный участок тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 5.

15. Иммунокомпетентная клетка по любому из пп.6-14, где сигнальный участок CAR, который индуцирует активацию иммунокомпетентной клетки, содержит полипептид внутриклеточного участка CD28, полипептид внутриклеточного участка 4-1BB, и полипептид внутриклеточного участка CD3ζ.

16. Иммунокомпетентная клетка по любому из пп.1-15, где иммунокомпетентная клетка представляет собой Т-клетку.

17. Иммунокомпетентная клетка по любому из пп.1-16, где иммунокомпетентную клетку получают из организма человека, или иммунокомпетентная клетка представляет собой Т-клетку, выделенную из организма человека.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая иммунокомпетентную клетку по любому из пп.1-17 и фармацевтически приемлемую добавку.

19. Фармацевтическая композиция по п.18 для применения в способе лечения рака.

20. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19.

21. Способ получения иммунокомпетентной клетки, которая экспрессирует молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, IL-7 и CCL19, включающий в себя введение в иммунокомпетентную клетку нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19.

Эффект изобретения.

Иммунокомпетентная клетка по настоящему изобретению обладает цитотоксической активностью в отношении раковых клеток, экспрессирующих человеческий мезотелин, и способна подавлять образование опухолей, экспрессирующих человеческий мезотелин. Кроме того, иммунокомпетентная клетка по настоящему изобретению подавляет рецидивирование раковых клеток.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 приведена диаграмма, показывающая структуру (а) и аминокислотные последовательности (b) 9 типов scFv против человеческого мезотелина, полученных в примере 1.

На фиг. 2 приведена диаграмма, показывающая результаты определения экспрессии CAR в Т-клетках против человеческого мезотелина, экспрессирующих CAR-IL-7/CCL19, как описано в примере 2. На фиг. 2(a) показаны результаты для Т-клеток, не экспрессирующих CAR, IL-7 и CCL19 (неинфицированных), а на фиг. 2(b-d) показаны результаты для Т-клеток против человеческого мезотелина, экспрессирующих CAR-IL-7/CCL19, содержащих соответственно VH07(15)VL07 (сигнальный пептид Т), VH07(15)VL07 (сигнальный пептид Р) и VH36(15)VL36 в качестве участка scFv.

На фиг. 3 приведена диаграмма, показывающая результаты определения экспрессии CAR в Т-клетках против человеческого мезотелина, экспрессирующих CAR-IL-7/CCL19, как описано в примере 2. На фиг. 3(a) показаны результаты для Т-клеток, не экспрессирующих CAR, IL-7 и CCL19 (неинфицированных), а на фиг. 3(b-e) показаны результаты для Т-клеток против человеческого мезотелина, экспрессирующих CAR-IL-7/CCL19, содержащих соответственно VH07(15)VL07, VL07(15)VH07, VH07(25)VL07 и VL07(25)VH07 в качестве участка scFv.

На фиг. 4 приведена диаграмма, подтверждающая уровень экспрессии мезотелина в линиях опухолевых клеток по результатам, полученным с помощью проточного цитометра, как описано в примере 3.

На фиг. 5 приведена иллюстративная диаграмма, демонстрирующая результаты тестирования совместного культивирования Т-клеток против человеческого мезотелина, экспрессирующих CAR-IL-7/CCL19, и линии мезотелин-положительных опухолевых клеток или линии мезотелин-отрицательных опухолевых клеток, как описано в примере 4.

На фиг. 6А приведена диаграмма, демонстрирующая результаты измерения выживания опухолевых клеток ACC-MESO-1 методом проточной цитометрии, как описано в примере 4.

На фиг. 6В приведена диаграмма, демонстрирующая результаты измерения выживания опухолевых клеток NCI-H2052 методом проточной цитометрии, как описано в примере 4.

На фиг. 6С приведена диаграмма, демонстрирующая результаты измерения выживания опухолевых клеток A498 методом проточной цитометрии, как описано в примере 4.

На фиг. 7А приведена диаграмма, демонстрирующая результаты измерения продукции IFN- γ после совместного культивирования Т-клеток против человеческого мезотелина, экспрессирующих CAR-IL-7/CCL19, и мезотелин-положительных опухолевых клеток ACC-MESO-1, как описано в примере 4.

На фиг. 7В приведена диаграмма, демонстрирующая результаты измерения продукции IFN- γ после совместного культивирования Т-клеток против человеческого мезотелина, экспрессирующих CAR-IL-7/CCL19, и мезотелин-положительных опухолевых клеток NCI-H2052, как описано в примере 4.

На фиг. 7С приведена диаграмма, демонстрирующая результаты измерения продукции IFN- γ после совместного культивирования Т-клеток против человеческого мезотелина, экспрессирующих CAR-IL-7/CCL19, и мезотелин-отрицательных опухолевых клеток A498, как описано в примере 4.

На фиг. 8 приведена диаграмма, демонстрирующая результаты измерения выживания лейкоцитов (числа лейкоцитов) или опухолевых клеток PAN02 методом проточной цитометрии, как описано в примере 5.

На фиг. 9 приведена диаграмма, демонстрирующая результаты измерения продукции IFN- γ после совместного культивирования Т-клеток против мезотелина, экспрессирующих CAR-IL-7/CCL19, и опухолевых клеток PAN02, как описано в примере 5.

На фиг. 10 приведена диаграмма, демонстрирующая результаты измерения уровня выживаемости после введения Т-клеток против мезотелина, экспрессирующих CAR-мышинный IL-7/мышинный CCL19, мышинной модели опухоли, как описано в примере 6.

На фиг. 11 приведена диаграмма, демонстрирующая результаты измерения объема опухоли после введения Т-клеток против мезотелина, экспрессирующих CAR-мышинный IL-7/мышинный CCL19, мышинной модели опухоли, как описано в примере 6.

На фиг. 12А приведена диаграмма, демонстрирующая результаты фотографирования мышей на 1, 3, 7, 10, 14, 21, 31 и 38 дни с временем выдержки экспозиции 30 с, как описано в примере 7, причем день, когда вводят ACC-MESO-1-GFP-Luc, определяют как день 1.

На фиг. 12В приведена диаграмма, демонстрирующая результаты фотографирования мышей на 45, 59, 73, 87, 101, 115, 129 и 143 дни с временем выдержки экспозиции 30 с, как описано в примере 7, причем день, когда вводят ACC-MESO-1-GFP-Luc, определяют как день 1. Фотографию второго индивидуума слева, полученную на 129 день, опускают по причине смерти индивидуума.

На фиг. 13 приведен график, демонстрирующий зависимость выживаемости мышей от числа дней после введения, как описано в примере 7.

На фиг. 14 приведен график, демонстрирующий зависимость общего количества флуоресценции от числа дней после введения, как описано в примере 7.

Способ осуществления изобретения

Иммунокомпетентная клетка по настоящему изобретению может представлять собой любую иммунокомпетентную клетку, которая экспрессирует молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, IL-7 и CCL19; предпочтительно она представляет собой иммунокомпетентную клетку, содержащую экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу клеточной поверхности, экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7, и экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19. Указанная иммунокомпетентная клетка способна подавлять рост опухоли, образованной раковыми клетками, экспрессирующими человеческий мезотелин.

Человеческий мезотелин.

Человеческий мезотелин, белок размером 40 кДа, крайне редко экспрессируется в нормальных клетках, но интенсивно экспрессируется в раковых клетках (например, в клетках мезотелиомы и клетках рака поджелудочной железы). Информацию о последовательности человеческого мезотелина можно соответственно получить путем поиска в публично известном документе или в публично известной базе данных, такой как NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>). Примеры информации по аминокислотной последовательности человеческого мезотелина могут включать последовательность с номером доступа в GenBank NP_037536.2, AAV87530.1 и ее изоформы.

Молекула клеточной поверхности.

Примеры молекулы клеточной поверхности, специфически распознающей человеческий мезотелин, могут включать в себя молекулу или фактор, которые после экспрессии на клеточной поверхности спо-

способны специфически распознавать человеческий мезотелин, такие как CAR, специфически распознающий человеческий мезотелин, Т-клеточный рецептор (TCR), специфически распознающий пептид, полученный из человеческого мезотелина, и белок или нуклеиновую кислоту, способные специфически связываться с человеческим мезотелином. CAR представляет собой искусственный химерный белок, содержащий одноцепочечное антитело (scFv), распознающее клеточный поверхностный антиген на раковых клетках, гибридное с сигнальным участком, индуцирующим активацию Т-клеток.

Молекула клеточной поверхности предпочтительно локализована на поверхности иммунокомпетентной клетки при посредстве сигнального пептида (лидерной последовательности). Примеры сигнального пептида могут включать полипептиды, состоящие из тяжелой цепи иммуноглобулина, легкой цепи иммуноглобулина, CD8, α - и β -цепей Т-клеточного рецептора, CD3 ζ , CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, и полученного из GITR сигнального пептида (лидерной последовательности). Его конкретные примеры могут включать полипептид, который состоит из аминокислотной последовательности, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более, идентичной аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 11 или 12, и обладает активностью, эквивалентной активности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11 или 12, а также полипептид, который состоит из аминокислотной последовательности, полученной из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 11 или 12, путем делеции, замены, вставки и/или добавления одной или нескольких аминокислот, и обладает активностью, эквивалентной активности аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 11 или 12. Сигнальный пептид удаляется из зрелого белка после завершения локализации.

В настоящем описании термин "аминокислотная последовательность, полученная путем делеции, замены, вставки и/или добавления одного или нескольких аминокислотных остатков" охватывает аминокислотную последовательность, содержащую делеции, замены, вставки и/или добавления аминокислотных остатков, число которых, например, находится в диапазоне от 1 до 30 остатков, предпочтительно в диапазоне от 1 до 20 остатков, более предпочтительно в диапазоне от 1 до 15 остатков, еще более предпочтительно в диапазоне от 1 до 10 остатков, более предпочтительно в диапазоне от 1 до 5 остатков, более предпочтительно в диапазоне от 1 до 3 остатков, более предпочтительно в диапазоне от 1 до 2 остатков. Указанные изменения в аминокислотном составе можно осуществлять с помощью любого метода, известного специалистам в данной области, такого как химический синтез, генно-инженерный метод или мутагенез.

В настоящем описании термин "идентичность" относится к степени подобия полипептидных или полинуклеотидных последовательностей (которую определяют путем соответственного сравнения искомой последовательности и другой последовательности (нуклеотидной или белковой последовательности), предпочтительно последовательности такого же типа). Предпочтительные примеры компьютерных программ для расчета и определения "идентичности" могут включать GCG BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215: 403-410; Altschul et al., Nucleic Acids Res., 1997, 25: 3389-3402; and Devereux et al., Nucleic. Acids Res., 1984, 12:387), BLASTN 2.0 (Gish W., <http://blast.Wustl.edu>, 1996-2002), FASTA (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1988, 85: 2444-2448) и GCGGelMerge, которые определяют пары контигов с перекрытием максимальной длины (Wilbur and Lipman, SIAM, J. Appl. Math., 1984, 44: 557-567; и Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol., 1970, 48: 443-453).

Одноцепочечное антитело, специфически распознающее человеческий мезотелин.

Если молекула клеточной поверхности представляет собой CAR, одноцепочечное антитело (scFv), специфически распознающее человеческий мезотелин, предпочтительно входит в его состав в качестве молекулы, специфически распознающей человеческий мезотелин. В одноцепочечном антителе, специфически распознающем человеческий мезотелин, переменный участок тяжелой цепи (VH) и переменный участок легкой цепи (VL) антитела, специфически распознающего человеческий мезотелин, могут соединяться через пептидный линкер, соединяющий переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи. Примеры сочетаний переменного участка тяжелой цепи и переменного участка легкой цепи в составе одноцепочечного антитела, специфически распознающего человеческий мезотелин, могут включать приведенные ниже сочетания. Переменный участок легкой цепи может располагаться выше (на стороне N-конца) или ниже (на стороне C-конца) переменного участка тяжелой цепи.

(1-1) Сочетание переменного участка тяжелой цепи, содержащего CDR (участок, определяющий комплементарность) 1 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 14, и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 15, и переменного участка легкой цепи, содержащего CDR1 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 16, CDR2 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 17, и CDR3 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 18;

(2-1) сочетание переменного участка тяжелой цепи, содержащего CDR1 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 14, и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 15, и переменного участка легкой цепи, содержащего CDR1 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 19, CDR2 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 17, и CDR3 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 18; и

(3-1) сочетание переменного участка тяжелой цепи, содержащего CDR1 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 20, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 21, и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 22, и переменного участка легкой цепи, содержащего CDR1 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 23, CDR2 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 24, и CDR3 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 25.

Кроме того, CDR переменного участка тяжелой цепи и переменного участка легкой цепи, специфически распознающие человеческий мезотелин, идентифицируют в соответствии с системой нумерации IMGT, Kabat, Chothia, North или Contact и др. на основе аминокислотных последовательностей переменного участка тяжелой цепи и переменного участка легкой цепи публично известного антитела, специфически распознающего человеческий мезотелин, описанного, например, в нижеследующих документах (патент США № 8357783 и публикации не прошедшей экспертизу патентной заявки Японии (перевод заявки PCT) № 2017-518053). Примеры сочетаний также могут включать сочетание переменного участка тяжелой цепи и переменного участка легкой цепи, содержащих такие CDR. CDR можно идентифицировать на веб-сайте AbodyBuilder (<http://opig.stats.ox.ac.uk/webapps/sabdab-sabpred/Modelling.php>).

Примеры сочетания переменного участка тяжелой цепи и переменного участка легкой цепи в составе одноцепочечного антитела специфически распознающего человеческий мезотелин, также могут включать следующие сочетания:

(1-2) сочетание переменного участка тяжелой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичной аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 1, и переменного участка легкой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичной аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 2;

(2-2) сочетание переменного участка тяжелой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичной аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 3, и переменного участка легкой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичной аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 4;

(3-2) сочетание переменного участка тяжелой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичной аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 5, и переменного участка легкой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичной аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 6;

(4-2) сочетание переменного участка тяжелой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичной аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 1, и переменного участка легкой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичной аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 4; и

(5-2) сочетание переменного участка тяжелой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичной аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 3, и переменного участка легкой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичной аминокислотной последовательности,

сти, описанной в SEQ ID NO: 2.

Кроме того, сочетание может представлять собой сочетание переменного участка тяжелой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичной последовательности переменного участка тяжелой цепи публично известного антитела, специфически распознающего человеческий мезотелин, описанного, например, в нижеследующих документах (патент США № 8357783 и публикация не прошедшей экспертизу патентной заявки Японии (перевод заявки РСТ) № 2017-518053), и переменного участка легкой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичной последовательности переменного участка легкой цепи публично известного антитела, специфически распознающего человеческий мезотелин.

Другие примеры сочетания переменного участка тяжелой цепи и переменного участка легкой цепи в составе одноцепочечного антитела, специфически распознающего человеческий мезотелин, также могут включать следующие сочетания:

(1-3) сочетание переменного участка тяжелой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 1, и переменного участка легкой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 2;

(2-3) сочетание переменного участка тяжелой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 3, и переменного участка легкой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 4;

(3-3) сочетание переменного участка тяжелой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 5, и переменного участка легкой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 6;

(4-3) сочетание переменного участка тяжелой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 1, и переменного участка легкой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 4; и

(5-3) сочетание переменного участка тяжелой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 3, и переменного участка легкой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 2.

Кроме того, сочетание может представлять собой сочетание переменного участка тяжелой цепи и переменного участка легкой цепи публично известного антитела, специфически распознающего человеческий мезотелин, описанного, например, в нижеследующих документах (патент США № 8357783 и публикация не прошедшей экспертизу патентной заявки Японии (перевод заявки РСТ) № 2017-518053).

