



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК
C12N 9/12 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 5/22 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 5/0636 (2020.02); C12N 9/12 (2020.02); C12Y 207/10001 (2020.02); C07K 14/71 (2020.02); A61K 35/17 (2020.02); A61K 48/0091 (2020.02); A61K 2039/5158 (2020.02); A61K 2039/5156 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2016143384, 08.04.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.04.2015Дата регистрации:
04.08.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

10.04.2014 US 61/977,751;
30.04.2014 US 61/986,479;
02.10.2014 US 62/058,973;
05.12.2014 US 62/088,363;
09.12.2014 US 62/089,730;
11.12.2014 US 62/090,845

(43) Дата публикации заявки: 11.05.2018 Бюл. № 14

(45) Опубликовано: 04.08.2020 Бюл. № 22

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 10.11.2016(86) Заявка РСТ:
US 2015/024895 (08.04.2015)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2015/157399 (15.10.2015)Адрес для переписки:
190000, Санкт-Петербург, ВОХ-1125,
"ПАТЕНТИКА"

(72) Автор(ы):

ДЖЕНСЕН Майкл К. (US),
ДЖОНСОН Адам (US)

(73) Патентообладатель(и):

СИЭТЛ ЧИЛДРЕН'С ХОСПИТАЛ (ДБА
СИЭТЛ ЧИЛДРЕН'С РЕСЕРЧ
ИНСТИТЬЮТ) (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2011056894, 12.05.2011. WANG
X. et al., A transgene-encoded cell surface
polypeptide for selection, in vivo tracking, and
ablation of engineered cells, Blood, 2011, V. 118,
N. 5, p.1255-1263. HUDECEK M. et al. Receptor
Affinity and Extracellular Domain Modifications
Affect Tumor Recognition by ROR1-Specific
Chimeric Antigen Receptor T Cells, (см. прод.)

(54) ТРАНСГЕННЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТКИ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к полипептиду для мечения клетки, и может быть использовано в медицине. Полученный полипептид, содержащий

внеклеточный домен полипептида HER2, может быть использован для отбора однородных продуктов в генетической терапии. 4 н. и 18 з.п. ф-лы, 9 ил., 9 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

Clinical Cancer Research, 2013, V. 19, N. 12, p.3153-3164. AERTGEERTS K. et al., Structural analysis of the mechanism of inhibition and allosteric activation of the kinase domain of HER2 protein, Journal of Biological Chemistry, 2011,

V. 286, N. 21, p.18756-18765. CHO H. S. et al., Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab, Nature, 2003, V. 421, N. 6924, p.756-760. GARRETT J. T. et al., Novel engineered trastuzumab conformational epitopes demonstrate in vitro and in vivo antitumor properties against HER-2/neu, The Journal of Immunology, 2007, V. 178, N. 11, p.7120-7131. FRANKEL A.E. et al., Characterization of diphtheria fusion proteins targeted to the human interleukin-3 receptor, Protein engineering, 2000, V. 13, N. 8, p.575-581. PAKULA A.A. et al., Genetic analysis of protein stability and function, Annual review of genetics, 1989, V. 23, N. 1, p.289-310. ЛИКАРЬ Ю. Н. и др., Использование мутированного варианта человеческой дезоксицитидинкиназы в качестве репортерного гена для оценки адаптивной Т-клеточной терапии, Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2012, V. 11, N. 2, с.23-31.

R U 2 7 2 9 1 1 2 C 2

R U 2 7 2 9 1 1 2 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 9/12 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 5/22 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 5/0636 (2020.02); *C12N 9/12* (2020.02); *C12Y 207/10001* (2020.02); *C07K 14/71* (2020.02); *A61K 35/17* (2020.02); *A61K 48/0091* (2020.02); *A61K 2039/5158* (2020.02); *A61K 2039/5156* (2020.02)

(21)(22) Application: **2016143384, 08.04.2015**

(24) Effective date for property rights:
08.04.2015

Registration date:
04.08.2020

Priority:

(30) Convention priority:
10.04.2014 US 61/977,751;
30.04.2014 US 61/986,479;
02.10.2014 US 62/058,973;
05.12.2014 US 62/088,363;
09.12.2014 US 62/089,730;
11.12.2014 US 62/090,845

(43) Application published: **11.05.2018 Bull. № 14**

(45) Date of publication: **04.08.2020 Bull. № 22**

(85) Commencement of national phase: **10.11.2016**

(86) PCT application:
US 2015/024895 (08.04.2015)

(87) PCT publication:
WO 2015/157399 (15.10.2015)

Mail address:
190000, Sankt-Peterburg, BOX-1125,
"PATENTIKA"

(72) Inventor(s):

DZHENSEN Majkl K. (US),
DZHONSON Adam (US)

(73) Proprietor(s):

SIETL CHILDREN'S KHOSPITAL (DBA
SIETL CHILDREN'S RESERCH INSTITYUT
(US)

(54) **TRANSGENIC GENETIC LABELS AND METHODS OF USING**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.
SUBSTANCE: invention relates to a polypeptide for cell labeling, and can be used in medicine.
EFFECT: obtained polypeptide containing

extracellular domain of HER2 polypeptide can be used for selection of homogeneous products in genetic therapy.
22 cl, 9 dwg, 9 tbl, 1 ex

RU 2 729 112 C2

RU 2 729 112 C2

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/058973, поданной 2 октября 2014 года, предварительной заявке на патент США № 61/977751, поданной 10 апреля 2014 года, предварительной заявке на патент США № 61/986479, поданной 30 апреля 2014 года, предварительной заявке на патент США № 62/089730, поданной 9 декабря 2014 года, предварительной заявке на патент США № 62/090845, поданной 11 декабря 2014 года, и предварительной заявке на патент США № 62/088363, поданной 5 декабря 2014 года. Содержание вышеупомянутых заявок полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПЕРЕЧЕНЬ ТАБЛИЦ ИЛИ КОМПЬЮТЕРНЫХ ПРОГРАММ

[0002] Настоящая заявка подана совместно с перечнем последовательностей в электронном виде. Перечень последовательностей предоставлен в виде файла под названием SCRI-066WO-SEQUENCE_LISTING.TXT, созданного 7 апреля 2015 года, размер которого составляет 47 кбайт. Информация, представленная в электронной форме в перечне последовательностей, полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к композициям и способам, которые можно применять для детектирования экспрессии трансгена в клетках.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Экспрессия трансгенов в клетках становится важным терапевтическим подходом для лечения различных состояний. Например, при адоптивной иммунотерапии Т-лимфоциты человека модифицируют с помощью переноса гена для экспрессии химерных антигенных рецепторов (CAR), специфичных в отношении поверхностных молекул, экспрессируемых на опухолевых клетках. Химерные рецепторы представляют собой синтетические рецепторы, которые содержат внеклеточный лигандсвязывающий домен, наиболее часто одноцепочечный вариабельный фрагмент моноклонального антитела (scFv), соединенный с внутриклеточными компонентами для передачи сигналов, наиболее часто с CD3 ζ по отдельности или в комбинации с одним или более костимулирующими доменами. Другие примеры состояний, которые лечили с применением клеток, модифицированных трансгеном, включают талассемию, гемофилию, инфаркт миокарда и тяжелый комбинированный иммунодефицит. Тем не менее, основная задача заключается в получении стабильной экспрессии трансгена на уровнях, сопоставимых с таковыми для эндогенных генов. Существует потребность в выявлении композиций и способов для отбора и/или детектирования клеток, которые экспрессируют высокие уровни трансгенов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Ограничивающим фактором клинического успеха и воспроизводимости стратегий генной терапии было применение и отбор однородных продуктов. Согласно настоящему изобретению была разработана генетическая метка-кандидат и инструмент для модификации клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения генетическая метка содержит эпитоп, основанный на Her2 человека, обозначенный Her2t. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения Her2t лишен всех внутриклеточных компонентов Her2, однако содержит трансмембранный участок Her2, конформационно интактный эпитоп, который распознается моноклональным антителом, трастузумабом (герцептин), и пептид, облегчающий поверхностную экспрессию. Три варианта конструкции Her2t, один из

которых содержит полноразмерный домен IV Her2, и два содержат конформационные эпитопы, которые были разработаны на основе трехмерной структуры Her2 в комплексе с герцептином (Garrett et al J. Immunology 178:7120 (2007); Cho et al 2003), были встроены в упаковочную плазмиду для лентивирусов, ерHIV7, и охарактеризованы в клетках

5 линии СНО.

[0006] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения применение Her2t в качестве генетической метки позволяет отбирать и очищать гомогенные популяции клеточных терапевтических средств, которые экспрессируют трансген, представляющий интерес, в условиях *ex vivo*. Кроме того, Her2t можно использовать для отслеживания

10 клеточных терапевтических средств в условиях *in vivo*; например, Her2t можно применять в качестве мишени для окрашивания клеток крови, костного мозга и аспириатов спинномозговой жидкости с помощью герцептина, чтобы проверить сохранение клеточных терапевтических средств, экспрессирующих трансген, для наблюдения за ремиссией рака до терапевтической персистенции заболевания у пациента. Her2t

15 позволяет расширить терапевтический охват CAR-терапии, обеспечивая согласованную очистку клеток, экспрессирующих несколько трансгенов, при использовании с другой генетической меткой, такой как EGFRt.

[0007] Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, который по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%

20 или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 511 по 652 или с 563 по 652 последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный

25 выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her2. Нуклеиновые кислоты, кодирующие выделенный полипептид, включены в объем настоящего изобретения.

[0008] Согласно другим вариантам реализации в настоящем изобретении предложены клетки-хозяева, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую выделенный

30 полипептид, который по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 511 по 562 или с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое

35 связывается с эпитопом в домене IV Her2. Клетки-хозяева могут быть выбраны из группы, состоящей из CD8 T-клеток, CD4 T-клеток, CD4-наивных T-клеток, CD8-наивных T-клеток, CD8⁺ T-клеток центральной памяти, CD4⁺ T-клеток центральной памяти и их комбинаций. Клетки-хозяева могут дополнительно содержать вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй химерный антигенный рецептор, соединенный со второй

40 генетической меткой. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вторая нуклеиновая кислота может быть введена в те же клетки-хозяева, что и нуклеиновая кислота, кодирующая выделенный полипептид, который по меньшей мере на 95% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 511 по 562 или с

45 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения вторую нуклеиновую кислоту

вводят во вторую популяцию клеток-хозяев, и по меньшей мере две популяции клеток-хозяев объединены в единую композицию. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Т-клетки включают клетки предшественники Т-лимфоцитов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-предшественники Т-лимфоцитов представляют собой гемопоэтические стволовые клетки.

[0009] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены способы изготовления композиций, содержащих клетки-хозяева, описанные в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ включает введение в клетку-хозяина выделенной нуклеиновой кислоты, такой как нуклеиновая кислота, кодирующая выделенный полипептид, который по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена (ВКД) полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 511 по 652 или с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2; и культивирование указанных клеток-хозяев в среде, содержащей по меньшей мере один фактор роста. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает отбор клеток-хозяев для экспрессии ВКД перед или после или как перед, так и после этапа культивирования. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения способ изготовления дополнительно включает введение второй нуклеиновой кислоты, кодирующей второй химерный антигенный рецептор и вторую генетическую метку, в клетку-хозяина. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает отбор клеток-хозяев для экспрессии второй генетической метки перед или после или как перед, так и после этапа культивирования.

[00010] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ, включающий введение первой выделенной нуклеиновой кислоты, такой как нуклеиновая кислота, кодирующая выделенный полипептид, который по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 511 по 652 или с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, в первую клетку-хозяина; отбор первой популяции клеток-хозяев, которые экспрессируют ВКД, введение второй нуклеиновой кислоты, кодирующей второй химерный антигенный рецептор и вторую генетическую метку, во вторую клетку-хозяина, отбор второй популяции клеток-хозяев для экспрессии второй генетической метки, и необязательно культивирование первой и второй популяций клеток-хозяев в среде, содержащей по меньшей мере один фактор роста. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит первую и вторую популяции клеток-хозяев.

[00011] Другой аспект настоящего изобретения относится к способам и вариантам применения композиций для лечения рака, отслеживания клеток указанной композиции в условиях *in vivo* и уничтожения клеток указанной композиции в условиях *in vivo*. Согласно некоторым вариантам в настоящем изобретении предложен способ, включающий лечение пациента, страдающего раком и экспрессирующего опухолевый антиген, причем указанный способ дополнительно включает введение эффективного

количества композиции клеток-хозяев, содержащих одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих химерный антигенный рецептор, соединенный с генетической меткой. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева указанной композиции содержат первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый химерный антигенный рецептор, соединенный с первой генетической меткой, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй химерный антигенный рецептор, соединенный со второй генетической меткой. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который специфично связывается с генетической меткой. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вводят антитело, которое связывается с первой генетической меткой, вводят антитело, которое специфично связывается со второй генетической меткой, или вводят оба указанных антитела. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело метят детектируемой меткой, цитотоксическим агентом или ими обоими.