Пептидный линкер.

Переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи соединяются через пептидный линкер. Длина пептидного линкера составляет от 2 до 30, предпочтительно от 15 до 25, более предпочтительно 15 или 25. Конкретно его предпочтительные примеры могут включать полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, которая на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентична аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 26 или 27, содержащей непрерывную последовательность глицин-серин, и обладает активностью, эквивалентной активности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26 или 27, а также полипептид, который состоит из аминокислотной последовательности, полученной из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 26 или 27, путем делеции, замены, вставки и/или добавления одной или нескольких аминокислот, и обладает активностью, эквивалентной активности аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 26 или 27.

Примеры сочетания переменного участка тяжелой цепи, переменного участка легкой цепи и пептидного линкера в составе одноцепочечного антитела, специфически распознающего человеческий мезотелин, могут также включать приведенные ниже сочетания. Термин "последовательно", описанный ниже, обозначает порядок расположения от N-концевой стороны.

(1-4) Сочетание, последовательно содержащее переменный участок тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 1, пептидный линкер, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 26, и переменный участок легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 2;

(2-4) сочетание, последовательно содержащее переменный участок тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 3, пептидный линкер, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 26, и переменный участок легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 4;

(3-4) сочетание, последовательно содержащее переменный участок легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 2, пептидный линкер, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 26, и переменный участок тяжелой цепи,

состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 1;

(4-4) сочетание, последовательно содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 1, пептидный линкер, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 27, и вариабельный участок легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 2;

(5-4) сочетание, последовательно содержащее вариабельный участок легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 2, пептидный линкер, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 27, и вариабельный участок тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 1;

(6-4) сочетание, последовательно содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 5, пептидный линкер, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 26, и вариабельный участок легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 6;

(7-4) сочетание, последовательно содержащее вариабельный участок легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 6, пептидный линкер, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 26, и вариабельный участок тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 5;

(8-4) сочетание, последовательно содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 5, пептидный линкер, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 27, и вариабельный участок легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 6; и

(9-4) сочетание, последовательно содержащее вариабельный участок легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 6, пептидный линкер, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 27, и вариабельный участок тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 5.

IL-7 и CCL19.

IL-7 представляет собой цитокин, необходимый для выживания Т-клеток, который продуцируется негемопозитическими клетками, такими как стромальные клетки костного мозга, тимуса или лимфоидного органа или лимфоидной ткани. С другой стороны, Т-клетки сами по себе редко способны продуцировать IL-7.

CCL19 в основном продуцируется дендритными клетками или макрофагами лимфатических узлов и выполняет функцию, которая заключается в инициации миграции Т-клеток, В-клеток или зрелых дендритных клеток через рецептор CCR7.

Организм, из которого получают IL-7 или CCL19 особо не ограничивается и предпочтительно представляет собой организм человека. Аминокислотные последовательности указанных белков можно найти в публично известной базе данных последовательностей, такой как GenBank. Примеры аминокислотной последовательности человеческого IL-7 могут включать последовательность, зарегистрированную в GenBank под номером доступа NM_000880.3 (SEQ ID NO: 28) и ее изоформы. Примеры аминокислотной последовательности человеческого CCL19 могут включать последовательность, зарегистрированную в GenBank под номером доступа NM_006274.2 (SEQ ID NO: 29) и ее изоформы. Хотя IL-7 и CCL19 могут содержать сигнальный пептид, в зрелых белках он отсутствует. Например, в аминокислотной последовательности человеческого IL-7, описанной в SEQ ID NO: 28, последовательность, занимающая положения 1-25, соответствует сигнальному пептиду. Например, в аминокислотной последовательности человеческого CCL19, описанной в SEQ ID NO: 29, последовательность, занимающая положения 1-21, соответствует сигнальному пептиду.

IL-7 или CCL19 может представлять собой вариант природного белка, как описано выше. Примеры варианта IL-7 могут включать полипептид, который состоит из аминокислотной последовательности, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичной аминокислотной последовательности человеческого IL-7, описанной в SEQ ID NO: 28, и обладает способностью увеличивать скорость пролиферации клеток или степень выживания клеток под действием IL-7, и полипептид, который состоит из аминокислотной последовательности, полученной из аминокислотной последовательности человеческого IL-7, описанной в SEQ ID NO: 28, путем делеции, замены, вставки и/или добавления одной или нескольких аминокислот, и обладает способностью увеличивать скорость пролиферации клеток или степень выживания клеток под действием IL-7. Примеры вариантов человеческого CCL19 могут включать полипептид, который состоит из аминокислотной последовательности, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичной аминокислотной последовательности человеческого CCL19, описанной в SEQ ID NO: 29, и обладает способностью стимулировать миграцию клеток, как и CCL19, а также полипептид, который состоит из аминокислотной последовательности, полученной из аминокислотной последовательности человеческого CCL19, описанной в SEQ ID NO: 29, путем делеции, замены, вставки и/или добавления одной или нескольких аминокислот, и обладает способностью стимулировать миграцию клеток, как и CCL19.

Другой фактор, регулирующий иммунную функцию.

Иммунокомпетентная клетка по настоящему изобретению может также экспрессировать другой фактор, регулирующий иммунную функцию, такой как IL-15, CCL21, IL-2, IL-4, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IP-10, интерферон- γ , MIP-1-альфа, GM-CSF, M-CSF, TGF-бета или TNF-альфа. Другой фактор, регулирующий иммунную функцию, предпочтительно представляет собой фактор, регулирующий иммунную функцию, отличный от IL-12.

Трансмембранный участок.

Примеры трансмембранного участка по настоящему изобретению могут включать полипептиды трансмембранных участков CD8, α - и β -цепей Т-клеточного рецептора, CD3 ζ , CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154 и GITR. Предпочтительные примеры трансмембранного участка могут включать полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичную аминокислотной последовательности трансмембранного участка человеческого CD8, описанной в SEQ ID NO: 7, и обладает активностью, эквивалентной активности аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 7, а также полипептид, который состоит из аминокислотной последовательности, полученной из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 7, путем делеции, замены, вставки и/или добавления одной или нескольких аминокислот, и обладает активностью, эквивалентной активности аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 7. CAR заякоривается в клеточной мембране Т-клеток посредством такого трансмембранного участка.

Трансмембранный участок может включать шарнирный участок, который состоит из произвольного олигопептида или полипептида и имеет длину от 1 до 100 аминокислот, предпочтительно от 10 до 70 аминокислот. Примеры шарнирного участка могут включать шарнирный участок человеческого CD8.

Сигнальный участок, активирующий иммунокомпетентные клетки.

Сигнальный участок, активирующий иммунокомпетентные клетки представляет собой участок, способный передавать сигналы клеткам, если молекула клеточной поверхности распознает мезотелин. Сигнальный участок, активирующий иммунокомпетентные клетки, предпочтительно содержит по меньшей мере один или несколько элементов, выбранных из внутриклеточных участков полипептидов CD28, 4-1BB (CD137), GITR, CD27, OX40, HVEM, CD2 ζ или Fc-рецептор-ассоциированной γ -цепи, более предпочтительно он содержит три полипептида, например, полипептид внутриклеточного участка CD28, полипептид внутриклеточного участка 4-1BB и полипептид внутриклеточного участка CD3 ζ . Примеры аминокислотной последовательности внутриклеточного участка CD28 могут включать полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичную аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 8, и обладает активностью, эквивалентной активности аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 8, а также полипептид, который состоит из аминокислотной последовательности полученной из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 8, путем делеции, замены, вставки и/или добавления одной или нескольких аминокислот, и обладает активностью, эквивалентной активности аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 8. Примеры аминокислотной последовательности внутриклеточного участка 4-1BB могут включать полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичную аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 9, и обладает активностью, эквивалентной активности аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 9, а также полипептид, который состоит из аминокислотной последовательности, полученной из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 9, путем делеции, замены, вставки и/или добавления одной или нескольких аминокислот, и обладает активностью, эквивалентной активности аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 9. Примеры аминокислотной последовательности внутриклеточного участка CD3 ζ могут включать полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичную аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 10, и обладает активностью, эквивалентной активности аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 10, а также полипептид, который состоит из аминокислотной последовательности, полученной из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 10, путем делеции, замены, вставки и/или добавления одной или нескольких аминокислот, и обладает активностью, эквивалентной активности аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 10. Если в качестве иммунокомпетентной клетки используют Т-клетку, можно выбрать полипептид, способный передавать сигналы Т-клетке. Если используют другие иммунокомпетентные клетки, можно выбрать полипептиды, способные передавать сигналы в иммунокомпетентные клетки. Если в качестве иммунокомпетентной клетки используют Т-клетку, примеры сигнального участка, активирующего иммунокомпетентную клетку, могут включать полипептид, содержащий

аминокислотные последовательности, описанные в SEQ ID NOs: 8, 9 и 10, предпочтительно они могут включать полипептид, содержащий аминокислотные последовательности, описанные в SEQ ID NO: 8, 9 и 10, в направлении от N-концевой стороны.

Внеклеточный шарнирный участок и спейсер.

Внеклеточный шарнирный участок, состоящий из произвольного олигопептида или полипептида, может быть расположен между молекулой клеточной поверхности, распознающей мезотелин, и трансмембранным участком. Длина внеклеточного шарнирного участка может составлять от 1 до 100 аминокислотных остатков, предпочтительно от 10 до 70 аминокислотных остатков. Примеры такого внеклеточного шарнирного участка могут включать шарнирные участки, полученные из CD8, CD28 и CD4, а также шарнирные участки иммуноглобулинов.

Спейсерный участок, состоящий из произвольного олигопептида или полипептида, может быть расположен между трансмембранным участком и сигнальным участком, активирующим иммунокомпетентную клетку. Длина спейсерного участка может составлять, например, от 1 до 100 аминокислотных остатков, предпочтительно от 10 до 50 аминокислотных остатков. Примеры такого спейсерного участка могут включать непрерывную последовательность глицин-серин.

Расположение каждого участка.

В CAR описанные выше участки могут располагаться в следующем порядке: одноцепочечное антитело, трансмембранный участок и сигнальный участок, активирующий иммунокомпетентную клетку, в направлении от N-конца. Конкретные примеры могут включать CAR, в котором одноцепочечное антитело, специфически распознающее человеческий мезотелин, внеклеточный шарнирный участок человеческого CD8, трансмембранный участок человеческого CD8, сигнальный участок человеческого CD28, активирующий Т-клетки, сигнальный участок человеческого 4-1BB, активирующий Т-клетки, и сигнальный участок человеческого CD3 ζ , активирующий Т-клетки, располагаются по порядку в направлении от N-концевой стороны.

Белок, экспрессируемый суицидальным геном.

Иммунокомпетентная клетка по настоящему изобретению может экспрессировать белок, функция которого заключается в уничтожении собственной клетки, такой как тимидинкиназа вируса простого герпеса (HSV-TK) или индуцируемая каспаза 9 (белок, экспрессируемый суицидальным геном). Экспрессия такого белка суицидальным геном непосредственно или косвенно индуцирует вещество, которое обладает клеточной токсичностью и может выполнять функцию уничтожения собственной клетки. Следовательно, например, иммунокомпетентную клетку по настоящему изобретению, присутствующую в живом организме, можно контролировать путем введения лекарственного средства, активирующего функцию, после исчезновения опухоли вследствие курса лечения опухоли. А именно риск синдрома высвобождения цитокинов можно при необходимости эффективно снизить для иммунокомпетентной клетки по настоящему изобретению.

Примеры лекарственного средства, активирующего функцию тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-TK) или индуцируемой каспазы 9, могут включать ганцикловир для первой и AP1903, обеспечивающий химическую индукцию димеризации (CID), для последней (Cooper L.J. et al., *Cytherapy*, 2006; 8 (2): 105-17; Jensen M.C. et al., *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010 Sep; 16 (9): 1245-56; Jones B.S., *Front Pharmacol.*, 2014, Nov 27; 5: 254; Minagawa K., *Pharmaceuticals (Basel)*, 2015 May 8, 8 (2): 230-49; и Bole-Richard E., *Front Pharmacol.*, 2015, Aug 25, 6: 174).

Тип иммунокомпетентной клетки.

Тип иммунокомпетентной клетки особо не ограничивается при условии, что клетка участвует в иммунном ответе и может экспрессировать молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, IL-7 и CCL19, после введения нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, нуклеиновой кислоты, кодирующей IL-7, и нуклеиновой кислоты, кодирующей CCL19. Клетка предпочтительно представляет собой иммунокомпетентную клетку, выделенную из живого организма. Ее примеры могут включать лимфоидную клетку, такую как Т-клетка, натуральная клетка-киллер (НК-клетка) и В-клетка, антигенпрезентирующую клетку, такую как моноцит, макрофаг и дендритная клетка, и гранулоцит, такой как нейтрофил, эозинофил, базофил и тучная клетка, выделенные из живого организма. В частности, ее предпочтительные примеры могут включать Т-клетки, полученные или выделенные из организма млекопитающего, такого как человек, собака, кошка, свинья или мышь, а также Т-клетки, полученные или выделенные из организма человека. Т-клетка, полученная от млекопитающего, такого как человек, собака, кошка, свинья или мышь, включает в себя Т-клетку, полученную путем искусственного культивирования *ex vivo* Т-клетки, выделенной (собранной) из организма млекопитающего, такого как человек, собака, кошка, свинья или мышь, или Т-клетку, полученную путем субкультивирования такой Т-клетки. Выделенная Т-клетка может представлять собой популяцию клеток, содержащую в основном Т-клетки. Такая клеточная популяция может содержать другие клетки, отличные от Т-клеток, и, кроме того, она может содержать Т-клетки в соотношении 50% или более, предпочтительно 60% или более, более предпочтительно 70% или более, еще более предпочтительно 80% или более, наиболее предпочтительно 90% или более. Т-клетку можно получить путем выделения популяции клеток, содержащей иммунокомпетентную

тентную клетку из жидкости организма, такой как кровь или жидкость костного мозга, ткани, такой как ткань селезенки, вилочковой железы или лимфатического узла, или иммунокомпетентную клетку, инфильтрующую раковую ткань, такую как первичная опухоль, метастатическая опухоль или раковый асцит. Чтобы увеличить долю Т-клеток, содержащихся в клеточной популяции, Т-клетку можно дополнительно выделить или очистить, если это необходимо, из выделенной клеточной популяции с помощью стандартного метода. Клетку, полученную из клетки ES или клетки iPS, можно использовать в качестве иммунокомпетентной клетки. Примеры таких Т-клеток могут включать альфа-бета-Т-клетки, гамма-дельта-Т-клетки, Т-клетки CD8⁺, Т-клетки CD4⁺, Т-клетки, инфильтрующие опухоль, Т-клетки памяти, наивные Т-клетки и NKT-клетки. Иммунокомпетентная клетка может быть получена из такого же индивидуума, как и индивидуум, получающий введение, или из другого индивидуума. Если индивидуум, получающий введение, представляет собой человека, в качестве иммунокомпетентной клетки можно использовать аутологичную клетку, собранную у самого пациента, как у индивидуума, получающего введение, или в качестве иммунокомпетентной клетки можно использовать аллогенную клетку, собранная у другого человека. В частности, донор и реципиент необязательно, но предпочтительно являются одинаковыми.

Способ получения иммунокомпетентной клетки.

Примеры способа получения иммунокомпетентной клетки по настоящему изобретению могут включать способ получения, основанный на введении в иммунокомпетентную клетку нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу клеточной поверхности, нуклеиновой кислоты, кодирующей IL-7, и нуклеиновой кислоты, кодирующей CCL19, предпочтительно они могут включать в себя способ получения, основанный на введении в иммунокомпетентную клетку вектора экспрессии по настоящему изобретению, упоминающийся далее как способ, описанный, например, в патентном документе 1 или 2. Альтернативные примеры могут включать способ выделения и получения иммунокомпетентной клетки из трансгенного млекопитающего, полученного путем имплантации вектора, обеспечивающего экспрессию молекулы клеточной поверхности, специфически распознающей человеческий мезотелин, IL-7 и/или CCL19, в оплодотворенную яйцеклетку, и способ получения, дополнительно включающий введение, если это необходимо, вектора, обеспечивающего экспрессию молекулы клеточной поверхности, специфически распознающей человеческий мезотелин, IL-7 и/или CCL19, в иммунокомпетентную клетку, выделенную и полученную из трансгенного млекопитающего.

В случае введения нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу клеточной поверхности, нуклеиновой кислоты, кодирующей IL-7, и нуклеиновой кислоты, кодирующей CCL19, или вектора по настоящему изобретению, упомянутого ниже, в иммунокомпетентную клетку, способ введения нуклеиновых кислот или вектора может представлять собой любой способ введения нуклеиновых кислот или вектора в иммунокомпетентную клетку. Его примеры могут включать в себя такой способ, как электропорация (Cytotechnology, 3, 133 (1990)), кальций-фосфатный метод (публикация не прошедшей экспертизу патентной заявки Японии № 2-227075), липофекция (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)), и инфицирование вирусом. Примеры инфицирования вирусом могут включать трансфекцию пакующей клетки, такой как клетка GP2-293 (произведенная Takara Bio Inc.), клетка Plat-GP (произведенная Cosmo Bio Co., Ltd.), клетка PG13 (ATCC CRL-10686) или клетка PA317 (ATCC CRL-9078), вектором, подлежащим введению, и пакующей плазмидой с получением рекомбинантного вируса, и инфицирование иммунокомпетентной клетки рекомбинантным вирусом (патентный документ 2).

В случае получения "иммунокомпетентной клетки, которая экспрессирует молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, IL-7 и CCL19" с использованием вектора, иммунокомпетентную клетку можно получить с помощью любого из следующих способов:

(1) способ введения вектора, обеспечивающего экспрессию молекулы клеточной поверхности, специфически распознающей человеческий мезотелин, IL-7 и CCL19, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7 и нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19, в иммунокомпетентную клетку;

(2) способ введения одновременно или последовательно двух типов векторов, т.е. вектора, обеспечивающего экспрессию молекулы клеточной поверхности, специфически распознающей человеческий мезотелин, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, и вектора, обеспечивающего экспрессию IL-7 и CCL19, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7 и нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19, в иммунокомпетентную клетку;

(3) способ введения одновременно или последовательно двух типов векторов, т.е. вектора, обеспечивающего экспрессию молекулы клеточной поверхности, специфически распознающей человеческий мезотелин и IL-7, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, и нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7, и вектора, обеспечивающего экспрессию CCL19, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19, в иммунокомпетентную клетку;

(4) способ введения одновременно или последовательно двух типов векторов, т.е. вектора, обеспе-

интеграции нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, нуклеиновой кислоты, кодирующей IL-7, и нуклеиновой кислоты, кодирующей CCL19, в геном клетки, так чтобы они экспрессировались под контролем подходящего промотора с помощью публично известного метода редактирования генома. Примеры публично известного метода редактирования генома включают метод с использованием эндонуклеазы, такой как нуклеаза с цинковыми пальцами, TALEN (эффеторная нуклеаза, подобная активаторам транскрипции), системы CRISPR (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами)-Cas. Чтобы иммунокомпетентная клетка, которая экспрессирует, например, CAR, специфически распознающий человеческий мезотелин (CAR против человеческого мезотелина), экспрессировала другой экзогенный белок, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую другой экзогенный белок, можно подобным образом интегрировать в геном клетки, чтобы он экспрессировался под контролем подходящего промотора, с помощью метода редактирования генома. Конкретные примеры такого метода включают в себя

интеграцию полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR против человеческого мезотелина (или другой белок), функционально связанный с подходящим промотором, в некодирующий участок или т.п. клеточного генома; и

интеграцию полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR против человеческого мезотелина (или другой белок), ниже эндогенного промотора клеточного генома.

Примеры эндогенного промотора включают промоторы TCR α и TCR β .

Субъект, подлежащий введению.

Предпочтительные примеры субъекта, подлежащего введению, могут включать млекопитающее и клетку млекопитающего. Более предпочтительные примеры указанного млекопитающего могут включать человека, мышь, собаку, крысу, морскую свинку, кролика, птицу, овцу, свинью, представителя крупного рогатого скота, лошадь, кошку, мартишку и шимпанзе, особенно предпочтительно человека.

Вектор экспрессии.

Вектор экспрессии по настоящему изобретению может представлять собой любой вектор или его предшественник, который можно вводить в иммунокомпетентную клетку, так чтобы конкретный, кодируемый им белок (полипептид) мог экспрессироваться в иммунокомпетентной клетке, с получением иммунокомпетентной клетки по настоящему изобретению. Вектор экспрессии по настоящему изобретению конкретно не ограничивается вариантом осуществления. Специалисты в данной области могут сконструировать и получить вектор экспрессии, который обеспечивает экспрессию целевого белка (полипептида) в иммунокомпетентных клетках. Примеры вектора экспрессии по настоящему изобретению, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19, могут включать приведенные ниже векторы экспрессии (a)-(e), обеспечивающие получение иммунокомпетентной клетки по настоящему изобретению (далее также называемые "векторы против человеческого мезотелина, экспрессирующие IL-7/CCL19"). Термин "два вектора экспрессии", описанный ниже, относится к набору, содержащему векторы экспрессии двух типов, а термин "три вектора экспрессии" относится к набору, содержащему векторы экспрессии трех типов.

(a) Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19;

(b) два нижеследующих вектора экспрессии (b-1) и (b-2):

(b-1) вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин; и

(b-2) вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19;

(c) два нижеследующих вектора экспрессии (c-1) и (c-2):

(c-1) вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, и нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7; и

(c-2) вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19;

(d) два нижеследующих вектора экспрессии (d-1) и (d-2):

(d-1) вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7; и

(d-2) вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19;

(e) два нижеследующих вектора экспрессии (e-1) и (e-2):

(e-1) вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, и нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7; и

(e-2) вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу клеточной по-

верхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19;

(f) два нижеследующих вектора экспрессии (f-1) и (f-2):

(f-1) вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, и нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7; и

(f-2) вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19;

(g) два нижеследующих вектора экспрессии (g-1) и (g-2):

(g-1) вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19; и

(g-2) вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19; и

(h) три нижеследующих вектора экспрессии (h-1), (h-2) и (h-3):

(h-1) вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин;

(h-2) вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7; и

(h-3) вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19.

Вектор против человеческого мезотелина, экспрессирующий IL-7/CCL19, может дополнительно содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую другой фактор, контролирующей иммунную функцию, такой как IL-15, CCL21, IL-2, IL-4, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IP-10, интерферон- γ , MIP-1 α , GM-CSF, M-CSF, TGF- β , TNF- α или антитело, ингибирующее контрольные точки, или его фрагмент. Нуклеиновая кислота, кодирующая другой фактор, контролирующей иммунную функцию, предпочтительно представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую фактор, контролирующей иммунную функцию, отличный от IL-12.

Нуклеиновая кислота.

В настоящем описании "нуклеиновая кислота" может представлять собой любую молекулу из полимеризованных нуклеотидов и/или молекул, обладающих функциями, эквивалентными функциям нуклеотидов. Их примеры могут включать РНК, которая представляет собой полимер рибонуклеотидов, ДНК, которая представляет собой полимер дезоксирибонуклеотидов, смешанный полимер рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов, и нуклеотидный полимер, содержащий аналог нуклеотида. Альтернативно можно использовать нуклеотидный полимер, содержащий производное нуклеиновой кислоты. Нуклеиновая кислота может представлять собой одноцепочечную нуклеиновую кислоту или двухцепочечную нуклеиновую кислоту. Двухцепочечная нуклеиновая кислота также включает в себя двухцепочечную нуклеиновую кислоту, в которой одна из цепей гибридизуется в жестких условиях с другой цепью.

Аналог нуклеотида может представлять собой любую молекулу при условии, что молекула представляет собой рибонуклеотид, дезоксирибонуклеотид, РНК или ДНК, модифицированные так, чтобы повысить или стабилизировать устойчивость к нуклеазе, повысить сродство к комплементарной цепи нуклеиновой кислоты, повысить способность к проникновению в клетки или чтобы визуализировать молекулу по сравнению с РНК или ДНК. Аналог нуклеотида может представлять собой природную молекулу или неприродную молекулу. Его примеры включают аналог нуклеотида с модифицированным сахарным фрагментом и аналог нуклеотида с модифицированной фосфодиэфирной связью.

Аналог нуклеотида с модифицированным сахарным фрагментом может представлять собой любую молекулу, полученную путем добавления вещества с произвольной химической структурой к химической структуре сахара или замены этим веществом фрагмента или всей структуры сахара, входящего в состав нуклеотида. Его конкретные примеры включают аналог нуклеотида, замещенного 2'-О-метилрибозой, аналог нуклеотида, замещенного 2'-О-пропилрибозой, аналог нуклеотида, замещенного 2'-метоксиэтоксирибозой, аналог нуклеотида, замещенного 2'-О-метоксиэтилрибозой, аналог нуклеотида, замещенного 2'-О-[2-(гуанидин)этил]рибозой, аналог нуклеотида, замещенного 2'-фторрибозой, мостиковую нуклеиновую кислоту (BNA), содержащую две циклические структуры в результате введения мостиковой структуры в сахарный фрагмент, более конкретно закрытую нуклеиновую кислоту (LNA), содержащую атом кислорода в положении 2' и атом углерода в положении 4', соединенные метиленом, и содержащую этиленовый мостик нуклеиновую кислоту (ENA) [Nucleic Acid Research, 32, e175 (2004)], и может дополнительно включать пептидно-нуклеиновую кислоту (PNA) [Acc. Chem. Res., 32, 624 (1999)], оксипептидно-нуклеиновую кислоту (OPNA) [J. Am. Chem. Soc., 123, 4653 (2001)], и пептидно-рибонуклеиновую кислоту (PRNA) [J. Am. Chem. Soc., 122, 6900 (2000)].

Аналог нуклеотида с модифицированной фосфодиэфирной связью может представлять собой любую молекулу, полученную в результате добавления вещества с произвольной химической структурой к химической структуре фосфодиэфирной связи или замены этим веществом фрагмента или всей структуры

ры фосфодиэфирной связи, входящей в состав нуклеотида. Его конкретные примеры могут включать аналог нуклеотида, замещенный фосфоротиоатной связью, и аналог нуклеотида, замещенный N3'-P5'-фосфорамидатной связью [Cell Engineering, 16, 1463-1473 (1997)] [RNAi Method and Antisense Method, Kodansha Ltd. (2005)].

Производное нуклеиновой кислоты может представлять собой любую молекулу при условии, что молекула представляет собой нуклеиновую кислоту, содержащую другое химическое вещество, добавленное к ней для того, чтобы повысить или стабилизировать устойчивость к нуклеазе, повысить сродство к комплементарной цепи нуклеиновой кислоты, повысить способность к проникновению в клетки или чтобы визуализировать молекулу по сравнению с нуклеиновой кислотой. Его конкретные примеры могут включать производное, полученное путем добавления 5'-полиамин, производное, полученное путем добавления холестерина, производное, полученное путем добавления стероида, производное, полученное путем добавления желчной кислоты, производное, полученное путем добавления витамина, производное, полученное путем добавления Су5, производное, полученное путем добавления Су3, производное, полученное путем добавления 6-FAM, и производное, полученное путем добавления биотина.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, IL-7, CCL19 и др.

Примеры нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, нуклеиновой кислоты, кодирующей IL-7, и нуклеиновой кислоты, кодирующей CCL19, могут включать соответствующие нуклеиновые кислоты, полученные из млекопитающего, и могут предпочтительно включать соответствующие нуклеиновые кислоты, полученные из организма человека. Каждая из нуклеиновых кислот может быть соответственно выбрана в зависимости от типа клетки, в которую вводят вектор экспрессии по настоящему изобретению. Информацию о последовательности каждой из нуклеиновых кислот можно соответственно получить путем поиска в публично известном документе или публично известной базе данных, такой как NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>).

Примеры нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, могут включать нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, специфически распознающий человеческий мезотелин.

Конкретные примеры нуклеиновой кислоты, кодирующей одноцепочечное антитело, содержащееся в CAR, специфически распознающем человеческий мезотелин, могут включать нижеследующие нуклеиновые кислоты (1-1D)-(3-1D):

(1-1D) нуклеиновую кислоту, кодирующую одноцепочечное антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи, который содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 14, и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 15, и переменный участок легкой цепи, который содержит CDR1 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 16, CDR2 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 17, и CDR3 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 18;

(2-1D) нуклеиновую кислоту, кодирующую одноцепочечное антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи, который содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 14, и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 15, и переменный участок легкой цепи, который содержит CDR1 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 19, CDR2 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 17, и CDR3 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 18; и

(3-1D) нуклеиновую кислоту, кодирующую одноцепочечное антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи, который содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 20, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 21, и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 22, и переменный участок легкой цепи, который содержит CDR1 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 23, CDR2 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 24, и CDR3 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 25.

Конкретные примеры дополнительной формы 1 нуклеиновой кислоты, кодирующей одноцепочечное антитело, содержащееся в CAR, специфически распознающем человеческий мезотелин, могут включать нижеследующие нуклеиновые кислоты (1-2D)-(5-2D):

(1-2D) нуклеиновую кислоту, кодирующую одноцепочечное антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи, который состоит из аминокислотной последовательности, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичной аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 1, и переменный участок легкой цепи, который состоит из аминокислотной последовательности, на 85%

почтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичную аминокислотной последовательности внутриклеточного участка человеческого CD3ζ, описанной в SEQ ID NO: 10, и обладает активностью, эквивалентной активности аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 10, а также их сочетание, предпочтительно нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид внутриклеточного участка человеческого CD28, описанный в SEQ ID NO: 8, нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид внутриклеточного участка человеческого 4-1BB, описанный в SEQ ID NO: 9, и нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид внутриклеточного участка человеческого CD3ζ, описанный в SEQ ID NO: 10, в направлении от стороны, находящейся выше по ходу считывания (5'-концевой стороны).

Примеры нуклеиновой кислоты, кодирующей IL-7, могут включать нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичную аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 28, и обладает активностью, эквивалентной активности аминокислотной последовательности, описанной

в SEQ ID NO: 28, а именно нуклеиновую кислоту, состоящую из нуклеотидной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 30. Нуклеиновая кислота, кодирующая IL-7, может представлять собой нуклеиновую кислоту, на 80% или более, предпочтительно на 85% или более, более предпочтительно на 90% или более, еще более предпочтительно на 95% или более, наиболее предпочтительно на 98% или более идентичную нуклеиновой кислоте, состоящей из нуклеотидной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 30, при условии, что нуклеиновая кислота способна повышать скорость пролиферации или степень выживания клеток после воздействия IL-7. Примеры нуклеиновой кислоты, кодирующей CCL19, могут включать нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, на 85% или более, предпочтительно на 90% или более, более предпочтительно на 95% или более, еще более предпочтительно на 98% или более идентичную аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 29, и обладает активностью, эквивалентной активности аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 29, а именно нуклеиновую кислоту, состоящую из нуклеотидной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 31. Можно использовать нуклеиновую кислоту, на 80% или более, предпочтительно на 85% или более, более предпочтительно на 90% или более, еще более предпочтительно на 95% или более, наиболее предпочтительно на 98% или более идентичную нуклеиновой кислоте, состоящей из нуклеотидной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 31, при условии, что нуклеиновая кислота способна оказывать такое же действие на миграцию клеток, как и CCL19.