15 [00012] Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, причем указанный выделенный полипептид по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерный пептид содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб.

40 [00013] Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, причем указанный выделенный полипептид по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her, и при этом указанный внеклеточный домен полипептида Her2, содержащий последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединен с трансмембранным доменом последовательностью,

содержащей аминокислоты GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб.

[00014] Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложена выделенная нуклеиновая кислота, причем указанная выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерный пептид содержит последовательность SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her, и при этом указанный внеклеточный домен полипептида Her2, содержащего

последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединен с трансмембранным доменом последовательностью, содержащей аминокислоты GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит трансген. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансген содержит полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит антигенсвязывающий домен, спейсерный участок, трансмембранный домен и по меньшей мере один стимулирующий домен. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий трансген, соединен с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид Her2, с помощью саморасщепляющегося линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения саморасщепляющийся линкер представляет собой линкер T2A, содержащий последовательность LEGGGEGRGSLLTCG (SEQ ID NO: 26). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 (CD20CAR).

[00015] Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложена клетка-хозяин, причем указанная клетка-хозяин содержит выделенную нуклеиновую кислоту, при этом указанная выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего

последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерный пептид содержит последовательность SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her, и при этом указанный внеклеточный домен полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединен с трансмембранным доменом последовательностью, содержащей аминокислоты GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит трансген. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансген содержит полинуклеотид, кодирующий химерный

антигенный рецептор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит антигенсвязывающий домен, спейсерный участок, трансмембранный домен и по меньшей мере один стимулирующий домен. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий трансген, соединен с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид Her2, с помощью саморасщепляющегося линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения саморасщепляющийся линкер представляет собой линкер T2A, содержащий последовательность LEGGGEGRGSLLTCG (SEQ ID NO: 26). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 (CD20CAR). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из CD8 Т-клеток, CD4 Т-клеток, CD4-наивных Т-клеток, CD8-наивных Т-клеток, CD8 Т-клеток центральной памяти, CD4 Т-клеток центральной памяти и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин является аутологичной. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин является антигенспецифичной. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки-предшественники Т-лимфоцитов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой гемопоэтические стволовые клетки.

[00016] Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая клетки-хозяева, причем указанные клетки-хозяева содержат выделенную нуклеиновую кислоту, при этом указанная выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения

трансмембранный домен содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерный пептид содержит последовательность SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her, и при этом указанный внеклеточный домен полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединен с трансмембранным доменом последовательностью, содержащей аминокислоты GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит трансген. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансген содержит полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит антигенсвязывающий домен, спейсерный участок, трансмембранный домен и по меньшей мере один стимулирующий домен. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий трансген, соединен с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид Her2, с помощью саморасщепляющегося линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с

антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения саморасщепляющийся линкер представляет собой линкер T2A, содержащий последовательность

5 LEGGGEGRGSLLTCG (SEQ ID NO: 26). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам реализации

10 настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 (CD20CAR). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из CD8 Т-клеток, CD4 Т-клеток, CD4-наивных Т-клеток, CD8-наивных Т-клеток, CD8 Т-клеток центральной памяти, CD4 Т-клеток центральной памяти и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин является аутологичной. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего

15 изобретения клетка-хозяин является антигенспецифичной. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки-предшественники Т-лимфоцитов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой гемопоэтические стволовые клетки.

20 [00017] Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен способ изготовления композиции, причем указанный способ включает введение выделенной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина и культивирование клеток-хозяев в среде, содержащей по меньшей мере один фактор роста. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная нуклеиновая кислота

25 кодирует полипептид. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем

30 указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как

35 глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен

40 содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерный пептид содержит последовательность SEQ ID NO:

45 17. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена

полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her, и при этом указанный 5 выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her, и при этом указанный внеклеточный домен полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединен с трансмембранным доменом последовательностью, содержащей аминокислоты GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в 10 положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. 15 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит 20 промотор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит трансген. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансген содержит полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор 25 содержит антигенсвязывающий домен, спейсерный участок, трансмембранный домен и по меньшей мере один стимулирующий домен. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий трансген, соединен с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид Her2, с помощью саморасщепляющегося линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен 30 последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения саморасщепляющийся линкер представляет собой линкер T2A, содержащий последовательность LEGGGEGRGSLLTCG (SEQ ID NO: 26). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор 35 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 (CD20CAR). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин выбрана из 40

группы, состоящей из CD8 Т-клеток, CD4 Т-клеток, CD4-наивных Т-клеток, CD8-наивных Т-клеток, CD8 Т-клеток центральной памяти, CD4 Т-клеток центральной памяти и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин является аутологичной. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин является антигенспецифичной. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фактор роста выбран из группы, состоящей из ИЛ-15, ИЛ-7, ИЛ-21, ИЛ-2 и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации способ дополнительно включает отбор клеток, которые экспрессируют полипептид Her2t. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки отбирают перед культивированием клеток в среде. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки отбирают с применением антитела, которое связывается с доменом IV Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб. Согласно некоторым вариантам реализации способ дополнительно включает введение второй выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор, соединенный со второй генетической меткой. Согласно некоторым вариантам реализации способ дополнительно включает отбор клеток, экспрессирующих вторую генетическую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вторая генетическая метка содержит EGFRt. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки-предшественники Т-лимфоцитов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой гемопоэтические стволовые клетки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00018] **Фигура 1.** Структурная схема Her2t. (панель А) Молекулярная модель внеклеточного и трансмембранного участков Her2t (средняя панель) в сравнении с Her2 (ErbB2, слева). Her2t в комплексе с Fab герцептина (справа), (панель В) Схема молекулы Her2t, содержащей лидерный пептид, содержащий сигнальную последовательность альфа-цепи рецептора ГМ-КСФ (GMCSFRss), чтобы обеспечить экспрессию на поверхности клеток. Остальная часть последовательности Her2t состоит из эпитопа домена IV Her2 (ErbB2) (89 аминокислот) и трансмембранного участка, содержащего 23 аминокислоты, (панель С) Her2t был клонирован в рамке считывания в направлении 3'-конца относительно CAR и T2A, чтобы обеспечить совместную экспрессию.

[00019] **Фигура 2.** Her2t взаимодействует с трастузумабом (герцептин) для иммуногенетического обогащения Her2t-экспрессирующими клетками, (панель А) Титрование биотинилированного герцептина с использованием в качестве мишени Her2- экспрессирующей клеточной линии, (панель В) Her2t-трансдуцированные клетки K562 до и после отбора с применением биотинилированного герцептина и микрогранул, специфичных в отношении биотина (Miltenyi). Клетки очищали до получения 95% Her2t-положительных клеток, (панель С) Эпитоп Her2t специфично распознается герцептином и не распознается коммерческими антителами к Her2t. (панель D) Исследование методом вестерн-блоттинга с применением коммерческого антитела (вверху) или биотинилированного герцептина (внизу), свидетельствующее о различной массе в кД Her2t (25 кДа) и ErbB2 (250 кДа). Дорожки слева направо (1-4): маркеры молекулярной массы, исходные клетки K562, K562 Her2t, K562 ErbB2 (Her2).

[00020] **Фигура 3.** Her2t является эффективным селективным маркером совместно с EGFRt для Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), (панель А) Очистка CD8 T_{CM} из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) с помощью двухэтапной

очистки на колонке. Клетки CD8⁺ CD45RA⁻ первоначально отбирали с применением набора для выделения CD8 (для обогащения CD8-положительными клетками) и микрогранул, специфичных в отношении CD45RA (для удаления CD45RA положительных клеток). Затем клетки положительно отбирали с помощью микрогранул, специфичных в отношении CD62L. (панель В) CD8 T_{CM}, транедуцированные CD19CAR-T2A-Her2 и CD20CAR-T2A-EGFRt (оба), могут быть отобраны с помощью биотинилированного герцептина или эрбитукса и микрогранул, специфичных в отношении биотина. CD8 T_{CM}, транедуцированные CD19CAR-T2A-Her2t и CD20CAR-T2A-EGFRt (оба), могут быть последовательно очищены, что позволяет получить Т-клетки с двойной специфичностью для CAR-терапии. На пятой панели представлена гистограмма распределения очищенных T_{CM} с двойной специфичностью (оба). На верхней гистограмме представлены результаты окрашивания с применением герцептина SA-PE (Her2t⁺), на нижней гистограмме представлены результаты окрашивания с применением эрбитукса SA-PE (EGFRt⁺) для T_{CM} после двойной очистки, (панель С) Результаты исследования методом вестерн-блоттинга с применением CD3ζ-специфичного антитела на клеточных лизатах Her2t-положительных или EGFRt-положительных очищенных CD8 T_{CM}. Дорожки слева направо (1-4): маркеры молекулярной массы, контрольная транедукция, транедукция CD19CAR-T2A-Her2t, транедукция CD19CAR-T2A-EGFRt. Интенсивности полос указывают на то, что хотя значение MFI (панель В) ниже для Her2t-окрашенных клеток, Her2t-очищенные клетки имеют более высокие уровни экспрессии трангена, чем EGFRt-очищенные клетки. Верхние полосы = CD19CAR; Нижние полосы = эндогенный CD3ζ. Сравнение интенсивностей полос между цепью CAR ζ (верхняя панель - 50 кДа) и внутренней дзета-цепью Т-клеток хозяина (нижняя панель - 15 кДа) указывает на то, что клетки, экспрессирующие конструкцию CARher2t, имели приблизительно в 2 раза более высокую экспрессию CAR по сравнению к конструкцией CAREGFRt.

[00021] **Фигура 4.** Клетки, транедуцированные Her2t и Her2t/EGFRt, сохраняют эффекторный фенотип и специфичность в отношении мишени, (панель А) Характеристика целевой панели клеток K562 слева направо: исходные клетки K562, K562 CD19, K562 CD20 и K562 CD19/CD20 (по оси X: CD19⁺, Y-ось: CD20⁺). (панель В) Результаты 4-часового исследования высвобождения хрома, которые свидетельствуют о специфичности CD19- и CD20-CAR Т-клеток в отношении целевой панели клеток K562. CD8 T_{CM} совместно культивировали с целевыми клетками K562 в соотношении 50:1, 25:1, 12,5:1 или 6,25:1. Только Т-клетки после двойной транедукции могли воздействовать на все клетки K562, экспрессирующие антигены. CD19CAR-T2A-Her2t и CD19CAR-T2A-EGFRt CD8 T_{CM} проявляют аналогичную литическую способность, (панель С) Результаты 24-часового исследования высвобождения цитокинов. CD8 T_{CM} совместно культивировали с целевыми клетками K562 при соотношении Т-клетки : мишень 2:1 в течение 24 ч, и затем супернатант исследовали для определения присутствия эффекторных цитокинов. CD8 T_{CM}, транедуцированные CD19CAR-T2A-Her2t, вырабатывали более разнообразный репертуар и более высокие уровни эффекторных цитокинов по сравнению с CD8 T_{CM}, транедуцированными CD19CAR-T2A-EGFRt. Панели аналогичны таковым в А и В (слева направо: исходные клетки K562, K562 CD19, K562 CD20 и K562 CD19/CD20). Аналогичные результаты были получены для

CD4 T_{CM} (данные не приведены), (панель D) Типичные данные по относительному увеличению выработки цитокинов в 24-часовом количественном исследовании высвобождения цитокинов. CD8 T_{CM}, очищенные с помощью Her2t (CD19CAR-Her2t), вырабатывали значительно более высокие уровни эффекторных цитокинов ИЛ-2, ИФН-гамма и ФНО-альфа при совместном культивировании с K562, экспрессирующими CD19 (выше), по сравнению с CD19CAR-EGFRt. Т-тест Стьюдента $p > 0,05$.

[00022] **Фигура 5.** Использование Her2t в качестве маркера для детектирования в условиях *in vivo* и флуоресцентного окрашивания модифицированных клеток, (панель А) CD19CAR-T2A-Her2t или CD19CAR-T2A-EGFRt-экспрессирующие CD4 и CD8 T_{CM} (10^7) вводили внутривенно мышам линии NOD/SCID IL-2R γ C0 совместно с подкожным введением 5×10^6 клеток NS0-IL15, чтобы обеспечить системное поступление ИЛ-15 человека. Костный мозг собирали через 14 дней после инъекции, и клеточные суспензии исследовали методом проточной цитометрии. (панель В) На трех панелях показаны пропущенные жизнеспособные клетки (93,6% лимфоцитов), одиночные клетки (98,8% и живые клетки (99,9%). (В) Окрашивание CD8 и CD45, слева направо (контроль, CD19CAR-T2A-Her2t, CD19CAR-T2A-EGFRt T_{CM}). По меньшей мере 1×10^7 клеток были зарегистрированы в популяциях пропущенных жизнеспособных, одиночных и живых клеток. Таким образом, несмотря на то, что CD45⁺ клетки составляют около 1% популяции, это эквивалентно 1×10^5 клеток. Остальные клетки представляют собой клетки костного мозга мыши. (панель С) CD45⁺ клетки человека окрашивали биотинилированным герцептином или эрбитуксом и SA-APC. Были выявлены Her2t- или EGFRt-экспрессирующие T_{CM} из костного мозга, (панель D) Исходные клетки ТМ-LCL, Her2 (ErbB2) или Her2t-экспрессирующие клетки прикрепляли к покровным стеклам с применением поли-L-лизина, и затем окрашивали с применением биотинилированного герцептина и SA-AF647. При окрашивании биотинилированным герцептином и SA-AF647 окрашивание наблюдали только для клеток, экспрессирующих Her2 или Her2t.

[00023] **Фигура 6.** Очистка Her2t-положительных и EGFRt-положительных Т-клеток с помощью набора Multisort. Клетки Н9 (5×10^6 исходных клеток, Her2t⁺, EGFRt⁺ или Her2t⁺/EGFRt⁺) смешивали и затем подвергали очистке. Клетки сначала очищали с применением биотинилированного герцептина и микрогранул, специфичных в отношении биотина, Multisort. Микрогранулы Multisort затем удаляли и положительную фракцию очищали с применением эрбитукс-APC и микрогранул, специфичных в отношении APC. Готовая положительная фракция была двойной положительной в отношении Her2t и EGFRt.

[00024] **Фигура 7.** Три варианта Her2t (CD28hinge, IgG4hinge или Her2tG) были разработаны для улучшения связывания с антителом герцептином. Представлена общая схема, на которой указаны места вставки новых последовательностей в Her2t.

[00025] **Фигура 8.** Her2tG проявляет улучшенное связывание с герцептином. Клетки Н9 транедуцировали лентивирусом, содержащим Her2t или Her2tG, при MOI=1. Транедуцированные клетки затем очищали с помощью биотинилированного герцептина и микрогранул, специфичных в отношении биотина, согласно протоколу производителя. Очищенные популяции затем окрашивали для выявления Her2t или Her2tG с применением биотинилированного герцептина и стрептавидина-ФЭ. Гистограммы указывают на более прочное связывание с Her2tG.

[00026] **Фигура 9.** Her2tG проявляет более высокую способность к связыванию с герцептином. Клетки H9 транедуцировали с применением 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1 и 3 мкл лентивируса (слева направо), и через 5 дней исследовали для определения связывания с герцептином. Вариант Her2t, Her2t(CD28hinge), был способен связаться с герцептином на уровнях, аналогичных таковым для исходного Her2t (результаты окрашивания Her2t не представлены, но основаны на данных предыдущих экспериментов). Her2t (IgG4hinge) улучшал связывание герцептина по сравнению с Her2t или Her2t(CD28hinge), в то время как вариант Her2tG обладал наибольшей способностью связываться с герцептином и окрашивать транедуцированные клетки H9.

10 **Определения.**

[00027] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понятно специалисту в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение.

[00028] В настоящей заявке термин «приблизительно» при ссылке на измеряемое значение включает отклонения на $\pm 20\%$ или $\pm 10\%$, более предпочтительно $\pm 5\%$, еще более предпочтительно $\pm 1\%$, и еще более предпочтительно $\pm 0,1\%$ от заданного значения.

[00029] В настоящей заявке термин «антиген» или «Ag» относится к молекуле, которая вызывает иммунный ответ. Иммунный ответ может включать выработку антител или активацию специфичных иммунологически компетентных клеток, или оба процесса.

20 Очевидно, что антиген может быть создан, синтезирован, получен рекомбинантным способом или получен из биологического образца. Подходящий биологический образец может включать, но не ограничивается ими, образец ткани, образец опухоли, клетку или биологическую жидкость, такую как, например, кровь, плазма и асцитная жидкость.

[00030] В настоящей заявке термин «противоопухолевый эффект» относится к биологическому эффекту, который может проявляться в уменьшении объема опухоли, уменьшении количества опухолевых клеток, уменьшении числа метастазов, увеличении средней продолжительности жизни или уменьшении различных физиологических симптомов, связанных с раковым состоянием. «Противоопухолевый эффект» также может проявляться снижением количества рецидивов или увеличением времени до рецидива. Согласно некоторым вариантам в настоящем изобретении предложен способ лечения пациента, причем указанный способ включает введение эффективного количества композиции, при этом указанная композиция содержит клетки, при этом указанные клетки композиции экспрессируют химерный антигенный рецептор, содержащий антигенсвязывающий домен, связывающийся с опухолевым антигеном, экспрессируемым на раковой клетке, и генетическую метку. Согласно некоторым вариантам реализации композиция обладает противоопухолевым действием.

[00031] В настоящей заявке термин «химерный рецептор» относится к рецептору, разработанному синтетическим способом, содержащему лигандсвязывающий домен антитела или другую белковую последовательность, которая связывается с молекулой, ассоциированной с заболеванием или расстройством, и соединенному посредством спейсерного участка с одним или более внутриклеточными сигнальными доменами Т-клетки или другими рецепторами, такими как костимулирующий домен. Химерный рецептор также может упоминаться как искусственные рецепторы Т-клеток, химерные рецепторы Т-клеток, химерные иммунорецепторы и химерные антигенные рецепторы (CAR). Указанные CAR представляют собой модифицированные рецепторы, которые могут придавать относительную специфичность иммунной рецепторной клетке. Химерные антигенные рецепторы или «CAR» упоминаются некоторыми исследователями как рецепторы, содержащие антитело или фрагмент антитела, спейсер, сигнальный

домен и трансмембранный участок. Однако вследствие неожиданных эффектов, вызванных модификацией различных компонентов или доменов CAR, таких как области связывания эпитопа (например, фрагмент антитела, scFv или его часть), спейсер, трансмембранный домен и/или сигнальный домен, компоненты CAR описаны в некоторых частях настоящего документа как независимые элементы. Изменение различных элементов CAR может, например, привести к более высокой аффинности связывания в отношении специфичного эпитопа.

[00032] В настоящей заявке термин «костимулирующий домен» относится к сигнальному фрагменту, передающему Т-клеткам сигнал, который, в дополнение к основному сигналу, который передается с участием, например, дзета-цепи CD3 комплекса TCR/CD3, вызывает Т-клеточный ответ, включая, но не ограничиваясь ими, процессы активации, пролиферации, дифференцировки, секреции цитокинов и т.п. Костимулирующий домен может содержать, но не ограничивается ими, полноразмерный или часть CD27, CD28, 41BB, OX40, CD30, CD40, ICOS, антигена, ассоциированного с функцией лимфоцитов 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, и/или лиганда, который специфично связывается с CD83. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения костимулирующий домен представляет собой внутриклеточный сигнальный домен, который взаимодействует с другими внутриклеточными посредниками, чтобы вызвать клеточный ответ, включая активацию, пролиферацию, дифференцировку, секрецию цитокинов и т.п. Согласно некоторым вариантам реализации, описанным в настоящем документе, химерный антигенный рецептор содержит костимулирующий домен.

[00033] В настоящей заявке термин «кодирование» относится к свойству специфичных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таких как ген, кДНК или мРНК, выполняющих функцию матриц для синтеза других макромолекул, таких как определенная последовательность аминокислот. Термин «кодирование» может быть использован взаимозаменяемо с термином «кодирующий». Следовательно, ген кодирует белок, если транскрипция и трансляция мРНК, соответствующей указанному гену, приводит к выработке белка в клетке или другой биологической системе. Термин «последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид» включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными вариантами друг друга и которые кодируют аналогичную аминокислотную последовательность.

[00034] В настоящей заявке термин «цитотоксический Т-лимфоцит» (ЦТЛ) относится к Т-лимфоциту, экспрессирующему CD8 на своей поверхности (т.е. CD8⁺ Т-клетке). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения такие клетки предпочтительно представляют собой Т-клетки «памяти» (Т_М-клетки), которые вступали в контакт с антигеном.

[00035] В настоящей заявке термин Т-клетка «центральной памяти» (или «Т_{СМ}») относится к ЦТЛ, вступавшим в контакт с антигеном, экспрессирующим CD62L или CCR-7 и CD45RO на своей поверхности, и не экспрессирующим или имеющим сниженный уровень экспрессии CD45RA, по сравнению с наивными клетками. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки центральной памяти являются положительными в отношении экспрессии CD62L, CCR7, CD28, CD 127, CD45RO и/или CD95, и/или имеют сниженный уровень экспрессии CD54RA по сравнению с наивными клетками. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложена клетка-хозяин, причем указанная клетка-хозяин является антигенспецифичной. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего

изобретения клетка представляет собой Т-клетку центральной памяти.

[00036] В настоящей заявке термин Т-клетка «эффекторной памяти» (или «Т_{ЕМ}») относится к Т-клетке, которая вступала в контакт с антигеном, которая не экспрессирует или имеет сниженный уровень экспрессии CD62L на своей поверхности, по сравнению с клетками центральной памяти, и не экспрессирует или имеет сниженный уровень экспрессии CD45RA по сравнению с наивными клетками. Согласно некоторым вариантам реализации клетки эффекторной памяти являются отрицательными в отношении экспрессии CD62L и CCR7, по сравнению с наивными клетками или клетками центральной памяти, и имеют различные уровни экспрессии CD28 и CD45RA. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложена клетка-хозяин, причем указанная клетка-хозяин является антигенспецифичной. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка представляет собой Т-клетку эффекторной памяти.

[00037] В настоящей заявке термин «наивные» Т-клетки относится к Т-лимфоциту, не вступавшему в контакт с антигеном, который экспрессирует CD62L и CD45RA, и не экспрессирует CD45RO⁺ по сравнению с клетками центральной или эффекторной памяти.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения наивные CD8⁺ Т-лимфоциты характеризуются экспрессией фенотипических маркеров наивных Т-клеток, включая CD62L, CCR7, CD28, CD127 и/или CD45RA. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложена клетка-хозяин, причем указанная клетка-хозяин является антигенспецифичной. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка является наивной Т-клеткой.

[00038] В настоящей заявке термин «эффекторные» Т-клетки, «Т_Е», относится к цитотоксическим Т-лимфоцитам, вступавшим в контакт с антигеном, которые не экспрессируют или имеют сниженные уровни экспрессии CD62L, CCR7 и/или CD28, и являются положительными в отношении гранзима В и/или перфорина по сравнению с клетками центральной памяти или наивными Т-клетками. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложена клетка-хозяин, причем указанная клетка-хозяин является антигенспецифичной. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка является эффекторной Т-клеткой.

[00039] В настоящей заявке термин «предшественники Т-клеток» относится к лимфоидным клеткам-предшественникам, которые могут мигрировать в тимус и становиться предшественниками Т-клеток, которые не экспрессируют Т-клеточный рецептор. Все Т-клетки происходят от гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге. Гемопоэтические клетки-предшественники (лимфоидные клетки-предшественники), которые происходят от гемопоэтических стволовых клеток, заселяют тимус и размножаются путем деления клеток, чтобы создать большую популяцию незрелых тимоцитов. Самые ранние тимоциты не экспрессируют ни CD4, ни CD8, и поэтому классифицируются как двойные отрицательные (CD4⁻CD8⁻) клетки. По мере созревания, указанные клетки становятся двойными положительными тимоцитами (CD4⁺CD8⁺), и, наконец, созревают в моноположительные (CD4⁺CD8⁻) или CD4⁻CD8⁺ тимоциты, которые затем высвобождаются из тимуса в периферические ткани.

[00040] Приблизительно 98% тимоцитов умирают во время процессов развития в тимусе, не пройдя ни положительного отбора, ни отрицательного отбора, в то время как другие 2% выживают и покидают тимус, чтобы стать зрелыми иммунокомпетентными Т-клетками.

[00041] Двойная отрицательная (DN) стадия предшественника Т-клеток ориентирована на выработку функциональной бета-цепи, тогда как двойная положительная (DP) стадия ориентирована на выработку функциональной альфа-цепи, в конечном итоге, обеспечивая выработку функционального $\alpha\beta$ Т-клеточного рецептора. По мере того как развивающиеся тимоциты проходят четыре стадии DN (DN1, DN2, DN3 и DN4), Т-клетка экспрессирует инвариантную альфа-цепь, но перестраивает локус β -цепи. Если перестроенная β -цепь успешно спаривается с инвариантной α -цепью, то вырабатываются сигналы, которые приостанавливают перестройку бета-цепи (и подавляют альтернативный аллель) и приводят к пролиферации клетки. Несмотря на то, что эти сигналы требуют присутствия пре-TCR на поверхности клетки, они зависят от связывания лигандов с пре-TCR. Указанные тимоциты затем начинают экспрессировать CD4 и CD8 и прогрессируют до стадии двойной положительной (DP) клетки, когда происходит отбор α -цепи. Если перестроенная β -цепь не приводит к передаче сигналов (например, в результате неспособности спаривания с инвариантной альфа-цепью), то клетка может погибнуть вследствие исключения из процессов сигнализации (отсутствие передачи сигналов).