Суицидальный ген.

Вектор экспрессии по настоящему изобретению может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую суицидальный ген. Суицидальный ген представляет собой ген, который непосредственно или косвенно индуцирует вещество, которое обладает клеточной токсичностью и выполняет функцию уничтожения собственной клетки. Благодаря вектору экспрессии по настоящему изобретению, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую суицидальный ген, например иммунокомпетентную клетку, присутствующую в живом организме, можно контролировать путем введения лекарственного средства, активирующего функцию суицидального гена после исчезновения опухоли, обусловленного курсом лечения рака. IL-7 или CCL19, в отличие от других цитокинов, с меньшей вероятностью вызывают такие побочные реакции, как синдром высвобождения цитокинов или канцерогенная трансформация трансфицированных клеток. Однако усиление функций иммунокомпетентных клеток, несущих вектор экспрессии по настоящему изобретению, может приводить к неожиданному влиянию на соседние ткани цитокинов и др., высвобождаемых после воздействия на целевую раковую ткань. В таком случае нуклеиновая кислота, кодирующая суицидальный ген, входящая в состав вектора экспрессии по настоящему изобретению, может надежно уменьшать риск синдрома высвобождения цитокинов.

Примеры суицидального гена могут включать ген, кодирующий тимидинкиназу вируса простого герпеса (HSV-TK) или индуцируемую каспазу 9, описанный в приведенном ниже документе. Примеры лекарственного средства, активирующего функцию такого гена, могут включать ганцикловир для первого и AP1903, обеспечивающий химическую индукцию димеризации (CID) для последнего.

Получение информации по нуклеотидной последовательности и нуклеиновой кислоты.

Каждая из нуклеиновых кислот, содержащихся в векторе экспрессии по настоящему изобретению, может представлять собой природную нуклеиновую кислоту или искусственно синтезированную нуклеиновую кислоту и может быть соответственно выбрана в зависимости от типа клетки, в которую вводят вектор экспрессии по настоящему изобретению. Информацию по последовательностям таких нуклеиновых кислот можно соответственно получить путем поиска в публично известном документе или публично известной базе данных, такой как NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>).

Каждую из нуклеиновых кислот можно получить путем публично известного метода, такого как метод химического синтеза или метод амплификации ПЦР, на основе информации по нуклеотидной последовательности каждой из нуклеиновых кислот. Кодоны, выбранные для кодирования аминокислот,

можно сконструировать, чтобы оптимизировать экспрессию нуклеиновой кислоты в представляющей интерес клетке-хозяине.

Расположение каждой нуклеиновой кислоты.

Если вектор экспрессии по настоящему изобретению представляет собой вектор экспрессии, (а) содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19, одна из нуклеиновых кислот может располагаться выше или ниже других нуклеиновых кислот. А именно, если вектор экспрессии содержит, например, нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR против человеческого мезотелина, в качестве нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, нуклеиновые кислоты могут располагаться в следующем порядке:

нуклеиновая кислота, кодирующая CAR против человеческого мезотелина, нуклеиновая кислота, кодирующая IL-7, и нуклеиновая кислота, кодирующая CCL19; или

нуклеиновая кислота, кодирующая CAR против человеческого мезотелина, нуклеиновая кислота, кодирующая CCL19, и нуклеиновая кислота, кодирующая IL-7; или

нуклеиновая кислота, кодирующая IL-7, нуклеиновая кислота, кодирующая CCL19, и нуклеиновая кислота, кодирующая CAR против человеческого мезотелина; или

нуклеиновая кислота, кодирующая IL-7, нуклеиновая кислота, кодирующая CAR против мезотелина, и нуклеиновая кислота, кодирующая CCL19; или

нуклеиновая кислота, кодирующая CCL19, нуклеиновая кислота, кодирующая CAR против мезотелина, и нуклеиновая кислота, кодирующая IL-7; или

нуклеиновая кислота, кодирующая CCL19, нуклеиновая кислота, кодирующая IL-7, и нуклеиновая кислота, кодирующая CAR против человеческого мезотелина, начиная от стороны, находящейся выше по ходу считывания (5'-концевой стороны).

В векторе экспрессии по настоящему изобретению (b-2), (f-2) или (g-2), содержащем нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19, расположение нуклеиновой кислоты, кодирующей IL-7, и нуклеиновой кислоты, кодирующей CCL19, конкретно не ограничивается. Нуклеиновая кислота, кодирующая CCL19, может находиться выше или ниже нуклеиновой кислоты, кодирующей IL-7.

В векторе экспрессии по настоящему изобретению (c-1), (e-1) или (f-1), содержащем нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, и нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7, расположение нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, и нуклеиновой кислоты, кодирующей IL-7, конкретно не ограничивается. Нуклеиновая кислота, кодирующая IL-7, может находиться выше или ниже нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин.

В векторе экспрессии по настоящему изобретению (d-2), (e-2) или (g-1), содержащем нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19, расположение нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин, и нуклеиновой кислоты, кодирующей CCL19, конкретно не ограничивается. Нуклеиновая кислота, кодирующая CCL19, может находиться выше или ниже нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую человеческий мезотелин.

Транскрипция.

Нуклеиновая кислота, кодирующая молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую мезотелин, нуклеиновая кислота, кодирующая IL-7, нуклеиновая кислота, кодирующая CCL19, и нуклеиновая кислота, кодирующая суицидальный ген, могут транскрибироваться под управлением разных промоторов, или они могут транскрибироваться под управлением одного промотора с использованием внутреннего участка посадки рибосомы (IRES) или саморасщепляющегося пептида 2A.

Произвольная нуклеиновая кислота может находиться между нуклеиновой кислотой, кодирующей IL-7, и нуклеиновой кислотой, кодирующей CCL19, в случае транскрибирования указанных нуклеиновых кислот под управлением одного промотора с использованием внутреннего участка посадки рибосомы (IRES) или саморасщепляющегося пептида 2A, или между нуклеиновой кислотой, кодирующей молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую мезотелин, и нуклеиновой кислотой, кодирующей IL-7, и нуклеиновой кислотой, кодирующей CCL19, в случае присутствия нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу клеточной поверхности, специфически распознающую мезотелин, при условии, что все нуклеиновые кислоты могут экспрессироваться. Соединение предпочтительно осуществляют через последовательность, кодирующую саморасщепляющийся пептид (пептид 2A) или IRES, предпочтительно последовательность, кодирующую пептид 2A. Соединение посредством такой последовательности обеспечивает эффективную экспрессию каждой нуклеиновой кислоты.

Пептид 2A представляет собой полученный из вируса саморасщепляющийся пептид, который характеризуется тем, что аминокислотная последовательность, описанная в SEQ ID NO: 32, расщепляется

по G-P (положение одного остатка от C-конца) в эндоплазматическом ретикулуме (Szymczak et al., Expert Opin. Biol. Ther., 5 (5): 627-638 (2005)). Следовательно, каждая из нуклеиновых кислот, фланкирующих пептид 2A, экспрессируется независимо в клетке посредством пептида 2A.

Пептид 2A предпочтительно представляет собой пептид 2A, полученный из пикорнавируса, ротавируса, вируса насекомых, афтовируса или вируса трипаномы, более предпочтительно пептид 2A, полученный из пикорнавируса (F2A), описанный в SEQ ID NO: 33.

Тип вектора.

Тип вектора экспрессии по настоящему изобретению может включать в себя линейную форму или циклическую форму и может представлять собой невирусный вектор, такой как плаزمид, вирусный вектор или вектор на основе транспозона. Такой вектор может содержать регуляторную последовательность, такую как промотор или терминатор, или последовательность селективируемого маркера, такого как ген устойчивости к лекарственному средству, или репортерный ген. Нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19, располагают в функциональной зависимости от промоторной последовательности, так чтобы каждая нуклеиновая кислота могла эффективно транскрибироваться.

Примеры промотора могут включать

вирусный промотор, такой как промотор LTR ретровируса, ранний промотор SV40, промотор цитомегаловируса и промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса; и

промотор млекопитающего, такой как промотор фосфоглицераткиназы (PGK), промотор Xist, промотор β -актина и промотор РНК-полимеразы II.

Альтернативно можно использовать тетрациклин-чувствительный промотор, который индуцируется тетрациклином, промотор Mx1, который индуцируется интерферон, и т.п. Применение промотора, который индуцируется конкретным веществом, в векторе экспрессии по настоящему изобретению обеспечивает контроль индукции экспрессии IL-7 и CCL19 в соответствии с курсом лечения рака, например, если иммунокомпетентную клетку, содержащую вектор по настоящему изобретению, используют в качестве фармацевтической композиции для применения в способе лечения рака.

Примеры вирусного вектора могут включать ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор и вектор из аденоассоциированного вируса, предпочтительно они могут включать ретровирусный вектор, более предпочтительно вектор pMSGV (Tamada K. et al., Clin. Cancer. Res., 18: 6436-6445 (2002)) и вектор pMSCV (произведенный Takara Bio Inc.). Применение ретровирусного вектора обеспечивает длительную и стабильную экспрессию трансгена, поскольку трансген интегрируется в геном клетки-хозяина.

Чтобы подтвердить локализацию вектора экспрессии по настоящему изобретению в иммунокомпетентной клетке, можно определить, например, экспрессию CAR методом проточной цитометрии, нозерн-блоттинга, саузерн-блоттинга, ПЦР, такой как ОТ-ПЦР, ИФА или вестерн-блоттинга, если вектор экспрессии содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, а если вектор экспрессии содержит маркерный ген, можно определить экспрессию маркерного гена, введенного в состав вектора экспрессии по настоящему изобретению.

Фармацевтическая композиция.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению не ограничивается при условии, что фармацевтическая композиция содержит иммунокомпетентную клетку по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемую добавку. Примеры добавки могут включать физиологический раствор, забуференный физиологический раствор, среду для культивирования клеток, декстрозу, воду для инъекций, глицерин, этанол и их сочетания, стабилизатор, солюбилизатор и поверхностно-активное вещество, буфер и антисептик, средство, регулирующее тоничность, наполнитель и смазывающее средство. Поскольку иммунокомпетентная клетка, входящая в состав фармацевтической композиции по настоящему изобретению, содержит сигнальный участок, который вызывает активацию иммунокомпетентной клетки, фармацевтическая композиция по настоящему результату может служить фармацевтической композицией для применения в способе лечения рака. Такая фармацевтическая композиция для применения в способе лечения рака может содержать вкладыш в упаковку, этикетку, упаковку и т.п. с указанием способа применения и т.д. при лечении рака. Поскольку иммунокомпетентная клетка, входящая в состав фармацевтической композиции по настоящему изобретению, подавляет рецидив опухоли, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно использовать для подавления рецидива опухоли. Такая фармацевтическая композиция для подавления рецидива опухоли может содержать вкладыш в упаковку, этикетку, упаковку или т.п. с указанием способа применения и т.д. при подавлении рецидива опухоли.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить тестируемому индивидууму, нуждающемуся в этом, с помощью способа, известного специалистам в данной области. Примеры способа введения могут включать внутривенную, внутриопухолевую, внутрикожную, подкожную, внутримышечную, внутрибрюшинную, внутриартериальную, интрамедуллярную, внутрисердечную, внутрисуставную, интрасиновиальную, внутричерепную, интратекальную и субарахноидальную (в спинномозговую жидкость) инъекции.

В иллюстративном способе фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно

независимо вводить одной порцией или несколькими разделенными порциями 4 раза, 3 раза, 2 раза или 1 раз в день с интервалом 1, 2, 3, 4 или 5 дней, один раз в неделю, с интервалом 7, 8 или 9 дней, два раза в неделю, один раз в месяц или два раза в месяц.

Тип рака, который можно лечить с помощью фармацевтической композиции по настоящему изобретению, конкретно не ограничивается и предпочтительно представляет собой тип рака, характеризующийся экспрессией мезотелина в раковой ткани, или тип рака, получаемый из раковых клеток, экспрессирующих мезотелин. Примеры рака могут включать

такой рак, как мезотелиома, колоректальный рак (рак толстой кишки или рак прямой кишки), рак поджелудочной железы, рак тимуса, рак желчных протоков, рак легких (аденокарцинома, плоскоклеточный рак, аденосквамозный рак, недифференцированный рак, крупноклеточный рак и мелкоклеточный рак), рак кожи, рак молочной железы, рак простаты, рак мочевого пузыря, рак влагалища, рак шеи, рак матки, рак печени, рак почки, рак поджелудочной железы, рак селезенки, рак трахеи, рак бронхов, рак толстой кишки, рак тонкой кишки, рак желудка, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак яичка и рак яичника;

рак костной ткани, хрящевой ткани, жировой ткани, мышечной ткани, сосудистой ткани и кровеносной ткани;

саркому, такую как хондросаркому, саркому Юинга, злокачественную гемангиоэндотелиому, злокачественную шванному, остеосаркому и саркому мягких тканей;

бластоме, такую как гепатобластома, медуллобластома, нефробластома, нейробластома, панкреатобластома, плевропульмональная бластома и ретинобластома; и

эмбрионально-клеточную опухоль.

Доза фармацевтической композиции для введения может представлять собой терапевтически эффективное количество. Примеры дозы могут предпочтительно включать от 1×10^4 до 1×10^{10} клеток, предпочтительно от 1×10^5 до 1×10^9 клеток, более предпочтительно от 5×10^6 до 5×10^8 клеток в пересчете на число клеток, вводимых в одной дозе.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно использовать в сочетании с другим противораковым средством. Примеры другого противоракового средства могут включать

алкилирующее средство, такое как циклофосфамид, бендамустин, ифосфамид и дакарбазин; анти-метаболит, такой как пентостатин, флударабин, кладрибин, метотрексат, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин и эноцитабин;

лекарственное средство молекулярной направленности, такое как ритуксимаб, цетуксимаб и трастузумаб;

ингибитор киназы, такой как иматиниб, гефитиниб, эрлотиниб, афатиниб, дазатиниб, сунитиниб и траметиниб;

ингибитор протеасомы, такой как бортезомиб;

препарат, ингибирующий кальциневрин, такой как циклоспорин и такролимус;

противораковый антибиотик, такой как идарубицин, доксорубицин и митомицин C;

растительный алкалоид, такой как иринотекан и этопозид;

платиносодержащее лекарственное средство, такое как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин;

гормональное терапевтическое средство, такое как тамоксифен и бикалутамид; и

иммунорегуляторный препарат, такой как интерферон, ниволумаб и пембролизумаб.

Примеры способа "применения фармацевтической композиции по настоящему изобретению в сочетании с другим противораковым средством" могут включать способ применения другого противоракового средства в процессе использования фармацевтической композиции по настоящему изобретению и после него, способ одновременного использования фармацевтической композиции по настоящему изобретению и другого противоракового средства, а также способ использования фармацевтической композиции по настоящему изобретению в процессе использования другого противоракового средства и после него. Комбинированное использование фармацевтической композиции по настоящему изобретению в способе лечения рака другим противораковым средством дополнительно улучшает терапевтическое воздействие на рак и может уменьшать побочные реакции каждого противоракового средства путем уменьшения частоты введения или дозы противоракового средства. Альтернативно другое противораковое средство может входить в состав фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Другие аспекты по настоящему изобретению.

Примеры дополнительного аспекта 1 по настоящему изобретению могут включать

1) способ лечения рака, включающий введение иммунокомпетентной клетки по настоящему изобретению пациенту, нуждающемуся в лечении рака;

2) иммунокомпетентную клетку по настоящему изобретению для применения в качестве фармацевтической композиции; и

3) применение иммунокомпетентной клетки по настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции.