[00042] «Гемопоэтические стволовые клетки» или «ГСК», как описано в настоящем документе, представляют собой клетки-предшественники, которые могут дать начало миелоидным клетками, таким как, например, макрофаги, моноциты, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, эритроциты, мегакариоциты/тромбоциты, дендритные клетки и лимфоидные клоны (такие как, например, Т-клетки, В-клетки, НК-клетки). ГСК представляют собой гетерогенную популяцию, в которой существуют три класса стволовых клеток, которые различаются по соотношению лимфоидного и миелоидного потомства в крови (L/M).

[00043] В настоящей заявке термины «обогащенный» и «истощенный» описывают количество типов клеток в смеси, относятся к воздействию на смесь клеток процесса или этапа, который приводит к увеличению числа «обогащенного» типа и уменьшению числа «истощенных» клеток. Следовательно, в зависимости от источника исходной популяции клеток, подвергнутой процессу обогащения, смесь или композиция может содержать 60, 70, 80, 90, 95 или 99% или более (по числу или количеству) «обогащенных» клеток, включая любое целое число, которое находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя конечными точками любого из перечисленных значений, и 40, 30, 20, 10, 5 или 1% или менее (по числу или количеству) «истощенных» клеток, включая любое число, которое находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя конечными точками любого из перечисленных значений.

[00044] В настоящей заявке термин «эпитоп» относится к части антигена или молекулы, которая распознается иммунной системой, включая антитела, Т-клетки и/или В-клетки. Эпитопы, как правило, содержат по меньшей мере 7 аминокислот и могут быть линейными или конформационными.

[00045] Термин «Her2» или «ERBB2» относится к мембранно-связанному протеинкиназному рецептору, который нуждается в корецепторе для связывания лиганда. Эталонная последовательность типичного полипептида Her2 может быть найдена в UniProt под номером P04626 и SEQ ID NO: 23. (Таблица 8) Полноразмерная эталонная последовательность содержит 1255 аминокислот, включая сигнальную последовательность из 1-22 аминокислот, внеклеточный домен из 23-652 аминокислот, трансмембранный домен из 653-675 аминокислот и цитоплазматический домен из 676-1255 аминокислот, приведенные в таблице 8. Полноразмерная зрелая полипептидная последовательность содержит 1233 аминокислоты, поскольку лидерная

последовательность не входит в зрелый полипептид. Известно несколько природных вариантов и изоформ. Эталонная нуклеиновая последовательность может быть найдена в Genbank под номером X03363/gI 31197. Внеклеточный домен содержит 4 области, которые соответствуют: аминокислотам 23-217 домена I; аминокислотам с 218 по 341 домена II; аминокислотам с 342 по 510 домена III; и аминокислотам с 511 по 562 домена IV последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23.

[00046] Термин «Her2t» относится к фрагменту последовательности Her2 и подходит для использования в качестве генетической метки для экспрессии трансгена. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Her2t содержит домен IV внеклеточного домена Her2 и не включает полноразмерный Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Her2t специфично связывается с антителом, специфичным в отношении домена IV Her2. Согласно другим вариантам реализации Her2t содержит аминокислоты с 511 по 562 или 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23.

[00047] Термин «выделенный» используется для описания различных полипептидов, описанных в настоящем документе, и обозначает полипептид или нуклеиновую кислоту, которая была идентифицирована и отделена и/или выделена из компонентов природной среды. Предпочтительно выделенный полипептид или нуклеиновая кислота не связана с любыми компонентами, с которыми она связана в природе. Загрязняющие компоненты природной среды представляют собой материалы, которые обычно препятствуют диагностическому или терапевтическому применению полипептида или нуклеиновой кислоты, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества.

[00048] В настоящей заявке термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится ко всему или части одного или более доменов молекулы (в настоящем изобретении молекулы химерного рецептора), которая обеспечивает активацию лимфоцита. Внутриклеточные домены таких молекул опосредуют передачу сигнала, взаимодействуя с клеточными медиаторами, чтобы вызвать пролиферацию, дифференцировку, активацию и другие эффекторные функции. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанные молекулы включают полноразмерный или часть CD28, CD3 и/или 4-1BB или их комбинации.

[00049] В настоящей заявке термин «лиганд» относится к веществу, которое специфично связывается с другим веществом с образованием комплекса. Примеры лигандов включают эпитопы антигенов, молекулы, которые связываются с рецепторами, субстратами, ингибиторами, гормонами и активаторами. В настоящей заявке термин «лигандсвязывающий домен» относится к веществу или части вещества, которая связывается с лигандом. Примеры лигандсвязывающих доменов включают антигенсвязывающие фрагменты антител, внеклеточные домены рецепторов и активные центры ферментов.

[00050] В настоящей заявке термин «функционально соединенный» относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, что приводит к экспрессии последней. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты функционально соединена со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты находится в функциональной связи со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор функционально соединен с кодирующей последовательностью, если промотор воздействует на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Обычно

функционально соединенные последовательности ДНК являются смежными и, в случае необходимости, функциональную связь используют для соединения двух областей, кодирующих белки, в одной и той же рамке считывания.

[00051] Термин «процент (%) идентичности аминокислотных последовательностей» в отношении полипептидных последовательностей генетической метки, определенных в настоящем документе, определяется как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в эталонной последовательности после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если это необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и без учета любых консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание для определения процента идентичности аминокислотных последовательностей может быть достигнуто различными способами, которые известны специалистам в данной области техники, например, с помощью общедоступного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для оценки выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Например, процент идентичности аминокислотных последовательностей, полученный с применением компьютерной программы WU-BLAST-2 [Altschul et al., Methods in Enzymology, 266: 460-480 (1996)], основан на нескольких параметрах поиска, большинство из которых установлены как значения по умолчанию. Параметры, которые не установлены как значения по умолчанию (то есть, регулируемые параметры), устанавливаются со следующими значениями: длина перекрытия = 1, доля перекрытия = 0,125, пороговая длина слова (T) = 11 и оценочная матрица = BLOSUM62. Значение процента идентичности аминокислотных последовательностей определяют путем деления (а) количества совпадающих идентичных аминокислотных остатков между каждой или всеми аминокислотными последовательностями эталонной последовательности Her2, представленной в SEQ ID NO: 15, или аминокислотами 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, и сравниваемой аминокислотной последовательностью, представляющей интерес, как определено WU-BLAST-2, на (b) общее количество аминокислотных остатков полипептида, представляющего интерес.

[00052] В настоящей заявке термин «вариант полинуклеотида генетической метки» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, определенной ниже, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 15, или ее нуклеотидам или ее фрагменту, полученному специфично. Обычно вариант полинуклеотида или его фрагмента будет по меньшей мере приблизительно на 80% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 81% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 82% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 83% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 84% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 85% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 86% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, более предпочтительно по меньшей мере

приблизительно на 87% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 88% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 89% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 90% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 91% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 92% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 93% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 94% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 95% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 96% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 97% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 98% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты и еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 99% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 14, или фрагменту, полученному из нее, или идентичен указанной последовательности нуклеиновой кислоты на любую величину процента идентичности, которая находится в диапазоне между любыми двумя из перечисленных процентных значений идентичности последовательностей нуклеиновых кислот. Варианты не включают нативную нуклеотидную последовательность. В связи с этим, вследствие вырожденности генетического кода, специалист в данной области техники поймет, что большое количество вариантов полинуклеотидов, кодирующих химерный рецептор, имеет по меньшей мере приблизительно 80% идентичность последовательности нуклеиновой кислоты с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 14, или нуклеотидами, которые кодируют полипептид, аминокислотная последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 18.

[00053] Термин «по существу очищенный» относится к молекуле, которая содержит 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% или менее других типов молекул или других типов клеток, или имеет любое значение процента очистки, которое находится в диапазоне между любыми двумя из перечисленных значений процента очистки. По существу очищенная клетка также относится к клетке, которая была отделена от других типов клеток, с которыми она обычно связана в природном состоянии. В некоторых случаях популяция по существу очищенных клеток относится к гомогенной популяции клеток.

[00054] Термин «по существу не обнаружено», при использовании в отношении присутствия опухолевого антигена или других молекул на нормальных клетках, относится к проценту нормальных клеток, которые содержат антиген или молекулу, и/или к плотности антигена на клетках. Согласно некоторым вариантам реализации «по существу не обнаружено» означает, что антиген или молекула обнаруживается на менее чем 50% нормальных клеток и/или с плотностью, которая на 50% меньше, по сравнению с количеством клеток или антигена, обнаруженного на опухолевой клетке или другой больной клетке.

[00055] В настоящей заявке «Т-клетки» или «Т-лимфоциты» могут быть получены из любого млекопитающего, предпочтительно примата, вида, включая обезьян, собак

и человека. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Т-клетки являются аллогенными (получены из одного и того же вида, но другого донора) по отношению к субъекту-реципиенту; согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Т-клетки являются аутологичными (донор и реципиент представляют собой одного и того же субъекта); согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Т-клетки являются сингенными (донор и реципиент являются разными субъектами, но идентичными близнецами).

[00056] «Вектор» или «конструкция» представляет собой нуклеиновую кислоту, используемую для введения гетерологичных нуклеиновых кислот в клетку, которая содержит регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию гетерологичных нуклеиновых кислот в клетке. Векторы включают, но не ограничиваются ими, плазмиды, миникольцевые нуклеиновые кислоты, геномы дрожжей и вирусов.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00057] В настоящем изобретении предложен полипептид генетической метки или его вариант, и нуклеиновая кислота, кодирующая генетическую метку, которую можно применять для того чтобы обеспечить селективный маркер и/или идентификационный маркер для клеток, экспрессирующих трансген.

Генетические метки трансгена, полипептиды и варианты.

[00058] Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена генетическая метка для экспрессии трансгена, которая обеспечивает стабильную экспрессию трансгена в клетках. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения генетическая метка обеспечивает селекцию трансдуцированных клеток, которые экспрессируют трансген на уровне, сопоставимом с таковым для эндогенных генов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения генетическая метка экспрессируется на поверхности клеток, имеет сниженную иммуногенность, по существу не увеличивает полезную генетическую нагрузку в векторе и/или обеспечивает экспрессию трансгенов в различных клетках.

[00059] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения генетическая метка представляет собой фрагмент Her2, обозначенный Her2t, который по меньшей мере содержит эпитоп, распознаваемый антителом к Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело специфично связывается с доменом IV Her2. Согласно другим вариантам реализации антитело специфично связывается с доменом IV Her2, и не связывается с эпитопами в доменах I, II и/или III Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело к Her2 представляет собой антитело, терапевтически пригодное для лечения рака. Согласно некоторым вариантам реализации эпитоп распознается трастузумабом (герцептин). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения эпитоп распознается трастузумабом и/или антителами, которые конкурируют за связывание с трастузумабом, но не другими антителами к Her2, которые связываются, например, с эпитопами в доменах I, II и/или III Her2.

[00060] В конкретном варианте реализации эпитоп содержит аминокислоты, определенные с помощью кристаллической структуры Her2 в комплексе с Fab герцептина (Cho et al., Nature (2003) 421:756). Взаимодействие между Her2 и герцептином происходит между тремя петлевыми участками (два электростатических и один гидрофобный) в домене IV. Основные аминокислоты в Her2, взаимодействующие с герцептином, включают: петлю 1 (электростатическую), которая содержит аминокислотную последовательность 580-584 EADQC (включая Glu 580 и Asp 582) (SEQ ID NO: 42), петлю 2 (гидрофобную), которая содержит аминокислотную последовательность 592-595

DPPE (включая Asp 592 и Phe 595) (SEQ ID NO: 43) и петлю 3 (электростатическую), которая содержит аминокислотную последовательность 616-625 FPDEEGACQP (включая Gin 624) (SEQ ID NO: 44) (система нумерации аминокислот основана на полноразмерной последовательности ErbB2 (Her2), представленной в SEQ ID NO: 23, включая сигнальную последовательность, и приведена в таблице 8). Используя систему нумерации, предложенную Cho et al., согласно которой из сигнальной последовательности удалены 22 аминокислоты, установлено, что во взаимодействие с герцептином вступают следующие аминокислоты Her2: Glu 558 и Asp 560 петли 1, Asp 570 и Phe 573 петли 2 и Gin 602 петли 3. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фрагмент Her2 содержит по меньшей мере указанные остатки аминокислот и подвергается дополнительному отбору для оценки его связывания с трастузумаб или антителом, которое конкурирует за связывание с трастузумабом, при экспрессии на поверхности клетки. Не ограничивая объем настоящего изобретения, авторы настоящего изобретения полагают, что фрагмент Her2t, содержащий по меньшей мере аминокислоты 563-652, содержит эпитоп, который может связываться с трастузумабом, поскольку эпитоп меньшего размера, содержащий аминокислоты с 578 по 652, не связывается с трастузумабом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фрагмент Her2t содержит аминокислоты 563-652 Her2t. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фрагмент Her2t содержит аминокислотные последовательности 580-584 Her2t, аминокислотные последовательности 592-595 Her2t и аминокислотные последовательности 616-625 Her2t.

[00061] В конкретном варианте реализации фрагмент Her2 содержит, по существу состоит или состоит из аминокислот 511-652 (домен IV) или 563-652, приведенных в таблице 6 (SEQ ID NO: 18). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность варианта фрагмента Her2 по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18, или идентична на величину процента, которая находится в диапазоне, определенном любыми двумя из указанных выше процентных значений, и при экспрессии на поверхности клетки связывается с трастузумабом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вариант фрагмента содержит по меньшей мере 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замену аминокислоты, предпочтительно консервативные замены аминокислот. Подходящие замены могут быть выявлены на основании кристаллической структуры Her2 в комплексе с Fab герцептина (Cho et al., Nature (2003)). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вариант фрагмента не содержит замену аминокислоты в остатках, участвующих в связывании с трастузумабом, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фрагмент содержит остатки в домене IV Her2, и не содержит один или более других доменов Her2, включая домен I, домен II, домен III и/или внутриклеточные домены.

[00062] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения генетическая метка не вызывает иммунного ответа или вызывает незначительный иммунный ответ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения генетическая метка выбрана из эндогенных белков для того чтобы воспользоваться преимуществами невосприимчивости субъекта к действию эндогенных белков. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения генетическую метку исследуют с помощью программного обеспечения для прогнозирования антигенных эпитопов, такого как алгоритм предсказания процессинга антигенного пептида MHC-I. Последовательность: MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPCHPECQPQNGSVT (SEQ ID NO:

16) исследуют для определения антигенных детерминант. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты генетической метки получена и/или модифицирована из последовательности зародышевой линии для включения в искусственную или синтетическую трансгенную конструкцию.

[00063] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения генетическая метка дополнительно содержит трансмембранный домен. Трансмембранный домен может быть получен из природного или синтетического источника. Если источник является природным, домен может быть получен из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. Трансмембранные участки содержат по меньшей мере трансмембранную область(и) альфа, бета или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3, CD45, CD4, CD8, CD9, CD16, CD22; CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD 137 и/или CD 154. В конкретном варианте трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность трансмембранного домена Her2, представленного в таблице 6 (например, аминокислоты 653-675 (SEQ ID NO: 20). Типичная полинуклеотидная последовательность, кодирующая трансмембранный домен Her2 (SEQ. ID NO: 19), представлена в таблице 6.

[00064] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения синтетические трансмембранные домены или их варианты содержат преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность трансмембранного домена может быть по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентична последовательности трансмембранного домена, приведенной в таблице 6, или значение процента идентичности последовательности находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя из указанных выше процентных значений. Варианты трансмембранных доменов предпочтительно имеют оценку степени гидрофобности по меньшей мере 50, вычисленную по шкале Kyte Doolittle.

[00065] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения генетическая метка содержит пептид, который усиливает поверхностную экспрессию генетической метки. Подходящие пептиды включают, например, сигнальную последовательность гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, лидерный пептид эндогенного Her2 (аминокислоты 1-22), сигнальные пептиды типа I, сигнальный пептид IgGк и/или лидерную последовательность CD8. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерная последовательность содержит последовательность SEQ ID NO: 17.

[00066] В конкретном варианте реализации генетическая метка содержит фрагмент Her2, который связывается с трастузумабом, и трансмембранный домен, примером которого служит последовательность SEQ ID NO: 20. В другом конкретном варианте реализации генетическая метка содержит пептид, который усиливает поверхностную экспрессию, фрагмент Her2, который связывается с трастузумабом, и трансмембранный домен, примером которого служит последовательность SEQ ID NO: 15. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность варианта генетической метки на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 20, или значение процента идентичности последовательности находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя из указанных выше процентных значений, и при экспрессии на поверхности клетки связывается с трастузумабом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вариант фрагмента содержит по меньшей мере 9,

8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, или 1 замену аминокислоты, предпочтительно консервативные замены аминокислот. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вариант фрагмента не содержит замену аминокислоты в остатках, участвующих в связывании с трастузумабом.

5 [00067] Необязательно последовательность линкера может предшествовать последовательности генетической метки и/или разделяет один или более функциональных доменов (например, пептид для усиления поверхностной экспрессии, генетическая метка, трансмембранный домен) генетической метки. Последовательности линкеров
10 необязательно расщепляются, например, последовательности T2A (приведенные в таблице 1) или последовательности IRES. Расщепляемые линкерные последовательности, как правило, предшествуют последовательности генетической метки в конструкции нуклеиновой кислоты. Другие линкерные последовательности, как правило, представляют собой короткие пептиды, содержащие приблизительно от 2 до 15 аминокислот, и расположены между функциональными доменами генетической метки,
15 включая пептид для усиления поверхностной экспрессии, генетическую метку и трансмембранный домен. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкеры содержат 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот и расположены между функциональными доменами генетической метки, включая пептид для усиления поверхностной экспрессии, генетическую метку и трансмембранный
20 домен. Согласно некоторым вариантам реализации линкер представляет собой расщепляемый линкер. Согласно некоторым вариантам реализации линкер представляет собой расщепляемую последовательность T2A. Согласно некоторым вариантам реализации линкер содержит последовательности IRES.

[00068] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения система
25 дополнительно содержит одну или более дополнительных генетических меток. Согласно другому варианту дополнительная последовательность генетической метки представляет собой фрагмент последовательности рецептора эпидермального фактора роста (EGFRt). Пример такой последовательности приведен в таблице 7. Как правило, последовательность генетической метки имеет функциональную характеристику,
30 которая обеспечивает отбор трансдуцированных клеток и/или детектирование трансдуцированных клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность генетической метки совместима с трансдукцией лимфоцитов человека.

[00069] В других вариантах реализации настоящего изобретения дополнительная
35 генетическая метка представляет собой положительный селективный маркер. Положительная селективная генетическая метка может представлять собой ген, который при введении в клетку-хозяина экспрессирует доминирующий фенотип, обеспечивающий положительную селекцию клеток, несущих ген. Гены указанного типа известны в данной области техники и включают, среди прочего, ген гигромицин-В-фосфотрансферазы
40 (hph), который придает устойчивость к гигромицину В, ген аминокликозидфосфотрансферазы (neo или aph) из Tn5, который кодирует устойчивость к антибиотику G418, ген дигидрофолатредуктазы (DHFR), который обеспечивает устойчивость к метотрексату, DHFR dm, ген ras, который обеспечивает устойчивость к пуромицину, ген Sh ble, который инактивирует зеоцин, ген аденозиндезаминазы (ADA)
45 и ген множественной лекарственной устойчивости (MDR). Трансдуцированные клетки, культивируемые в присутствии указанных агентов, будут выживать и могут быть отобраны. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки-предшественники Т-лимфоцитов. Согласно

некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой гемопоэтические стволовые клетки.

[00070] Согласно другому варианту первая нуклеиновая кислота дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий последовательность генетической метки.

5 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность генетической метки представляет собой последовательность Her2t. Типичные полинуклеотидные и аминокислотные последовательности Her2t приведены в таблице 6, и представлены в SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, соответственно. Согласно
10 другому варианту последовательность генетической метки представляет собой фрагмент рецептора эпидермального фактора роста (EGFRt), представленный в таблице 7. Типичный полинуклеотид усеченного рецептора эпидермального фактора роста представляет собой последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22.

[00071] Полинуклеотид, кодирующий генетическую метку, может быть легко получен с помощью синтетических или рекомбинантных способов из аминокислотной
15 последовательности. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий последовательность генетической метки, функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим линкерную последовательность. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий последовательность генетической метки,
20 также может содержать один или более сайтов рестрикции на 5'- и/или 3'-конце кодирующей последовательности, чтобы обеспечить легкое удаление и замену полинуклеотида, кодирующего последовательность метки, другим полинуклеотидом, кодирующим другую последовательность генетической метки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения кодоны полинуклеотида, кодирующего
25 маркерную последовательность, оптимизированы для экспрессии в клетках млекопитающих, предпочтительно у человека.

[00072] Согласно некоторым вариантам реализации могут быть использованы две или более последовательностей генетической метки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первая последовательность генетической метки
30 функционально связана с первым химерным антигенным рецептором и обеспечивает возможность детектирования того, что трансдуцированная клетка экспрессирует первый CAR. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения вторая последовательность генетической метки функционально связана со вторым и отличающимся CAR и обеспечивает возможность детектирования того, что
35 трансдуцированная клетка экспрессирует второй CAR.

Нуклеиновые кислоты и векторы.

[00073] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены конструкции нуклеиновых кислот и их варианты, кодирующие генетические метки, описанные в настоящем документе.

40 [00074] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность фрагмента Her2 или его варианта. В конкретном варианте реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18. В конкретном варианте
45 реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность генетической метки представляет собой фрагмент рецептора эпидермального фактора

роста (EGFRt), представленный в таблице 7. Типичный полинуклеотид усеченного рецептора эпидермального фактора роста представляет собой последовательность SEQ ID NO: 21. Нуклеиновые кислоты включают последовательности нуклеиновых кислот, кодоны которых оптимизированы для экспрессии в организме человека, вырожденные последовательности и варианты последовательностей.

Векторы.

[00075] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую генетическую метку. Нуклеиновая кислота, кодирующая генетическую метку, может быть упакована в вектор в виде отдельной конструкции или соединена с нуклеиновой кислотой, кодирующей трансген. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая генетическую метку, упакована в вектор в виде отдельной конструкции или соединена с нуклеиновой кислотой, кодирующей трансген.

[00076] Множество комбинаций векторов могут быть сконструированы, чтобы обеспечить эффективную трансдукцию и экспрессию трансгена. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вектор представляет собой двойной упакованный или единый (все в одном) вирусный вектор. Согласно другим вариантам реализации векторы могут содержать комбинацию вирусных векторов и плазмидных векторов. Другие вирусные векторы включают пенистый вирус, аденовирусные векторы, ретровирусные векторы и лентивирусные векторы. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения вектор представляет собой лентивирусный вектор.

[00077] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения плазмидный вектор или вирусный вектор содержит нуклеиновую кислоту, содержащую полинуклеотид, кодирующий генетическую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения генетическая метка содержит полинуклеотид, кодирующий Her2t, и дополнительно содержит промотор, полинуклеотид, кодирующий пептид для усиления поверхностной экспрессии, и/или полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения первая нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20, или SEQ ID NO: 15 или ее вариант, функционально соединенный с промотором.

[00078] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения плазмидный или вирусный вектор содержит промотор, функционально соединенный с полинуклеотидом, кодирующим химерный антигенный рецептор, функционально соединенный с полинуклеотидом, кодирующим генетическую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор направлен к CD19 или CD20, и генетическая метка содержит фрагмент Her2t. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий CAR, функционально соединен с генетической меткой с помощью саморасщепляющегося линкера. В других вариантах реализации настоящего изобретения плазмидный или вирусный вектор содержит промотор, функционально соединенный с полинуклеотидом, кодирующим химерный антигенный рецептор CD19, функционально соединенный с полинуклеотидом, кодирующим Her2t или EGFRt. В других вариантах реализации настоящего изобретения плазмидный или вирусный вектор содержит промотор, функционально соединенный с полинуклеотидом, кодирующим химерный антигенный рецептор CD20, функционально соединенный с полинуклеотидом, кодирующим Her2t или EGFRt.

[00079] Каждый элемент нуклеиновой кислоты может быть отделен от другого

линкерной последовательностью, предпочтительно саморасщепляющимся линкером, таким как саморасщепляющаяся последовательность T2A.

[00080] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения гетерогенная (гетерогенная по отношению к вектору, например, лентивирусному вектору) последовательность нуклеиновой кислоты ограничена количеством дополнительных генетических компонентов, которые могут быть упакованы в вектор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конструкция содержит по меньшей мере два гена, гетерогенных по отношению к вирусному вектору. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конструкция содержит не более 4 генов, гетерогенных по отношению к вирусному вектору. Число генов, гетерогенных по отношению к вирусному вектору, которые могут быть упакованы в вектор, может быть определено путем детектирования экспрессии одного или более трансгенов, и отбора векторных конструкций, которые обеспечивают трансдукцию по меньшей мере 10% клеток и/или детектируемые уровни экспрессии трансгена в по меньшей мере 10% клеток.