Примеры дополнительного аспекта 2 по настоящему изобретению могут включать химерный ре-

цептор антигена (CAR), содержащий одно из приведенных ниже одноцепочечных антител, трансмембранной участок и сигнальный участок, который индуцирует активацию иммунокомпетентной клетки. Такой CAR после экспрессии в иммунокомпетентной клетке способен активировать иммунокомпетентную клетку в результате стимуляции человеческим мезотелином.

(1-1) Одноцепочечное антитело, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 14, и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 15, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит CDR1 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 16, CDR2 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 17, и CDR3 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 18;

(2-1) одноцепочечное антитело, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 14, и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 15, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит CDR1 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 19, CDR2 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 17, и CDR3 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 18; и

(3-1) одноцепочечное антитело, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 20, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 21, и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 22, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит CDR1 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 23, CDR2 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 24, и CDR3 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 25.

Примеры дополнительного аспекта 3 по настоящему изобретению могут включать набор для получения иммунокомпетентной клетки, содержащей вектор экспрессии по настоящему изобретению. Такой набор конкретно не ограничивается при условии, что набор содержит вектор экспрессии по настоящему изобретению. Набор может содержать инструкцию по получению иммунокомпетентной клетки по настоящему изобретению и реагент, используемый для введения вектора экспрессии по настоящему изобретению в иммунокомпетентную клетку.

Примеры дополнительного аспекта 4 по настоящему изобретению могут включать способ подавления рецидива рака, включающий введение индивидууму иммунокомпетентной клетки, которая одновременно экспрессирует молекулу клеточной поверхности (предпочтительно CAR, содержащий одноцепочечное антитело, специфически распознающее человеческий мезотелин), IL-7 и CCL19.

Далее настоящее изобретение будет описано более конкретно со ссылкой на примеры. Однако технический объем настоящего изобретения не ограничивается указанными примерами.

Пример 1. Получение CAR против человеческого мезотелина.

Синтез последовательности scFv и фрагмента ДНК CAR против человеческого мезотелина.

Последовательности 9 типов scFv против человеческого мезотелина, показанные на фиг. 1, конструируют для сравнения последовательностей, порядка VL и VH и типа подходящего сигнального пептида.

VH07(15)VL07 состоит из аминокислотной последовательности вариабельного участка тяжелой цепи, описанной в SEQ ID NO: 1, аминокислотной последовательности пептидного линкера, описанной в SEQ ID NO: 26, и аминокислотной последовательности вариабельного участка легкой цепи, описанной в SEQ ID NO: 2.

VH36(15)VL36 состоит из аминокислотной последовательности вариабельного участка тяжелой цепи, описанной в SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности пептидного линкера, описанной в SEQ ID NO: 26, и аминокислотной последовательности вариабельного участка легкой цепи, описанной в SEQ ID NO: 4.

VL07(15)VH07 состоит из аминокислотной последовательности вариабельного участка легкой цепи, описанной в SEQ ID NO: 2, аминокислотной последовательности пептидного линкера, описанной в SEQ ID NO: 26, и аминокислотной последовательности вариабельного участка тяжелой цепи, описанной в SEQ ID NO: 1.

VH07(25)VL07 состоит из аминокислотной последовательности вариабельного участка тяжелой цепи, описанной в SEQ ID NO: 1, аминокислотной последовательности пептидного линкера, описанной в SEQ ID NO: 27, и аминокислотной последовательности вариабельного участка легкой цепи, описанной в SEQ ID NO: 2.

VL07(25)VH07 состоит из аминокислотной последовательности вариабельного участка легкой це-

пи, описанной в SEQ ID NO: 2, аминокислотной последовательности пептидного линкера, описанной в SEQ ID NO: 27, и аминокислотной последовательности переменного участка тяжелой цепи, описанной в SEQ ID NO: 1.

VHMO(15)VLMO состоит из аминокислотной последовательности переменного участка тяжелой цепи, описанной в SEQ ID NO: 5, аминокислотной последовательности пептидного линкера, описанной в SEQ ID NO: 26, и аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи, описанной в SEQ ID NO: 6.

VLMO(15)VHMO состоит из аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи, описанной в SEQ ID NO: 6, аминокислотной последовательности пептидного линкера, описанной в SEQ ID NO: 26, и аминокислотной последовательности переменного участка тяжелой цепи, описанной в SEQ ID NO: 5.

VHMO(25)VLMO состоит из аминокислотной последовательности переменного участка тяжелой цепи, описанной в SEQ ID NO: 5, аминокислотной последовательности пептидного линкера, описанной в SEQ ID NO: 27, и аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи, описанной в SEQ ID NO: 6.

VLMO(25)VHMO состоит из аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи, описанной в SEQ ID NO: 6, аминокислотной последовательности пептидного линкера, описанной в SEQ ID NO: 27, и аминокислотной последовательности переменного участка тяжелой цепи, описанной в SEQ ID NO: 5.

Аминокислотные последовательности, описанные в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3, различаются тем, что 127 аминокислота представляет собой глицин (G) в SEQ ID NO: 1 и лейцин (L) в аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 3. Аминокислотные последовательности, описанные в SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4 различаются тем, что 33 аминокислота в SEQ ID NO: 2 представляет собой тирозин (Y), который отсутствует в аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 4.

Синтезируют фрагмент ДНК, кодирующий аминокислотную последовательность одного из scFv против человеческого мезотелина.

Получение вектора экспрессии CAR против человеческого мезотелина IL-7/CCL19, экспрессирующего IL-7/CCL19 и HSV-TK, и вектора экспрессии Conv. CAR против человеческого мезотелина, не экспрессирующего IL-7/CCL19.

CAR-T-клеточная терапия может вызывать системные побочные реакции, такие как синдром высвобождения цитокинов, вследствие сильного иммунного ответа на целевой антиген. Для решения этой проблемы разработана конструкция CAR, несущая ген тимидинкиназы HSV-TK вируса герпеса в качестве суицидального гена. Если Т-клетки трансфицируют конструкцией так, что CAR-экспрессирующие Т-клетки экспрессируют HSV-TK, добавление терапевтического лекарственного средства против цитомегаловируса, ганцикловира, вызывает апоптоз CAR-T-клеток и убивает эти клетки. Следовательно, CAR-T-клетки в организме можно контролировать введением ганцикловира.

Вначале получают конструкцию CAR третьего поколения, последовательно содержащую scFv против человеческого мезотелина, трансмембранный участок человеческого CD8 и внутриклеточный сигнальный участок человеческого CD28-4-1BB-CD3 ζ , в направлении от N-конца с помощью способа, описанного в патентном документе 2. К C-концу конструкции добавляют пептид 2A F2A и затем добавляют человеческий IL-7-F2A-человеческий CCL19-F2A-HSV-TK ниже по ходу считывания. Полученную конструкцию, последовательно содержащую scFv, трансмембранный участок человеческого CD8, внутриклеточный сигнальный участок человеческого CD28-4-1BB-CD3 ζ , человеческий IL-7, человеческий CCL19 и HSV-TK, вставляют в ретровирусный вектор экспрессии pMSGV1 (Tamada K et al., Clin. Cancer. Res., 18: 6436-6445 (2012)) с получением вектора pMSGV, обеспечивающего экспрессию scFv против человеческого мезотелина, трансмембранного участка человеческого CD8, внутриклеточного сигнального участка человеческого CD28-4-1BB-CD3 ζ , человеческого IL-7, человеческого CCL19 и HSV-TK. Затем участок scFv против человеческого мезотелина в векторе pMSGV замещают путем обработки ферментом рестрикции (NcoI и NotI) и лигирования с каждым фрагментом ДНК scFv против человеческого мезотелина, синтезированным по способу, описанному в разделе "Синтез последовательности scFv и фрагмента ДНК CAR против человеческого мезотелина", с получением "вектора экспрессии IL-7/CCL19 CAR против человеческого мезотелина". Вектор pMSGV1 содержит сигнальный пептид Т (SEQ ID NO: 11), полученный из иммуноглобулина G, на N-концевой стороне scFv. В векторе, содержащем фрагмент ДНК VH07(15)VL07, замещенный участком scFv, сигнальный пептид Т, описанный в SEQ ID NO: 11, заменяют сигнальным пептидом Р, описанным в SEQ ID NO: 12, обеспечивающим продукцию. Кроме того, в качестве контроля получают "вектор Conv. CAR против человеческого мезотелина", не экспрессирующий IL-7 и CCL19, с помощью способа, описанного выше, за исключением того, что HSV-TK используют вместо человеческого IL-7-F2A-человеческий CCL19-F2A-HSV-TK.

Получение ретровируса, несущего вектор экспрессии IL-7/CCL19-CAR против человеческого мезотелина или вектор Conv. CAR против человеческого мезотелина.

Получают ретровирус для трансфекции Т-клеток. Пакующую клеточную линию GP2-293 (произве-

денную Takara Bio Inc.) трансфицируют вектором экспрессии IL-7/CCL19-CAR против человеческого мезотелина или вектором Conv. CAR против человеческого мезотелина и плазмидой p-Ampho (произведенной Takara Bio Inc.), используя липофектамин 3000 (произведенный Life Technologies Corp.), с получением ретровируса, несущего вектор экспрессии IL-7/CCL19-CAR против человеческого мезотелина или вектор Conv. CAR против человеческого мезотелина. Супернатант, содержащий ретровирус, извлекают через 48 ч после трансфекции.

В качестве культурального раствора для клеток GP2-293 используют DMEM, содержащую 10% FCS и 1% пенициллина-стрептомицина (произведенного Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). В качестве раствора для культивирования Т-клеток, описанного в приведенных ниже примерах, используют GT-T551, содержащий 2,0% сыворотки человеческой крови типа АВ (произведенной Sigma-Aldrich Co. LLC), 1% пенициллина-стрептомицина (произведенного Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) и 2,5 мкг/мл амфотерицина В (произведенного Bristol-Myers Squibb Company).

Трансдукция Т-клетки.

Чтобы активировать Т-клетки, 2×10^6 моноклональных клеток периферической крови, собранных из крови здорового донора, культивируют с IL-2 (произведенного PergoTech, Inc.) в инкубаторе в течение 3 дней при 37°C и 5% CO₂ на планшете, на котором иммобилизованы моноклональное антитело против CD3 (5 мкг/мл) и RetroNectin® (произведенный Takara Bio Inc., 25 мкг/мл). На 2 день после начала культивирования супернатант, содержащий полученный ретровирус, несущий вектор экспрессии IL-7/CCL19-CAR против человеческого мезотелина или вектор Conv. CAR против человеческого мезотелина, добавляют в количестве 500 мкл/лунку в необработанный 24-луночный планшет, предварительно покрытый 25 мкг/мл RetroNectin (производства Takara Bio Inc.), и центрифугируют при 2000 g в течение 2 ч с получением планшета с предварительной нагрузкой ретровируса. Всего получают два таких планшета, которые промывают 1,5% BSA/PBS после завершения центрифугирования и хранят при 4°C до использования. На 3 день культивирования активированные клетки извлекают из планшета и получают клеточную суспензию (1×10^5 клеток/мл). Эту клеточную суспензию добавляют по 1 мл/лунку в планшет с предварительной нагрузкой ретровируса и культивируют в присутствии IL-2 в инкубаторе в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂, с достижением первой инфекции ретровируса. На следующий день (4 день культивирования) клеточный лизат из каждой лунки переносят в сохраненный второй планшет с предварительной нагрузкой вируса, центрифугируют при 500 g в течение 1 мин и затем культивируют при 37°C в течение 4 ч с достижением второй инфекции. После культивирования при 37°C в течение 4 ч 1 мл клеточной суспензии из каждой лунки переносят в свежий 12-луночный планшет для культивирования клеток, разбавляют в 4 раза свежим культуральным раствором (GT-T551), содержащим IL-2, и культивируют в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Культивирование продолжают 7 дней, считая от даты начала культивирования моноклональных клеток периферической крови, с получением "Т-клеток, экспрессирующих IL-7/CCL19-CAR против человеческого мезотелина" в качестве Т-клеток, несущих вектор экспрессии IL-7/CCL19-CAR против человеческого мезотелина, или "Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина" в качестве Т-клеток, несущих вектор Conv. CAR против человеческого мезотелина. Т-клетки, экспрессирующие CAR против человеческого мезотелина-IL-7/CCL19, содержат экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR против человеческого мезотелина, экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7, и экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19. Т-клетки, экспрессирующие CAR против человеческого мезотелина, содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR против человеческого мезотелина, и не содержали ни экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7, ни экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19. Одновременно получают "Т-клетки, не экспрессирующие CAR, IL-7 и CCL19" (нетрансфицированные клетки: отсутствие инфекции) в качестве CAR-отрицательных клеточных контролей путем активации моноклональных клеток периферической крови, полученных от того же здорового донора по описанному выше способу, но без заражения клеток ретровирусом.

Описанный выше ретровирусный вектор используют для введения в Т-клетки нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR против человеческого мезотелина, нуклеиновой кислоты, кодирующей IL-7, и нуклеиновой кислоты, кодирующей CCL19. Следовательно, если Т-клетки, несущие указанные нуклеиновые кислоты, пролиферируют в результате культивирования, некоторые из Т-клеток содержат ретровирусный вектор в цитоплазме. Однако в большинстве указанных Т-клеток нуклеиновая кислота, кодирующая CAR против человеческого мезотелина, нуклеиновая кислота, кодирующая IL-7, и нуклеиновая кислота, кодирующая CCL19, интегрируются в геном. Если нуклеиновая кислота, кодирующая CAR против человеческого мезотелина, нуклеиновая кислота, кодирующая IL-7, и нуклеиновая кислота, кодирующая CCL19, интегрируются в геном указанных Т-клеток, CAR против человеческого мезотелина, IL-7 и CCL19 экспрессируются из экзогенной рекомбинантной конструкции, введенной в клетки.

Пример 2. Измерение экспрессии CAR методом проточной цитометрии.

Анализ методом проточной цитометрии.

Уровень экспрессии CAR, распознающего мезотелин в качестве антигена, анализируют методом проточной цитометрии. Полученные Т-клетки, экспрессирующие CAR против человеческого мезотели-

на-IL-7/CCL19, окрашивают посредством реакции с рекомбинантным человеческим мезотелином (содержащим 6-His на С-конце) (произведенным BioLegend, Inc.), фикоэритрином (PE), меченным моноклональным антителом против 6-His (произведенным Abcam plc) и моноклональным антителом против CD8, меченным аллофикоцианином (APC) (произведенным Affymetrix/Thermo Fisher Scientific Inc.). Используют проточный питометр EC800 (произведенный Sony Corp.). Данные анализируют с помощью программного обеспечения FlowJo (произведенного Tree Star, Inc.).

Результаты.

Результаты анализа методом проточной цитометрии Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина-IL-7/CCL19, содержащий VH07(15)VL07 (экспрессируемый посредством сигнального пептида Т), VH07(15)VL07 (экспрессируемый посредством сигнального пептида Р) или VH36(15)VL36 в качестве участка scFv, показаны на фиг. 2. На фиг. 2 на горизонтальной оси каждого графика отмечена экспрессия CAR, а на вертикальной оси отмечена экспрессия CD8. Как показано на фиг. 2, подтверждено, что все три типа Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина-IL-7/CCL19, экспрессируют CAR на высоком уровне по сравнению с Т-клетками, не экспрессирующими CAR, IL-7 и CCL19 (не инфицированными).