[00081] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лентивирус представляет собой двойной упакованный вирус. Двойной упакованный вирус содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, содержащую полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор и первую генетическую метку. При необходимости, нуклеиновая кислота дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий цитокин и/или рецептор хемокина. Двойной упакованный вирус содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, содержащую полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор и вторую генетическую метку. При необходимости, нуклеиновая кислота дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий цитокин и/или рецептор хемокина. Согласно некоторым вариантам реализации системы с двумя конструкциями, каждая конструкция может быть упакована в отдельный вирусный вектор и вирусные векторы могут быть смешаны для трансдукции в клеточной популяции. Согласно некоторым вариантам реализации первая и вторая генетические метки отличаются.

[00082] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения двойной упакованный вирус обеспечивает экспрессию по меньшей мере двух различных трансгенов (например, конструкций CAR) в одном типе клеток. Использование различных генетических меток обеспечивает отбор клеток, трансдуцированных двумя конструкциями. В конкретном варианте плазмидный или вирусный вектор содержит промотор, функционально соединенный с полинуклеотидом, кодирующим химерный антигенный рецептор CD19, функционально соединенный с полинуклеотидом, кодирующим Her2t. В других вариантах плазмидный или вирусный вектор дополнительно содержит промотор, функционально соединенный с полинуклеотидом, кодирующим химерный антигенный рецептор CD20, функционально соединенный с полинуклеотидом, кодирующим EGFRt.

[00083] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вектор представляет собой миникольцо. Миникольца представляют собой эписомные ДНК-векторы, которые получают в виде кольцевой кассеты для экспрессии, которая не содержит бактериального плазмидного ДНК-остова. Небольшая молекулярная масса миниколец обеспечивает более эффективную трансфекцию и устойчивую экспрессию в течение недели по сравнению со стандартными плазмидными векторами, которые функционируют только в течение нескольких дней. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения миникольцо содержит промотор, соединенный с

полинуклеотидом, кодирующим химерный антигенный рецептор, функционально соединенный с генетической меткой. Можно применять одно или более миникольц. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения миникольцо содержит промотор, соединенный с полинуклеотидом, кодирующим химерный антигенный рецептор и первую генетическую метку, другое миникольцо содержит промотор, соединенный с полинуклеотидом, кодирующим химерный антигенный рецептор и отличающуюся вторую генетическую метку. Согласно некоторым вариантам реализации каждый элемент конструкций отделен нуклеиновой кислотой, такой как нуклеиновая кислота, кодирующая саморасщепляющуюся последовательность T2A.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения каждое из миникольц отличается от другого химерным антигенным рецептором, включая, но не ограничиваясь ими, длину и последовательность спейсера, внутриклеточный домен для передачи сигналов и/или последовательность генетической метки.

[00084] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вектор представляет собой транспозон PiggyBac. Транспозон PiggyBac (PB) представляет собой мобильный генетический элемент, который эффективно перемещается между векторами и хромосомами с помощью механизма «вырезания и вставки». Во время транспозиции транспозаза PB распознает последовательности инвертированных концевых повторов (ITR), специфичные для транспозонов, расположенные на обоих концах транспозонного вектора, эффективно перемещает содержимое из исходных сайтов и эффективно встраивает его в хромосомные сайты TТАА. Мощная активность транспозонной системы PiggyBac обеспечивает быструю мобилизацию представляющих интерес генов, расположенных между двумя ITR в векторе PB, в целевые геномы.

[00085] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения PB содержит промотор, соединенный с полинуклеотидом, кодирующим химерный антигенный рецептор, функционально соединенный с генетической меткой. Может быть использован один или более транспозонов PB. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения PB содержит промотор, соединенный с полинуклеотидом, кодирующим химерный антигенный рецептор и первую генетическую метку, другой PB содержит промотор, соединенный с полинуклеотидом, кодирующим химерный антигенный рецептор и отличающуюся вторую генетическую метку. Каждый элемент конструкций отделен нуклеиновой кислотой, например, кодирующей последовательность саморасщепляющегося линкера T2A. Согласно некоторым вариантам реализации каждый из PB отличается от другого химерным антигенным рецептором, включая, но не ограничиваясь ими, длину и последовательность спейсера, внутриклеточный домен для передачи сигналов и/или последовательность генетической метки.

[00086] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первая нуклеиновая кислота содержит первый промотор, функционально соединенный с полинуклеотидом, кодирующим химерный антигенный рецептор, содержащим лигандсвязывающий домен, причем указанный лигандсвязывающий домен связывается с лигандом, при этом указанный лиганд представляет собой опухолеспецифичную молекулу, вирусную молекулу или любую другую молекулу, экспрессируемую на популяции клеток-мишеней, которая опосредует распознавание и удаление лимфоцитами;

полинуклеотид, кодирующий полипептидный спейсер, причем указанный спейсер обеспечивает увеличение пролиферации Т-клеток и/или выработки цитокинов в ответ на лиганд по сравнению с эталонным химерным рецептором; полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен; и полинуклеотид, кодирующий внутриклеточный

сигнальный домен. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первая нуклеиновая кислота дополнительно содержит генетическую метку.

5 [00087] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вторая нуклеиновая кислота содержит полинуклеотид, кодирующий отличающийся второй химерный антигенный рецептор. Первый и второй химерные антигенные рецепторы могут различаться по лигандсвязывающему домену, антигену-мишени, эпитопу антигена-мишени, длине и последовательности спейсера (короткий, средний или длинный) и внутриклеточным доменам для передачи сигналов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вторая нуклеиновая кислота дополнительно
10 содержит отличающуюся вторую генетическую метку, которая отличается от метки, кодируемой первой нуклеиновой кислотой.

[00088] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первая и вторая нуклеиновые кислоты в отдельной лентивирусной конструкции могут быть разделены с помощью геномной инсультаторной нуклеиновой кислоты, такой как
15 инсультаторный домена хроматина морского ежа.

[00089] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения промоторы, используемые в настоящем изобретении, могут представлять собой индуцируемые или конститутивные промоторы. Индуцируемые промоторы включают индуцируемый тамоксифеном промотор, индуцируемый тетрациклином промотор и
20 индуцируемый доксоциклином промотор (например, TRE). Конститутивные промоторы включают SV40, CMV, UBC, EF1 α , PGK и CAGG.

[00090] Один или более из указанных векторов могут быть использованы в комбинации для трандукции клеток-мишеней и обеспечивают экспрессию химерного антигенного рецептора.

25 **Трансгены**

[00091] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения предложено несколько трансгенов.

[00092] Генетические метки, описанные в настоящем изобретении, могут быть использованы для отбора, отслеживания и уничтожения клеток, трансдуцированных
30 и экспрессирующих трансген. Генетические метки могут быть использованы с любым количеством различных трансгенов. В настоящем описании представлены типичные трансгены химерных антигенных рецепторов, однако аналогичные принципы применимы к дизайну, идентификации и отбору других трансгенов, экспрессируемых в трансдуцированных клетках.

35 **Химерные антигенные рецепторы**

[00093] Некоторые химерные антигенные рецепторы могут быть использованы в других вариантах, описанных в настоящем документе.

[00094] Система для экспрессии химерного антигенного рецептора содержит первую нуклеиновую кислоту, содержащую первый промотор, соединенный с полинуклеотидом,
40 кодирующим химерный антигенный рецептор, содержащий лигандсвязывающий домен, причем указанный лигандсвязывающий домен связывается с лигандом, при этом указанный лиганд представляет собой опухолеспецифичную молекулу, вирусную молекулу или любую другую молекулу, экспрессируемую на популяции клеток-мишеней, который пригоден в качестве посредника для распознавания и устранения лимфоцитом;
45 полинуклеотид, кодирующий спейсерный полипептид, причем указанный спейсер обеспечивает увеличение пролиферации Т-клеток и/или выработки цитокинов в ответ на лиганд по сравнению с эталонным химерным рецептором; полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен; и полинуклеотид, кодирующий внутриклеточный

сигнальный домен. Согласно другим вариантам реализации другой полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор, находится под контролем конститутивного промотора.

Лигандсвязывающий домен.

5 [00095] Многие лигандсвязывающие домены могут быть использованы в других вариантах, описанных в настоящем документе.

[00096] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая химерный рецептор, содержит полинуклеотид, кодирующий лигандсвязывающий домен. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лигандсвязывающий домен специфично связывается с антигеном, специфичным для опухоли или вируса. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лигандсвязывающий домен содержит, но не ограничивается ими, рецепторы или их части, небольшие пептиды, пептидомиметики, субстраты, цитокины и тому подобное. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лигандсвязывающий домен представляет собой антитело или его фрагмент. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или фрагмент антитела, может быть легко определена. В конкретном варианте реализации настоящего изобретения полинуклеотид кодирует одноцепочечный Fv, который специфично связывается с CD19. В других конкретных вариантах реализации настоящего изобретения полинуклеотид кодирует одноцепочечный Fv, который специфично связывается с CD20, Her2, CE7, hB7H3 или EGFR. Последовательности указанных антител известны или могут быть легко определены специалистами в данной области техники.

[00097] Опухолевые антигены представляют собой белки, которые вырабатываются опухолевыми клетками, которые вызывают иммунный ответ. Выбор лигандсвязывающего домена согласно настоящему изобретению будет зависеть от типа рака, который лечат, и может быть направлен на опухолевые антигены или другие молекулы на поверхности опухолевых клеток. Образец опухоли от субъекта может быть охарактеризован для определения присутствия конкретных биомаркеров или поверхностных клеточных маркеров. Например, клетки рака молочной железы от субъекта могут быть положительными или отрицательными для каждого из Her2Neu, рецептора эстрогенов и/или рецептора прогестерона. Отбирают опухолевый антиген или поверхностную молекулу клетки, которые обнаруживают на опухолевых клетках отдельного субъекта. Опухолевые антигены и поверхностные молекулы клеток хорошо известны в данной области техники и включают, например, карциноэмбриональный антиген (CEA), специфичный антиген простаты, PSMA, Her2/Neu, рецептор эстрогенов, рецептор прогестерона, ephrinB2, CD19, CD171, EGFR, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, CE7, hB7H3, ROR1, мезотелин, c-Met, GD-2 и/или MAGE A3 TCR. Согласно некоторым вариантам реализации молекула-мишень представляет собой молекулу на поверхности клеток, которая находится на опухолевых клетках и по существу не обнаруживается на нормальных тканях, или ее экспрессия ограничена невитальными нормальными тканями.

[00098] Согласно другому варианту молекула-мишень на опухоли содержит один или более эпитопов, связанных со злокачественной опухолью. Злокачественные опухоли экспрессируют ряд белков, которые могут служить в качестве антигенов-мишеней для распознавания, опосредованного T-клеточным рецептором или химерным рецептором. Другие молекулы-мишени относятся к группе молекул, связанных с трансформацией клеток, таких как CD19 или CD20. Согласно некоторым вариантам реализации

настоящего изобретения опухолевый антиген селективно экспрессируется или сверхэкспрессируется на клетках опухоли по сравнению с контрольными клетками этого же типа ткани. В других вариантах реализации настоящего изобретения опухолевый антиген представляет собой поверхностный полипептид клеток.

5 [00099] После определения поверхностной молекулы опухолевой клетки, которая может являться мишенью химерного рецептора, отбирают и описывают эпитоп молекулы-мишени. Антитела, которые специфично связываются с поверхностной молекулой опухолевых клеток, могут быть получены с применением способов получения моноклональных антител, способов фагового дисплея, основных способов получения антител человека или гуманизированных антител, или способов с применением 10 трансгенного животного или растения, модифицированного для получения антител человека. Библиотеки фагового дисплея частично или полностью синтетических антител доступны и могут быть подвергнуты скринингу для определения антитела или его фрагмента, который может связываться с молекулой-мишенью. Также доступны фаговые библиотеки антител человека. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела специфично связываются с поверхностной молекулой опухолевой клетки и не вступают в перекрестные реакции с неспецифичными компонентами, такими как бычий сывороточный альбумин, или другими неродственными антигенами. После выявления аминокислотной последовательности или полинуклеотидной 15 последовательности, кодирующей антитело, указанные последовательности могут быть выделены и/или определены. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения библиотеки фагового дисплея частично или полностью синтетических антител подвергают скринингу для определения антитела или его фрагмента, который может связываться с молекулой-мишенью.

25 [000100] Антитела или антигенсвязывающие фрагменты включают полноразмерные поликлональные антитела, моноклональное антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, синтетическое антитело, химерное антитело, биспецифичное антитело, минитело и линейное антитело или их части. Фрагменты антитела содержат часть интактного антитела, предпочтительно антигенсвязывающую или вариабельную 30 область интактного антитела и могут быть легко получены. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диантитела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител и полиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител.