Результаты анализа методом проточной цитометрии Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина-IL-7/CCL19, содержащий VH07(15)VL07, VL07(15)VH07, VH07(25)VL07 или VL07(25)VH07 в качестве участка scFv, показана на фиг. 3. На фиг. 3 на абсциссе каждого графика отмечена экспрессия CAR, а на ординате - экспрессия CD8. На фиг. 3(a) показаны результаты, полученные с использованием Т-клеток, не экспрессирующих CAR, IL-7 и CCL19 (не инфицированных), а на фиг. 3(b-e) показаны результаты, полученные с использованием Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина-IL-7/CCL19, содержащих каждый участок scFv. Числовые значения на чертеже обозначают процент каждой популяции. Как показано на фиг. 3(b-e), экспрессия CAR подтверждена в Т-клетках, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина-IL-7/CCL19.

Пример 3. Экспрессия мезотелина каждой опухолевой клеткой.

Анализ методом проточной цитометрии.

Подтверждают уровень экспрессии мезотелина в каждой линии опухолевых клеток, чтобы убедиться, что линии опухолевых клеток экспрессируют мезотелин. Клеточные линии злокачественной мезотелиомы ACC-MESO-1, Y-MESO8A, NCI-H2052, NCI-H226 и MSTO211H и клеточную линию рака почки A498 окрашивают коммерчески доступным антителом против мезотелина (номер по каталогу FAB32652P, R&D Systems, Inc.), меченным PE. Экспрессию мезотелина в каждой опухолевой клетке измеряют методом проточной цитометрии. Окрашивание PE-меченым антителом против человеческого мезотелина проводят в образце массой 3 мкг. Используют проточный питометр EC800 (произведенный Sony Corp.). Данные анализируют с помощью программного обеспечения FlowJo (производства Tree Star, Inc.).

Результаты.

Результаты показаны на фиг. 4. Экспрессия мезотелина подтверждена в линиях клеток злокачественной мезотелиомы ACC-MESO-1, Y-MESO8A, NCI-H2052, NCI-H226 и MSTO211H. С другой стороны, экспрессия мезотелина не подтверждена в линии клеток рака почки A498.

Пример 4. Тест на цитотоксичность - 1.

Тест с совместным культивированием.

Число Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина-IL-7/CCL19 (участок scFv: VH07(15)VL07 или VH07(25)VL07), используемых в качестве эффектора, доводят до соотношения эффектор:опухолевые клетки 1:1, 1:3 или 1:5 (1:5: только для измерения и анализа IFN- γ), используя линию мезотелин-положительных опухолевых клеток (ACC-MESO-1 или NCI-H2052) или линию мезотелин-отрицательных опухолевых клеток (A498), на культуральной планшете и затем совместно культивируют в инкубаторе при 37°C. Эта совместная культура показана на фиг. 5. В качестве культурального раствора используют RPMI, содержащий 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS), 1% пенициллина-стрептомицина (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 50 мкМ 2-ME (Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc.) и 25 мМ HEPES (Sigma-Aldrich Co. LLC). Опухолевую клеточную линию, выжившую спустя 2 дня после начала совместного культивирования, измеряют методом проточной цитометрии, а IFN- γ , продуцируемый в культуральный супернатант, измеряют с использованием коммерчески доступного набора ELISA для IFN- γ (BioLegend, Inc.). Результаты измерения линии опухолевых клеток, выживших через 2 дня после начала совместного культивирования, с помощью проточной цитометрии, показаны на фиг. 6A-6C, а результаты измерения продуцированного IFN- γ после совместного культивирования показаны на фиг. 7A-7C. Т-клетки, не экспрессирующие CAR, IL-7 и CCL19 (неинфицированные), используют в качестве контроля при анализе Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина-IL-7/CCL19. Для проведения проточной цитометрии мертвые клетки отделяют от живых клеток путем окрашивания Zombie Yellow (BioLegend, Inc.), а Т-клетки окрашивают PE-меченным моноклональным антителом против CD45 (BioLegend, Inc.). Используют проточный питометр BD LSRFortessa X-20 (BD Biosciences). Данные анализируют с помощью программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc.).

Результаты.

На фиг. 6А-6С путем совместного культивирования контрольных Т-клеток, не экспрессирующих CAR, IL-7 и CCL19 (неинфицированных), с каждой опухолевой клеткой-мишенью показано, что все опухолевые клетки-мишени пролиферируют на том же уровне, что и в лунках, где присутствует только опухоль. С другой стороны, в случае Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина-IL-7/CCL19, опухолевые клетки-мишени пролиферируют, как и в лунках, содержащих только опухоль, что показано путем совместного культивирования с мезотелин-отрицательными клетками-мишенями (A498: фиг. 6С), тогда как в совместной культуре с мезотелин-положительными опухолевыми клетками (ACC-MESO-1: фиг. 6А, NCI-H2052: фиг. 6В) наблюдается явно уменьшенное число опухолевых клеток по сравнению с лунками, содержащими только мезотелин-положительные опухолевые клетки, и лунками, содержащими совместную культуру с контрольными клетками. Таким образом, подтверждено, что Т-клетки, экспрессирующие CAR против человеческого мезотелина-IL-7/CCL19, повреждают опухолевые клетки в антигенспецифической манере.

Как показано на фиг. 7А-7С, ИФА анализ IFN- γ в супернатанте после совместного культивирования также подтверждает заметную продукцию IFN- γ только в супернатанте совместного культивирования Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина-IL-7/CCL19, с мезотелин-положительными опухолевыми клетками (ACC-MESO-1: фиг. 7А, NCI-H2052: фиг. 7В).

Пример 5. Тест на цитотоксичность - 2.

Тест с совместным культивированием.

По способу, описанному в примере 4, число Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина-IL-7/CCL19 (участок scFv: VHMO(15)VLMO, VLMO(15)VHMO, VHMO(25)VLMO или VLMO(25)VHMO), или "Т-клеток, не экспрессирующих CAR, IL-7 и CCL19" (нетрансфицированные клетки: отсутствие инфекции), доводят до соотношения эффектор:опухолевые клетки 1:1 или 1:3, используя линию мезотелин-положительных опухолевых клеток PAN02 или линию мезотелин-отрицательных опухолевых клеток, на планшете для культивирования и затем совместно культивируют при 37°C в инкубаторе. Результаты измерения лейкоцитов или линии опухолевых клеток PAN02, выживших через 3 дня или 5 дней после начала совместного культивирования, методом проточной цитометрии, показаны на фиг. 8, а результаты измерения продуцированного IFN- γ после совместного культивирования показаны на фиг. 9. Т-клетки, экспрессирующие CAR против человеческого мезотелина, IL-7 и CCL19, используемые в данном примере и в разделе "Терапевтический эффект на модели опухоли" из примера 5, описанного ниже, получают по способу примера 1 (далее их называют "мышинные Т-клетки, экспрессирующие CAR против человеческого мезотелина-мышинный IL-7/мышинный CCL19") с использованием в качестве ретровирусного вектора экспрессии rMSGV1 ретровирусного вектора экспрессии rMSGV1, полученного путем вставки мышинный IL-7-F2A-мышинный CCL19-F2A-HSV-TK вместо человеческого IL-7-F2A-человеческий CCL19-F2A-HSV-TK и трансмембранного участка мышинного CD8 и внутриклеточного мышинного сигнального участка CD28-4-1BB-CD3 ζ вместо трансмембранного участка человеческого CD8 и внутриклеточного сигнального участка человеческого CD28-4-1BB-CD3 ζ , с использованием в качестве Т-клеток мышинных Т-клеток, полученных из селезенки и лимфоцитов. "Т-клетки, не экспрессирующие CAR, IL-7 и CCL19" (нетрансфицированные клетки: отсутствие инфекции), используемые в данном примере, получают с использованием в качестве Т-клеток мышинных Т-клеток, полученных из селезенки и лимфоцитов.

Результаты.

Как показано на фиг. 8, подтверждено, что мышинные Т-клетки, экспрессирующие CAR против человеческого мезотелина-мышинный IL-7/мышинный CCL19, способны повреждать опухолевые клетки. Как показано на фиг. 9, ИФА IFN- γ в супернатанте после совместного культивирования также подтверждает заметную продукцию IFN- γ только в супернатанте после совместного культивирования мышинных Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина-мышинный IL-7/мышинный CCL19, с линией опухолевых клеток PAN02.

Пример 6. Терапевтический эффект на модели опухоли - 1.

Введение мышинной модели опухоли Т-клеток, экспрессирующих CAR против мышинного мезотелина-IL-7/CCL19.

Всем мышам C57BL/6 в возрасте от 7 до 10 недель (приобретенным у Japan SLC, Inc.) подкожно инокулируют 5×10^5 клеток линии рака поджелудочной железы PAN02. На 7-й день после инокуляции мышам внутрибрюшинно вводят противораковое средство циклофосфамид (CPA, 100 мг/кг). На 10-й день внутривенно вводят 1×10^6 мышинных Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина-мышинный IL-7/мышинный CCL19 (участок scFv: VHMO(15)VLMO, VLMO(15)VHMO, VHMO(25)VLMO или VLMO(25)VHMO), или "мышинных Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина", полученных в примере 5. Результаты выживаемости мышей, несущих VHMO(15)VLMO или VHMO(25)VLMO, показаны на фиг. 10, а результаты объемов опухолей в присутствии VHMO(15)VLMO, VLMO(15)VHMO, VHMO(25)VLMO или VLMO(25)VHMO показаны на фиг. 11. На фиг. 10 на абсциссе отмечают число дней после подкожной инокуляции PAN02 (день, когда PAN02 под-

кожно вводят мышам, считают за день 0), а на ординате отмечают коэффициент выживания. На фиг. 11 абсцисса показывает число дней после подкожной инокуляции PAN02, а ордината показывает объем опухоли (большая ось опухоли $\times$ (малая ось опухоли)²/2 (мм³)). Группа "с отсутствием лечения" получает только CPA, группа "Conv." получает CPA, а затем мышинные Т-клетки, экспрессирующие CAR против человеческого мезотелина, и группа "7 $\times$ 19" получает CPA, а затем мышинные Т-клетки, экспрессирующие CAR против человеческого мезотелина-мышинный IL-7/мышинный CCL19. "Мышинные Т-клетки, экспрессирующие CAR против человеческого мезотелина" получают по способу, описанному в примере 1, за исключением того, что в способе получения "Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина", описанном в примере 1, ретровирусный вектор экспрессии rMSGV1, полученный в результате вставки HSV-TK вместо человеческого IL-7-F2A-человеческого CCL19-F2A-HSV-TK и трансмембранного участка мышинового CD8 и внутриклеточного сигнального мышинового участка CD28-4-1BB-CD3 ζ вместо человеческого трансмембранного участка CD8 и внутриклеточного сигнального участка человеческого CD28-4-1BB-CD3 ζ используют в качестве ретровирусного вектора экспрессии rMSGV1, а в качестве Т-клеток используют мышинные Т-клетки, полученные из селезенки и лимфоцитов.

Результаты.

Как показано на фиг. 10, обнаружено, что введение Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина-IL-7/CCL19 по настоящему изобретению, значительно повышает выживаемость. Как показано на фиг. 11, обнаружено, что введение Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина-IL-7/CCL19, очевидным образом подавляет рост опухоли. Данный результат демонстрирует, что Т-клетки, экспрессирующие CAR против человеческого мезотелина-IL-7/CCL19, обладают превосходной противоопухолевой активностью на мышинной модели опухоли.

Пример 7. Терапевтический эффект на модели опухоли - 2.

Обнаружено, что Т-клетки, экспрессирующие CAR против человеческого мезотелина-IL-7/CCL19, обладают превосходной противоопухолевой активностью. Чтобы подтвердить более длительные противоопухолевые эффекты и противоопухолевое действие на рак, отличный от рака поджелудочной железы, линию клеток злокачественной мезотелиомы плевры вводят мышам с ослабленным иммунитетом для развития опухоли. Затем регистрируют наличие или отсутствия рецидива опухоли в течение 143 дней после введения или в отсутствие введения Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина-IL-7/CCL19. В данном примере используют описанные ниже "способ получения линии ACC-MESO-1-GFP-Luc" и "способ активации Т-клеток".

Получение линии ACC-MESO-1-GFP-Luc.

Ген зеленого флуоресцентного белка-люциферазы (GFP-Luc) вводят с использованием лентивируса в линию клеток злокачественной мезотелиомы человека ACC-MESO-1, которая представляет собой линию клеток мезотелин-положительной опухоли, любезно предоставленную доктором Йошитака Сэкидо из Исследовательского института Онкологического центра Айти.

В 0 день ACC-MESO-1 высевают в количестве 1×10^3 клеток/лунку в 96-луночный планшет. В качестве среды используют RPMI1640 (Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc.), содержащую 10% FBS. В 1 день начинают трансдукцию путем добавления RediFect Red-FLuc-GFP (PerkinElmer, Inc.) частиц лентивируса для получения светоизлучающих клеток, при MOI 100. В данной связи в среду добавляют гексаметрин-бромид (Sigma-Aldrich Co., LLC) в концентрации 4 мкг/мл (конечная концентрация), чтобы повысить эффективность трансфекции. Через 24 ч после добавления вируса (во 2 день) среду, содержащую вирус, удаляют с последующей заменой среды. Культивирование продолжают и затем сортируют только клетки, экспрессирующие GFP, с использованием SH800 (Sony Corp.) с получением ACC-MESO-1, экспрессирующих GFP, т.е. "ACC-MESO-1-GFP-Luc".

Получение Т-клетки, экспрессирующей CAR против человеческого мезотелина-IL-7-CCL19, и Т-клетки, экспрессирующей CAR против человеческого мезотелина

В данном примере 7 вектор экспрессии IL-7/CCL19- CAR против человеческого мезотелина (содержащий участок scFv, замененный фрагментом VL07(15)VL07, и сигнальный пептид Т, описанный в SEQ ID NO: 11, в качестве сигнального пептида), или Conv. вектор, экспрессирующий CAR против человеческого мезотелина (содержащий участок scFv, замененный фрагментом VL07(15)VL07, и сигнальный пептид Т, описанный в SEQ ID NO: 11, в качестве сигнального пептида), полученный в примере 1.

Активация Т-клетки.

В день 0 начинают культивирование 2×10^6 мононуклеарных клеток периферической крови, собранных у здорового донора, в присутствии IL-2 (PeproTech, Inc.) в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ на 6-луночном планшете для культивирования клеток, на котором иммобилизованы RetroNectin (Takara Bio Inc.), 25 мкг/мл, и моноклональное антитело против человеческого CD3 (Invitrogen Corp.), 5 мкг/мл. В качестве культурального раствора используют OpTmizer CTS (Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc.), содержащий 2 mM L-глутамин (Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc.), 1% пенициллина-стрептомицина (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) и 2,5 мкг/мл фунгизона (Bristol-Myers Squibb Company). Клетки культивируют в течение 3 дней. На 3-й день морфологическое изменение Т-клеток, вызванное активацией, подтверждают с помощью микроскопа и получают активированные Т-клетки.

Наблюдение рецидива опухоли.

В 0 день сначала самкам мышей NSG с ослабленным иммунитетом возрастом 8-недель внутривенно вводят ACC-MESO-1-GFP-Luc в количестве 2×10^6 клеток/мышь. В 1-й день приживление опухоли в плевральной полости подтверждают с использованием системы визуализации *in vivo* (IVIS). В 1 день Т-клетки, экспрессирующие CAR против человеческого мезотелина, и Т-клетки, экспрессирующие CAR против человеческого мезотелина-IL-7-CCL19 (участок scFv: VH07(15)VL07), получают по способу примера 1 и затем замораживают, а Т-клетки, активированные описанным выше способом, оттаивают. Т-клетки, экспрессирующие CAR против человеческого мезотелина, и Т-клетки, экспрессирующие CAR против человеческого мезотелина-IL-7-CCL19, характеризуются степенью экспрессии CAR 49,6 и 32,5% соответственно. Следовательно, активированные Т-клетки добавляют к Т-клеткам, экспрессирующим CAR против человеческого мезотелина, чтобы уравнивать степени экспрессии CAR. Затем животных распределяют в группу, получающую 1×10^5 Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина (N=5), и в группу, получающую 1×10^5 Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина-IL-7-CCL19 (N=5). Введение Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина, и Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина-IL-7-CCL19, проводят путем внутривенного введения через хвостовую вену. На 3-й и последующие дни измеряют интенсивность флуоресценции опухоли (общий поток (фотонов/с)) с использованием IVIS. Результаты показаны на фиг. 12А и 12В. Зависимость выживаемости мышей от числа дней после введения показана в виде графика на фиг. 13, а зависимость общего количества флуоресценции (фотонов/с) от числа дней после введения показана в виде графика на фиг. 14. На фиг. 12А, 12В, 13 и 14 мыши, которые получают Т-клетки, экспрессирующие CAR против человеческого мезотелина-IL-7-CCL19, показаны как "7×19 CAR-T", а мыши, которые получают Т-клетки, экспрессирующие CAR против человеческого мезотелина, показаны как "стандартные CAR-T". В этом примере 7 влияние эндогенных Т-клеток реципиентов исключается, поскольку в качестве реципиентов используют мышей NSG с ослабленным иммунитетом, характеризующихся дефицитом эндогенных Т-клеток. Таким образом, оценивают эффекты именно введенных Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого мезотелина-IL-7-CCL19.

Как показано на фиг. 12А, 12В, 13 и 14, интенсивность флуоресценции опухоли редко наблюдается как у 7×19 CAR-T, так и у стандартных CAR-T на 21-й день. Флуоресценция опухоли не наблюдается у 7×19 CAR-T вплоть до 143 дня, что подтверждает полное подавление рецидива. С другой стороны, флуоресценция опухоли наблюдается у стандартных CAR-T примерно с 45 дня, причем интенсивность флуоресценции опухоли повышается на 115 день: одна мышь умерла на 129 день, а остальные четыре мыши умерли на 143 день. Данный результат свидетельствует о том, что введенные Т-клетки, экспрессирующие CAR-IL-7-CCL19 обладают цитотоксической активностью не только против рака поджелудочной железы, но и против раковых клеток (например, клеток злокачественной плевральной мезотелиомы человека), экспрессирующих человеческий мезотелин, и оказывают долгосрочные противоопухолевые эффекты.

Настоящая заявка основана на патентной заявке Японии № 2017-247109, поданной 24 декабря 2017 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммунокомпетентная клетка, которая экспрессирует химерный рецептор антигена (CAR), специфически распознающий человеческий мезотелин, интерлейкин 7 (IL-7) и лиганд 19 хемокина (мотив C-C) (CCL19),

где CAR содержит одноцепочечное антитело, трансмембранный участок и сигнальный участок, который индуцирует активацию иммунокомпетентной клетки,

где одноцепочечное антитело в CAR представляет собой (1-1) одноцепочечное антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи, который содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 14, и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 15, и переменный участок легкой цепи, который содержит CDR1 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 16, CDR2 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 17, и CDR3 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 18.

2. Иммунокомпетентная клетка по п.1, где иммунокомпетентная клетка представляет собой иммунокомпетентную клетку, выделенную из живого организма.

3. Иммунокомпетентная клетка по п.1 или 2, где иммунокомпетентная клетка содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, специфически распознающий человеческий мезотелин, экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7, и экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19.

4. Иммунокомпетентная клетка по п.3, где экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая IL-7, и эк-

зогенная нуклеиновая кислота, кодирующая CCL19, представляют собой экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую человеческий IL-7, и экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую человеческий CCL19.

5. Иммунокомпетентная клетка по п.4, где экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, специфически распознающий человеческий мезотелин, экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая человеческий IL-7, и экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая человеческий CCL19, интегрируются в геном.

6. Иммунокомпетентная клетка по любому из пп.1-5, где одноцепочечное антитело, входящее в состав CAR, представляет собой одноцепочечное антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи, который состоит из аминокислотной последовательности, на 85% или более идентичной аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 1, и содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 14, и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 15, и переменный участок легкой цепи, который состоит из аминокислотной последовательности, на 85% или более идентичной аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 2, и содержит CDR1 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 19, CDR2 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 17, и CDR3 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 18.

7. Иммунокомпетентная клетка по любому из пп.1-6, где одноцепочечное антитело, входящее в состав CAR, представляет собой (1-3) одноцепочечное антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 1, и переменный участок легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 2.

8. Иммунокомпетентная клетка по любому из пп.1-7, где трансмембранный участок CAR содержит аминокислотную последовательность, на 85% или более идентичную аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 7, и содержит полипептид, активность которого эквивалентна активности аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 7.

9. Иммунокомпетентная клетка по любому из пп.1-8, где сигнальный участок, который индуцирует активацию иммунокомпетентной клетки в CAR, содержит

(i) полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, обладающую 85% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, описанной в SEQ ID NO: 9, и имеет активность, эквивалентную активности аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 9, или полипептид, который состоит из аминокислотной последовательности, полученной из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 9, путем делеции, замены, вставки и/или добавления одной или нескольких аминокислот, и обладает активностью, эквивалентной активности аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 9; и

(ii) полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, обладающую 85% или более идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, описанной в SEQ ID NO: 10, и имеет активность, эквивалентную активности аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 10, или полипептид, который состоит из аминокислотной последовательности, полученной из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 10, путем делеции, замены, вставки и/или добавления одной или нескольких аминокислот, и обладает активностью, эквивалентной активности аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 10.

10. Иммунокомпетентная клетка по п.9, где сигнальный участок, который индуцирует активацию иммунокомпетентной клетки, входящий в состав CAR, дополнительно содержит аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 8.

11. Иммунокомпетентная клетка по любому из пп.1-10, где переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи соединены пептидным линкером, последовательность которого содержит от 2 до 30 аминокислот.

12. Иммунокомпетентная клетка по п.11, где пептидный линкер состоит из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27.

13. Иммунокомпетентная клетка по любому из пп.1-12, где переменный участок легкой цепи расположен на стороне С-конца переменной области тяжелой цепи.

14. Иммунокомпетентная клетка по любому из пп.6-13, где одноцепочечное антитело, входящее в состав CAR, представляет собой одноцепочечное антитело, последовательно содержащее переменный участок тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 1, пептидный линкер, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 26, и переменный участок легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 2.

15. Иммунокомпетентная клетка по любому из пп.1-14, где сигнальный участок, который индуцирует активацию иммунокомпетентной клетки, входящий в состав CAR, содержит полипептид внутриклеточного участка 4-1BB, и полипептид внутриклеточного участка CD3ζ.

16. Иммунокомпетентная клетка по любому из пп.15, где сигнальный участок, который индуцирует активацию иммунокомпетентной клетки, входящий в состав CAR, дополнительно содержит полипептид внутриклеточного участка CD28.

17. Иммунокомпетентная клетка по любому из пп.1-16, где иммунокомпетентная клетка представляет собой Т-клетку.

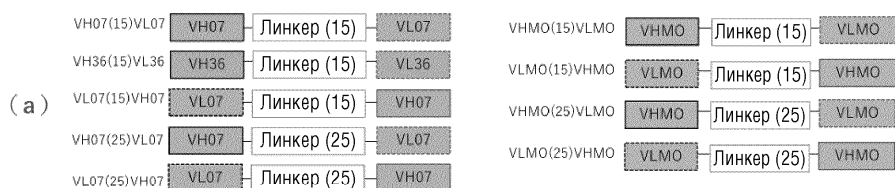
18. Иммунокомпетентная клетка по любому из пп.1-17, где иммунокомпетентная клетка представляет собой Т-клетку, полученную из организма человека или выделенную из организма человека.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая иммунокомпетентную клетку по любому из пп.1-18 и фармацевтически приемлемую добавку.

20. Применение фармацевтической композиции по п.19 для лечения рака.

21. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный рецептор антигена (CAR), специфически распознающий человеческий мезотелин, нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19, где CAR содержит одноцепочечное антитело, трансмембранный участок и сигнальный участок, который индуцирует активацию иммунокомпетентной клетки, где одноцепочечное антитело в CAR представляет собой (1-1) одноцепочечное антитело, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 14, и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 15, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит CDR1 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 16, CDR2 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 17, и CDR3 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 18.

22. Способ получения иммунокомпетентной клетки, которая экспрессирует химерный рецептор антигена (CAR), специфически распознающий человеческий мезотелин, IL-7 и CCL19, включающий введение в иммунокомпетентную клетку нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, специфически распознающий человеческий мезотелин, нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-7, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19, где CAR содержит одноцепочечное антитело, трансмембранный участок и сигнальный участок, который индуцирует активацию иммунокомпетентной клетки, где одноцепочечное антитело в CAR представляет собой (1-1) одноцепочечное антитело, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 14, и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 15, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит CDR1 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 16, CDR2 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 17, и CDR3 легкой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в SEQ ID NO: 18.



Вариабельный участок тяжелой цепи (VH)

VH07	SEQ ID NO: 1	QVQLQSGPGLVTPSQTLSLTCAISGDSVSSNSATWNWIRGSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRMSINPDTSKNQFSLQNSVTPEDTAVYYCARGMNTYYGMDVWGGQTTVTYSSGILGS
VH36	SEQ ID NO: 3	QVQLQSGPGLVTPSQTLSLTCAISGDSVSSNSATWNWIRGSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRMSINPDTSKNQFSLQNSVTPEDTAVYYCARGMNTYYGMDVWGGQTTVTYSSGILL
VHMO	SEQ ID NO: 5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYFTFTQNYINWVRQAPGQGLEWMGIINPTKGWTLTAQKFKQGRVTMTDTSISSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWHHGTWIFDYWGQGTTLVTVSS

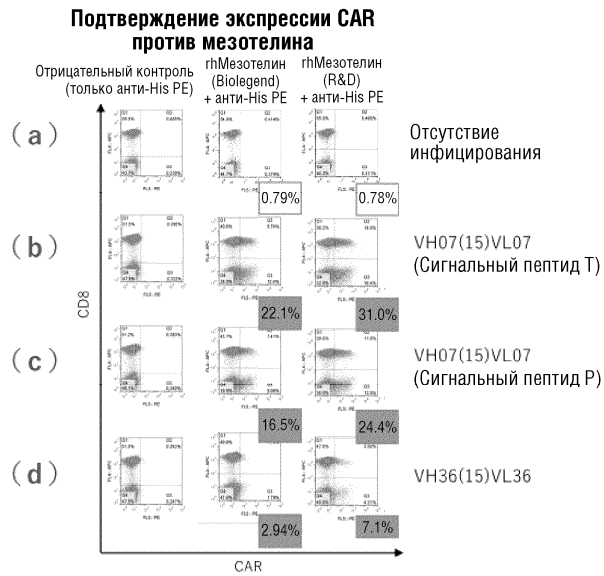
Вариабельный участок легкой цепи (VL)

VL07	SEQ ID NO: 2	QPVLTQSSSLASPGASASLTCTLRSGINVGPRYRYWYQKQKPGSPQVLLNYKSDSDKQKQSGGVPSRFSQSKDASANAQVLLISGLRSEDEADYYCMWHSAAVFGGQTQLTVLS
VL36	SEQ ID NO: 4	QPVLTQSSSLASPGASASLTCTLRSGINVGPRYRYWYQKQKPGSPQVLLNYKSDSDKQKQSGGVPSRFSQSKDASANAQVLLISGLRSEDEADYYCMWHSAAVFGGQTQLTVLS
VLMO	SEQ ID NO: 6	DIVLTQPPSVSGAPGQGRVITSCSGSSNIGSNVSWYQQQLPGTAPKLLITNDNQRPSPGVDRFSQSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYGSTYDRRTFVFGGKTLTVL

Линкер

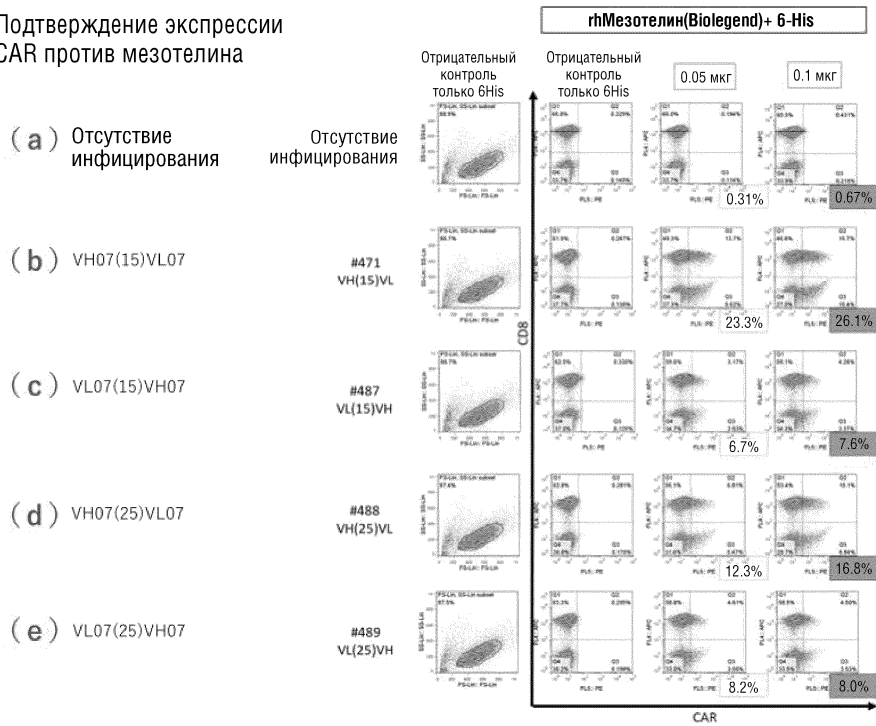
(15)	SEQ ID NO: 26	GGGSGGGSGGGSGG
(25)	SEQ ID NO: 27	SSADDAKDAKDDAKDDAKKDG