35 [000101] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения несколько различных антител, которые связываются с конкретными поверхностными молекулами опухолевых клеток, могут быть выделены и описаны. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела описывают на основании специфичности эпитопа молекулы-мишени. Кроме того, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, антитела, которые связываются аналогичным 40 эпитопом, могут быть выбраны на основании аффинности антитела в отношении указанного эпитопа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аффинность антитела составляет по меньшей мере 1 мМ, предпочтительно <50 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выбрано антитело, которое имеет более высокую аффинность в отношении эпитопа по сравнению с другими антителами. Например, выбрано антитело, величина аффинности которого по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, или по меньшей мере 45 50 раз выше величины аффинности эталонного антитела, которое связывается с

аналогичным эпитопом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выбрано антитело, величина аффинности которого по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, или по меньшей мере в 50 раз выше
5 величины аффинности эталонного антитела, которое связывается с аналогичным эпитопом, или величина аффинности которого находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя из перечисленных заданных значений.

[000102] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения молекулы-мишени выбирают из CD19, CD20, CD22, CD23, CE7, hB7H3, EGFR, CD123,
10 CS-1, ROR1, мезотелина, Her2, c-Met, PSMA, GD-2 и/или MAGE A3 TCR и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации, если желательной является конструкция CAR Her2, генетическая метка содержит эпитоп, который не связывается с scFv, специфичным в отношении Her2, используемым в конструкции CAR. Согласно некоторым вариантам реализации, если желательной является конструкция EGFR CAR,
15 генетическая метка содержит эпитоп, который не связывается с scFv, специфичным в отношении EGFR, используемым в конструкции CAR.

[000103] В конкретных вариантах реализации антиген-мишень представляет собой CD19. Ряд антител, специфичных в отношении CD19, известны специалистам в данной области техники и могут быть легко охарактеризованы в отношении
20 последовательности, параметров связывания эпитопа и аффинности. В конкретном варианте реализации конструкция химерного рецептора содержит последовательность scFv из антитела FMC63. Согласно другим вариантам реализации scFv представляет собой scFv человека или гуманизированный scFv, содержащий вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность RASQDISKYLN гипервариабельного
25 участка CDRL1 (SEQ ID NO: 27), последовательность SRLHSGV участка CDRL2 (SEQ ID NO: 28) и последовательность GNTLPYTFG участка CDRL3 (SEQ ID NO: 29). Согласно другим вариантам реализации scFv представляет собой scFv человека или гуманизированный scFv, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность DYGVS участка CDRH1 (SEQ ID NO: 30), последовательность
30 VIWGSETTYNSALKS участка CDRH2 (SEQ ID NO: 31) и последовательность YAMDY участка CDRH3 (SEQ ID NO: 32). В область настоящего изобретения также включены вариабельные области, аминокислотные последовательности которых по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны аминокислотной последовательности scFv из антитела FMC63, или процент идентичности
35 последовательностей находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя из указанных выше процентных значений, и которые имеют по меньшей мере аналогичную аффинность в отношении CD19.

[000104] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гипервариабельные участки (CDR) находятся в пределах областей антитела и нумеруются
40 в соответствии с системой нумерации по Кабат следующим образом: для легкой цепи; аминокислоты 24-34 CDRL1; аминокислоты 50-56 CDRL2; аминокислоты 89-97 CDRL3; для тяжелой цепи, аминокислоты 31-35 CDRH1; аминокислоты 50-65; CDRH2 и аминокислоты 95-102 CDRH3. Участки CDR в антителах могут быть легко определены.

[000105] Согласно некоторым вариантам реализации антиген-мишень представляет собой CD20. Ряд антител, специфичных в отношении CD20, известны специалистам в данной области техники и могут быть легко охарактеризованы в отношении
45 последовательности, параметров связывания эпитопа и аффинности. Согласно конкретному варианту реализации конструкция химерного рецептора содержит

последовательность scFv, представленную в таблице 9. Согласно другим вариантам реализации scFv представляет собой scFv человека или гуманизированный scFv, содержащий вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность RASSSVNYMD CDRL1 (SEQ ID NO: 33), последовательность ATSNLAS CDRL2 (SEQ ID NO: 34) и последовательность QQWSFNPT CDRL3 (SEQ ID NO: 35). Согласно другим вариантам реализации scFv представляет собой scFv человека или гуманизированный scFv, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SYNMH CDRH1 (SEQ ID NO: 36), AIYPGNGDTSYNQKFKG CDRH2 (SEQ ID NO: 37) и последовательность SNYYGSSYWFFDV CDRH3 (SEQ ID NO: 38). Последовательности CDR могут быть легко определены из аминокислотной последовательности scFv. В область настоящего изобретения также включены вариабельные области, аминокислотные последовательности которых по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны аминокислотной последовательности scFv, специфичного в отношении CD20, или процент идентичности последовательностей находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя из указанных выше процентных значений, и которые имеют по меньшей мере аналогичную аффинность в отношении CD20.

[000106] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий лигандсвязывающий домен, функционально соединен с полинуклеотидом, кодирующим спейсерный участок. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий лигандсвязывающий домен, также может содержать один или более сайтов рестрикции на 5'- и/или 3'-концах кодирующей последовательности, чтобы обеспечить легкое удаление и замену полинуклеотида другим полинуклеотидом, кодирующим лигандсвязывающий домен, кодирующий другой антиген или обладающий другими характеристиками связывания. Например, последовательность, кодирующая сайт рестрикции, NheI, введена в направлении 5'-конца относительно лидерной последовательности; и 3'-концевой сайт рестрикции RsrII, расположенный в шарнирной области, обеспечивает субклонирование любого желаемого scFv в вектор, несущий химерный рецептор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения кодоны полинуклеотида оптимизированы для экспрессии в клетках млекопитающих. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения кодоны полинуклеотида оптимизированы для экспрессии в клетках человека.

[000107] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий лигандсвязывающий домен, функционально соединен с сигнальным пептидом. Согласно некоторым вариантам реализации сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид гранулоцитарного колониестимулирующего фактора. Могут быть использованы полинуклеотиды, кодирующие другие сигнальные пептиды, такие как CD8 альфа.

[000108] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий лигандсвязывающий домен, функционально соединен с промотором. Подходящий промотор обеспечивает экспрессию химерного антигенного рецептора в клетке млекопитающего. Согласно конкретному варианту реализации промотор представляет собой индуцируемый промотор.

[000109] Конкретный вариант полинуклеотида, кодирующего лигандсвязывающий домен, представлен в таблице 1 в виде scFv из антитела, которое специфично связывается с CD19, такого как FMC63. Полинуклеотид, кодирующий гибкий линкер, содержащий аминокислоты GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 39), отделяет цепи VH и VL в

scFv. Аминокислотная последовательность scFv, включая линкер, представлена в таблице 1. (SEQ ID NO: 2) Известны другие CD19-специфичные антитела, такие как SJ25C1 и HD37. (SJ25C1: Bejcek et al. Cancer Res 2005, PMID 7538901; HD37: Pezutto et al. JI 1987, PMID 2437199).

- 5 [000110] Конкретный вариант полинуклеотида, кодирующего лигандсвязывающий домен, представлен в таблице 9 в виде scFv из антитела, которое специфично связывается с CD20. Полинуклеотид, кодирующий гибкий линкер, содержащий аминокислоты GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 39), отделяет цепи VH и VL в scFv. Аминокислотная последовательность scFv представлена в таблице 9 (SEQ ID NO: 25).
- 10 Известны другие CO20-специфичные антитела, такие как 1F5 (Budde et al. 2013, PLOS One).

Спейсер

- [000111] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая химерный рецептор, содержит полинуклеотид, кодирующий спейсерный участок. Как правило, спейсерный участок находится между лигандсвязывающим доменом и трансмембранным доменом химерного рецептора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсерный участок обеспечивает гибкость лигандсвязывающего домена и высокие уровни экспрессии в лимфоцитах. CD19-специфичный химерный рецептор, содержащий спейсер, который состоит из 229 аминокислот, обладал более низкой противоопухолевой активностью, чем CD19-специфичный химерный рецептор с коротким спейсерным участком, состоящим только из модифицированной шарнирной области IgG4.
- 15
- 20

- [000112] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсерный участок содержит по меньшей мере от 10 до 229 аминокислот, от 10 до 200 аминокислот, от 10 до 175 аминокислот, от 10 до 150 аминокислот, от 10 до 125 аминокислот, от 10 до 100 аминокислот, от 10 до 75 аминокислот, от 10 до 50 аминокислот, от 10 до 40 аминокислот, от 10 до 30 аминокислот, от 10 до 20 аминокислот или от 10 до 15 аминокислот, или его длина находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя из указанных значений длины аминокислотной последовательности спейсера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсерный участок содержит 12 аминокислот или менее, но более 1 аминокислоты, 119 аминокислот или менее, но более 1 аминокислоты, или 229 аминокислот или менее, но более 1 аминокислоты.
- 25
- 30

- [000113] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсерный участок получен из шарнирной области иммуноглобулин-подобной молекулы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсерный участок содержит полноразмерную шарнирную область IgG1 человека, IgG2 человека, IgG3 человека или IgG4 человека или ее часть, и может содержать одну или более замен аминокислот. Типичные последовательности шарнирных областей представлены в таблице 5. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения часть шарнирной области содержит аминокислоты из верхней части шарнирной области, обнаруженные между переменной областью тяжелой цепи и остовом, и аминокислоты остова шарнирной области, включая область полипролина.
- 35
- 40

- [000114] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательности шарнирной области могут быть модифицированы в одной или более аминокислотах, чтобы избежать нежелательных структурных взаимодействий, таких как димеризация. Согласно конкретному варианту реализации спейсерный участок содержит часть модифицированной шарнирной области человека из IgG4, например,
- 45

представленную в таблице 1 или таблице 5 (SEQ ID NO: 10). Типичный полинуклеотид, кодирующий часть модифицированной шарнирной области IgG4, представлен в таблице 1. (SEQ ID NO: 1). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность шарнирной области может быть по меньшей мере

5 приблизительно на 90%, 92%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности шарнирной области, представленной в таблице 1 или таблице 5. Согласно другому варианту часть шарнирной области человека из IgG4 содержит замену аминокислоты в аминокислотной последовательности остова, такую как замена CPSP с образованием CPPC.

10 [000115] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полноразмерную шарнирную область или ее часть комбинируют с одним или более доменами константной области иммуноглобулина. Например, часть шарнирной области может быть комбинирована с полноразмерной или частью области CH2 или CH3, или ее варианта. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения

15 спейсерный участок не включает последовательность шарнирной области, состоящую из 47-48 аминокислот, из CD8-альфа или спейсерного участка, содержащего внеклеточную часть молекулы CD28.

[000116] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения короткий спейсерный участок содержит приблизительно 12 аминокислот или менее, но

20 более 1 аминокислоты, и содержит полноразмерную или часть последовательности шарнирной области IgG4 или ее варианта, промежуточный спейсерный участок содержит приблизительно 119 аминокислот или менее, но более 1 аминокислоты, и содержит полноразмерную или часть последовательности шарнирной области IgG4 и область CH3 или ее вариант, и длинный спейсер содержит приблизительно 229 аминокислот

25 или менее, но более 1 аминокислоты, и содержит полноразмерную или часть последовательности шарнирной области IgG4, область CH2 и область CH3 или ее вариант.

[000117] Полинуклеотид, кодирующий спейсерный участок, может быть легко получен с помощью синтетических или рекомбинантных способов из аминокислотной

30 последовательности. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий спейсерный участок, функционально соединен с полинуклеотидом, кодирующим трансмембранный участок. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий спейсерный участок, также может содержать один или более сайтов рестрикции на 5'- и/или 3'-концах

35 кодирующей последовательности, чтобы обеспечить легкое удаление и замену полинуклеотида другим полинуклеотидом, кодирующим другой спейсерный участок. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения кодоны полинуклеотида, кодирующего спейсерный участок, оптимизированы для экспрессии в клетках млекопитающих. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего

40 изобретения кодоны полинуклеотида, кодирующего спейсерный участок, оптимизированы для экспрессии в клетках человека.

[000118] Согласно другому варианту спейсерный участок выбран из последовательности шарнирной области из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или его части, последовательности шарнирной области из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 в комбинации с

45 полноразмерной или частью области CH2 или ее варианта, последовательности шарнирной области из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 в комбинации с полноразмерной или частью области CH3 или ее варианта, и последовательности шарнирной области из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 в комбинации с полноразмерной или частью области CH2

или ее варианта, и области СНЗ или ее варианта. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения короткий спейсерный участок представляет собой модифицированную последовательность шарнирной области IgG4 (SEQ ID NO: 10), содержащую 12 аминокислот или менее, но более 1 аминокислоты, промежуточная последовательность представляет собой последовательность шарнирной области IgG4 в комбинации с последовательностью СНЗ, содержащей 119 аминокислот или менее, но более 1 аминокислоты; или последовательность шарнирной области IgG4 в комбинации с областью СН2 и СНЗ, содержащей 229 аминокислот или менее, но более 1 аминокислоты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения короткий спейсерный участок содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислот или длина аминокислотного участка находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя из вышеуказанных длин аминокислотных участков. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения средний спейсерный участок содержит 13, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 или 119 аминокислот или длина аминокислотного участка находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя из вышеуказанных длин аминокислотных участков. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсерный участок содержит 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210 или 219 аминокислот или длина аминокислотного участка находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя из вышеуказанных длин аминокислотных участков.