Фиг. 1

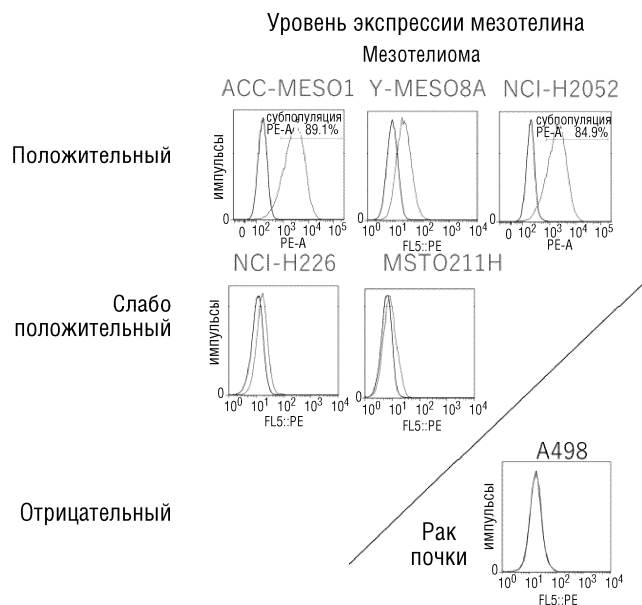


Фиг. 2

Подтверждение экспрессии CAR против мезотелина



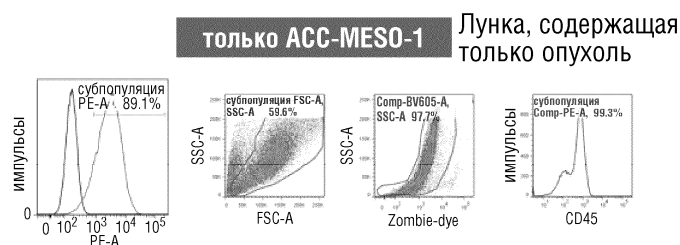
Фиг. 3



Фиг. 4

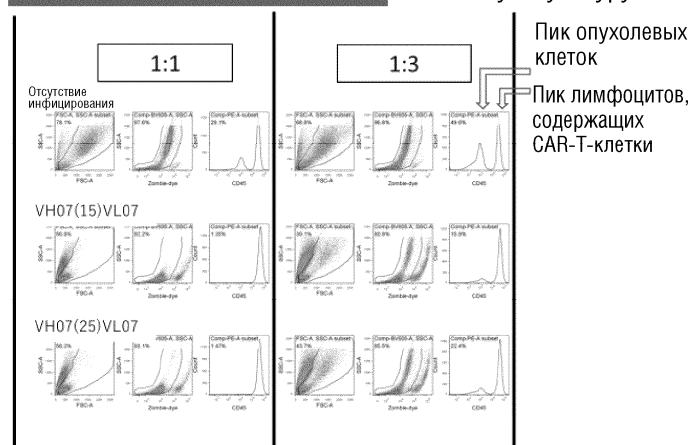


Фиг. 5

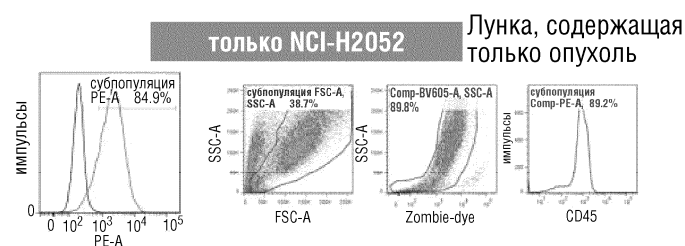


Совместное культивирование по сравнению с ACC-MESO-1

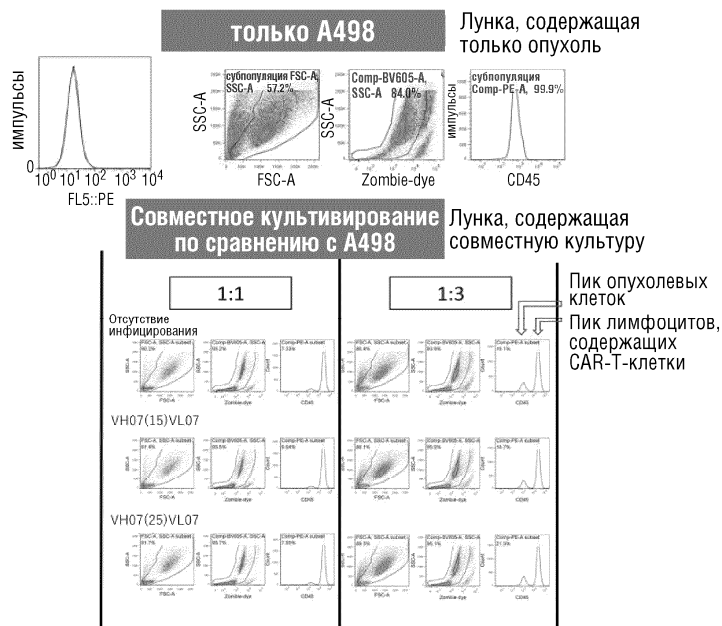
Лунка, содержащая совместную культуру



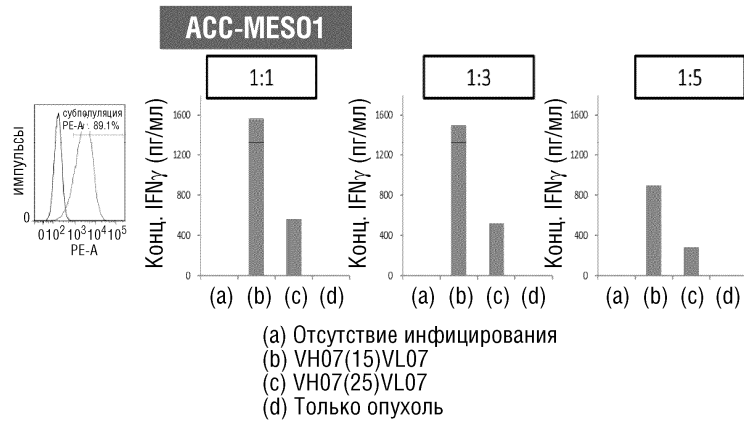
Фиг. 6А



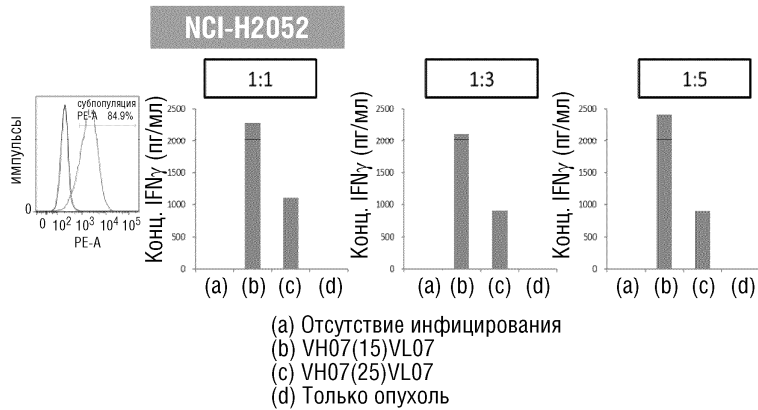
Фиг. 6B



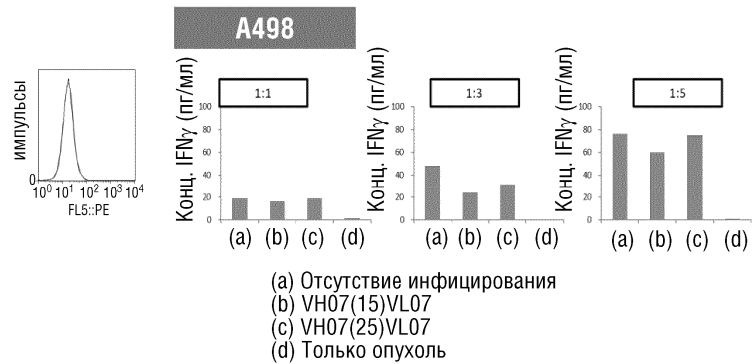
Фиг. 6C



Фиг. 7А

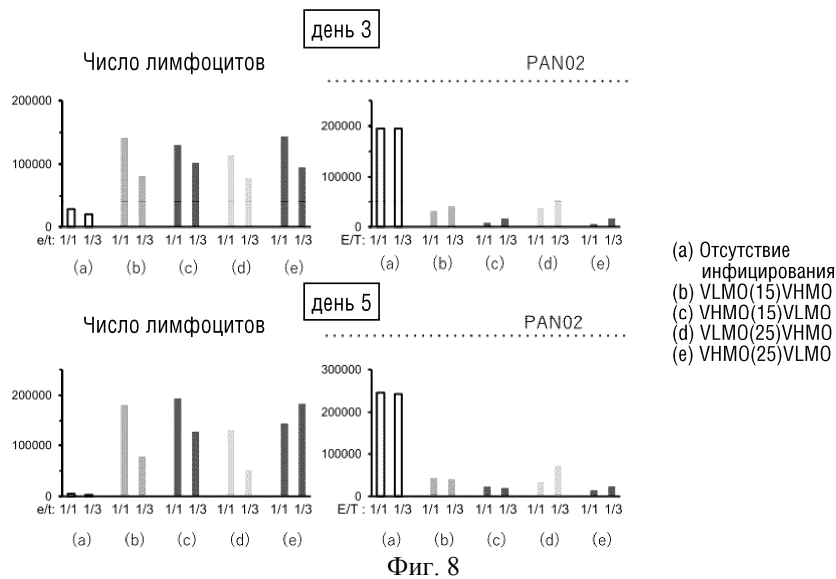


Фиг. 7В

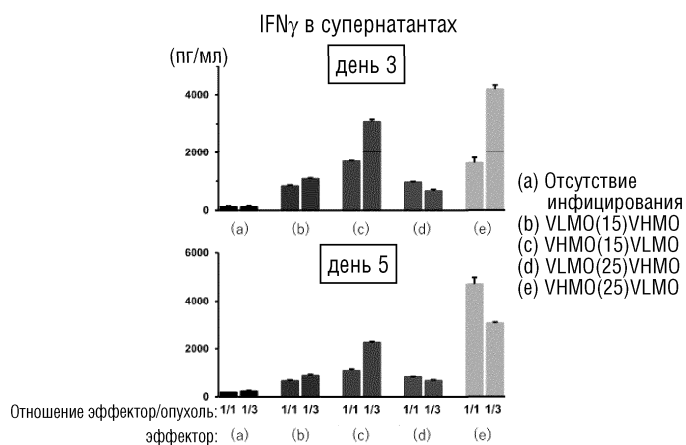


Фиг. 7С

Эксперимент с совместным культивированием

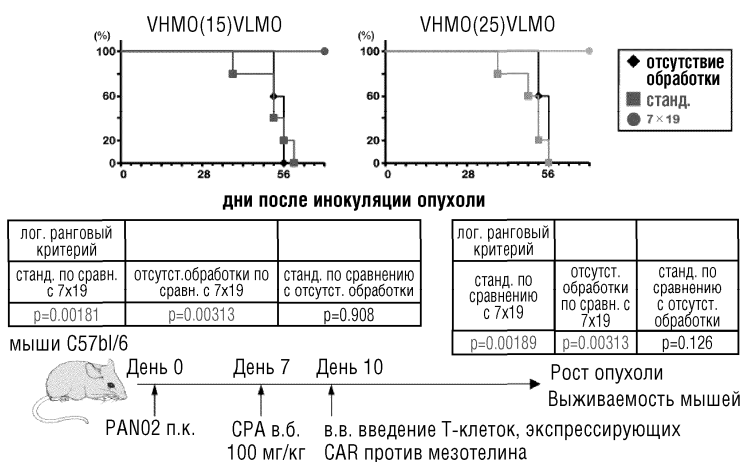


Фиг. 8

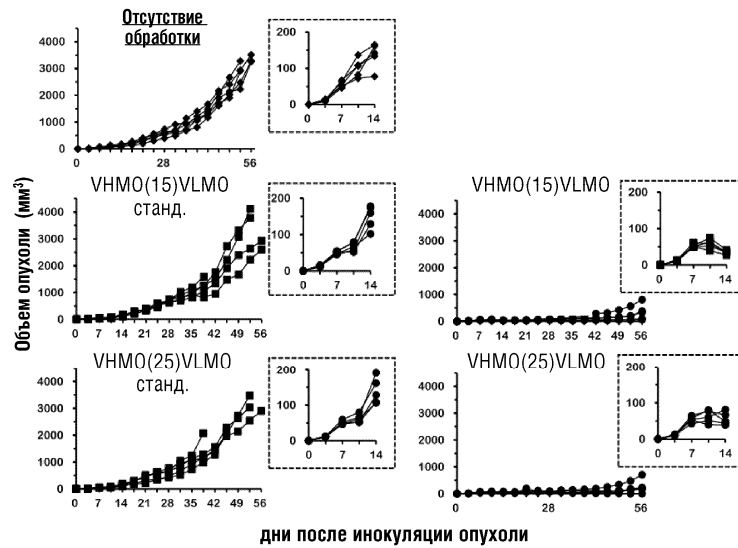


Фиг. 9

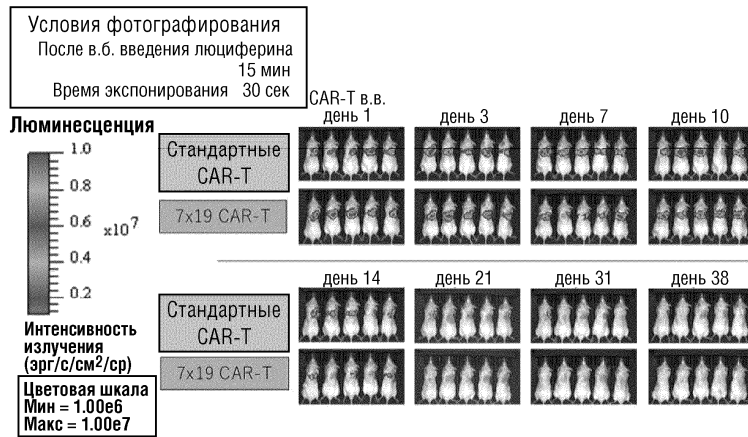
Терапевтические эффекты 7x19 CAR-T-клеток у плановой мышинной модели солидной опухоли



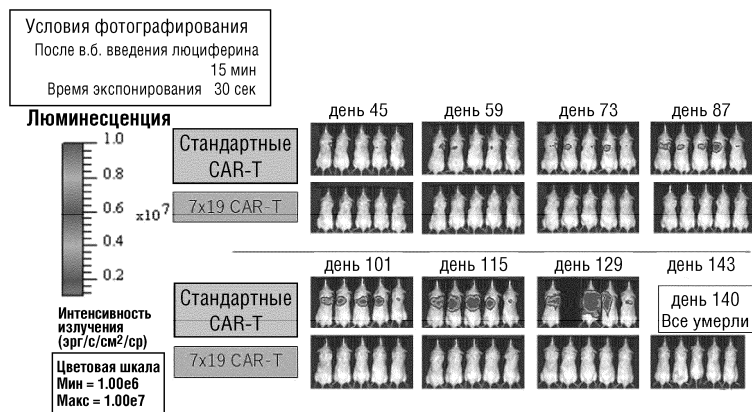
Фиг. 10



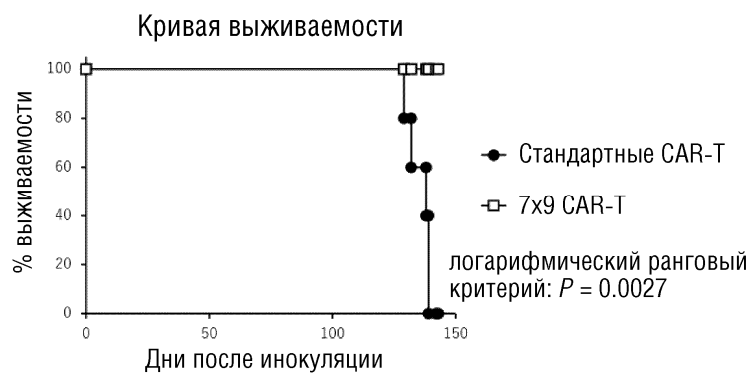
Фиг. 11



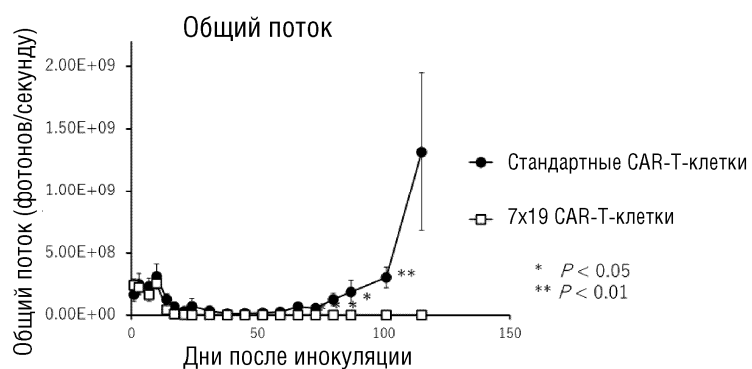
Фиг. 12А



Фиг. 12В



Фиг. 13



Фиг. 14