Трансмембранный домен.

[000119] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая химерный рецептор, содержит полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен. Трансмембранный домен обеспечивает закрепление химерного рецептора в мембране. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен химерного антигенного рецептора отличается от такового генетической метки.

[000120] Согласно другому варианту трансмембранный домен в природных условиях связан с одним из доменов в химерном рецепторе. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть выбран или модифицирован путем замены аминокислоты, чтобы избежать связывания указанных доменов с трансмембранными доменами аналогичных или других поверхностных мембранных белков, чтобы свести к минимуму взаимодействие с другими членами рецепторного комплекса.

[000121] Трансмембранный домен может быть получен из природного или синтетического источника. В случае если источник является природным, домен может быть получен из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. Трансмембранные участки содержат по меньшей мере трансмембранный участок(и) альфа, бета или дзета-цепи рецептора Т-клеток, CD28, CD3, CD45, CD4, CD8, CD9, CD16, CD22; CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и/или CD154. Согласно конкретному варианту реализации трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность трансмембранного домена CD28, представленную в таблице 2. Типичная полинуклеотидная последовательность, кодирующая трансмембранный домен CD28, представлена в таблице 1 (SEQ ID NO: 2).

[000122] Трансмембранный домен может быть синтетическим или представлять собой вариант природного трансмембранного домена. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения синтетические трансмембранные домены или их варианты содержат преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная

последовательность трансмембранного домена может быть по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности трансмембранного домена, представленной в таблице 2 или таблице 6, или процент идентичности последовательностей находится в диапазоне между любыми двумя из указанных выше процентных значений. Варианты трансмембранных доменов предпочтительно имеют оценку гидрофобности по меньшей мере 50, вычисленную по шкале Kyte Doolittle.

[000123] Полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен, может быть легко получен синтетическими или рекомбинантными способами. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен, функционально соединен с полинуклеотидом, кодирующим внутриклеточный участок для передачи сигналов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен, также может содержать один или более сайтов рестрикции на 5'- и/или 3'-концах кодирующей последовательности, чтобы обеспечить легкое удаление и замену полинуклеотида, кодирующего трансмембранный домен, другим полинуклеотидом, кодирующим другой трансмембранный домен. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения кодоны полинуклеотида, кодирующего трансмембранный домен, оптимизированы для экспрессии в клетках млекопитающих, предпочтительно клетках человека.

Внутриклеточный сигнальный домен.

[000124] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая химерный рецептор, содержит полинуклеотид, кодирующий внутриклеточный сигнальный домен. Внутриклеточный сигнальный домен обеспечивает активацию одной функции транедуцированной клетки, экспрессирующей химерный рецептор, после связывания с лигандом, который экспрессируется на опухолевых клетках. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит один или более внутриклеточных сигнальных доменов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения внутриклеточный сигнальный домен представляет собой часть и/или вариант внутриклеточного сигнального домена, который обеспечивает активацию по меньшей мере одной функции транедуцированной клетки.

[000125] Примеры внутриклеточных сигнальных доменов для применения в химерных рецепторах согласно настоящему изобретению включают цитоплазматические последовательности дзета-цепи CD3 и/или корецепторы, которые действуют согласованно, чтобы инициировать передачу сигналов после взаимодействия с химерным рецептором, а также любое производное или вариант указанных последовательностей и любой синтетической последовательности, которая имеет аналогичную функциональную способность. Можно утверждать, что активация Т-клеток опосредована двумя различными классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, которые иницируют первичную антигензависимую активацию и обеспечивают сигнал, сходный с таковым от Т-клеточных рецепторов (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и те, которые действуют антигеннезависимым способом, чтобы обеспечить вторичный или костимуляторный сигнал (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности). Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые оказывают стимулирующее действие, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или

ИТАМ. Примеры ИТАМ, содержащих первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, включают те, которые получены из CD3-дзета, FcR гамма, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и/или CD66d. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первичный внутриклеточный 5 сигнальный домен может иметь по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичность последовательности с дзета-цепью CD3, содержащей последовательность, представленную в таблице 4, или процент идентичности последовательностей находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя из указанных выше процентных значений. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения CD3- 10 дзета сохраняет по меньшей мере один, два, три или все участки ИТАМ, представленные в таблице 4.

[000126] В предпочтительном варианте реализации внутриклеточный сигнальный домен химерного рецептора может быть разработан так, чтобы содержать сигнальный домен CD3-дзета по отдельности или в комбинации с любым другим желательным 15 цитоплазматическим доменом(ами). Например, внутриклеточный сигнальный домен химерного рецептора может содержать дзета-цепь CD3 и костимулирующий сигнальный участок.

[000127] Костимулирующий сигнальный участок относится к части химерного рецептора, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. 20 Костимулирующая молекула представляет собой поверхностную молекулу клеток, отличную от рецептора антигена или его лигандов, которая необходима для ответа лимфоцитов на антиген. Примеры подходящих молекул включают CD27, CD28, 4-1BB (CD 137), OX40, CD30, CD40, ассоциированный с функцией лимфоцитов антиген 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ассоциированную с дзета-цепью протеинкиназу 25 (Zap70) и/или лиганд, который специфично связывается с CD83. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность костимулирующего сигнального домена может быть по меньшей мере на 80%, 85%, 90% или 95% идентична аминокислотной последовательности внутриклеточного домена CD28, представленного в таблице 2, или последовательности 4-1BB, содержащий 30 последовательность, представленную в таблице 3, или процент идентичности последовательностей находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя из указанных выше процентных значений. Согласно другому варианту вариант внутриклеточного домена CD28 содержит замену аминокислоты в положениях 186-187, в которых LL замещены GG.

[000128] Внутриклеточные сигнальные последовательности химерного рецептора могут быть связаны друг с другом в произвольном или указанном порядке. При 35 необходимости, короткий олиго- или полипептидный линкер, предпочтительно содержащий от 2 до 10 аминокислот в длину, может образовывать связь. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения короткий олиго- или 40 полипептидный линкер содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот или количество аминокислот, которое находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя из указанных выше значений. Согласно другому варианту внутриклеточные сигнальные домены содержат полноразмерный или часть сигнального домена дзета-цепи CD3 или ее варианта, и полноразмерный или часть сигнального домена CD28 или его варианта. 45 Согласно другому варианту внутриклеточный сигнальный домен содержит полноразмерный или часть сигнального домена дзета-цепи CD3 или ее варианта, и полноразмерный или часть сигнального домена 4-1BB или его варианта. Согласно другому варианту внутриклеточный сигнальный домен содержит полноразмерный или

часть сигнального домена дзета-цепи CD3 или ее варианта, полноразмерный или часть сигнального домена CD28 или его варианта, и полноразмерный или часть сигнального домена 4-1BB или его варианта. Согласно конкретному варианту реализации аминокислотная последовательность внутриклеточного сигнального домена, содержащего вариант дзета-цепи CD3 и часть внутриклеточного сигнального домена 4-1BB, представлена в таблице 1. Типичная последовательность нуклеиновой кислоты представлена в таблице 1 (в пределах последовательности SEQ ID NO: 2).

[000129] Согласно другому варианту полинуклеотид, кодирующий внутриклеточный сигнальный домен, содержит внутриклеточный домен 4-1BB, соединенный с частью домена дзета-цепи CD3. Согласно другим вариантам внутриклеточный домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD28 соединены с частью домена дзета-цепи CD3.

[000130] Полинуклеотид, кодирующий внутриклеточный сигнальный домен, может быть легко получен из аминокислотной последовательности с помощью синтетических или рекомбинантных способов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий внутриклеточный сигнальный домен, также может содержать один или более сайтов рестрикции на 5'- и/или 3'-концах кодирующей последовательности, чтобы обеспечить легкое удаление и замену полинуклеотида, кодирующего внутриклеточный сигнальный домен, другим полинуклеотидом, кодирующим другой внутриклеточный сигнальный домен. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения кодоны полинуклеотида, кодирующего внутриклеточный сигнальный домен, оптимизированы для экспрессии в клетках млекопитающих. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения кодоны полинуклеотида, кодирующего внутриклеточный сигнальный домен, оптимизированы для экспрессии в клетках человека.

Линкерные домены.

[000131] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкерный домен обеспечивает подвижность доменов в конструкции CAR. Как будет показано ниже, линкер (SEQ ID NO: 45) между доменом IV и трансмембранным доменом Her2t обеспечивает конструкцию Her2tG. Линкер используют для придания подвижности белковым доменам. В других примерах scFv многих CAR содержат четыре последовательные субъединицы G3S, помещенные между доменами VH и VL из scFv CAR. Это обеспечивает гибкость при складывании двух доменов scFv. В примерном варианте реализации рациональное использование двух линкерных субъединиц G3S сможет придать повышенную гибкость Her2tG.

[000132] Две линкерные субъединицы G3S, соединенные в один домен (SEQ ID NO: 45), также применяли для имитации длины спейсера шарнирной области CD28 и шарнирной области IgG4. Шарнирную область CD28 и шарнирную область IgG4 ранее использовали в качестве линкера между scFv и трансмембранным участком в CAR, которые являются функциональными. Шарнирная область CD28 и шарнирная область IgG4 содержат цистеин, облегчающий димеризацию. Несмотря на то, что это обеспечивает преимущества для CAR, димеризация может ингибировать гибкость Her2t и вследствие этого препятствует существенному распознаванию герцептином. Преимущество использования двух линкеров G3S (SEQ ID NO: 45), по сравнению с тремя или четырьмя, заключается в том, чтобы уменьшить полезную нагрузку вектора, устранить потенциально ненужные последовательности и в то же время добиться расширенных функциональных возможностей.

[000133] Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, причем указанный выделенный полипептид по

меньшей мере на 95% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her, и внеклеточный домен полипептида Her2, содержащий последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединен с трансмембранным доменом последовательностью, содержащей аминокислоты GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб.

25 Клетки-хозяева и композиции: популяции Т-лимфоцитов.

[000134] Композиции, описанные в настоящем изобретении, обеспечивают генетически модифицированные клетки-хозяева совместно с векторами и/или конструкциями, описанными в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-лимфоциты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки-предшественники Т-лимфоцитов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой гемопоэтические стволовые клетки.

[000135] Т-лимфоциты могут быть собраны в соответствии с известными методиками и обогащены или истощены с помощью известных методик, таких как аффинное связывание с антителами, например, с помощью проточной цитометрии и/или иммуномагнитной сортировки. После этапов обогащения и/или истощения размножение желаемых Т-лимфоцитов в условиях *in vitro* можно осуществлять в соответствии с известными методиками или их вариантами, которые будут очевидны специалистам в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Т-клетки представляют собой аутогенные Т-клетки, полученные от пациента.

[000136] Например, желаемая популяция Т-клеток или субпопуляция может быть размножена путем добавления исходной популяции Т-лимфоцитов к культуральной среде в условиях *in vitro*, с последующим добавлением к культуральной среде фидерных клеток, таких как непролиферирующие мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), (например, так, что конечная популяция клеток содержит по меньшей мере 5, 10, 20 или 40 или более фидерных клеток МКПК или количество, которое находится

в пределах диапазона, определенного любыми двумя из указанных количеств для каждого Т-лимфоцита в исходной популяции, которую размножают); и инкубации культуры (например, в течение времени, достаточного для размножения Т-клеток). Непролиферирующие фидерные клетки могут включать фидерные клетки МКПК, облученные гамма-лучами. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения МКПК облучают гамма-лучами в диапазоне от 3000 до 3600 рад, чтобы предотвратить деление клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения МКПК облучают гамма-лучами с интенсивностью 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500 или 3600 рад или с применением любого значения интенсивности, которое находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя конечными точками из перечисленных значений, чтобы предотвратить деление клеток. Порядок добавления Т-клеток и фидерных клеток к культуральной среде может быть полностью изменен, при необходимости. Культуру, как правило, можно инкубировать при температуре и других условиях, которые пригодны для размножения Т-лимфоцитов. Для размножения Т-лимфоцитов человека, например, температура обычно будет по меньшей мере 25 градусов по Цельсию, предпочтительно по меньшей мере 30 градусов, более предпочтительно приблизительно 37 градусов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения температура для размножения Т-лимфоцитов человека составляет 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 37 градусов по Цельсию или соответствует любому другому значению температуры между любыми двумя конечными точками любого из перечисленных значений.

[000137] Размноженные Т-лимфоциты включают $CD8^+$ цитотоксичные Т-лимфоциты (CTL) и $CD4^+$ хелперные Т-лимфоциты, которые могут быть специфичными в отношении антигена, присутствующего на опухоли человека или патогене.

[000138] При необходимости способ размножения может дополнительно включать этап добавления неопролиферирующих EBV-трансформированных лимфобластных клеток (LCL) в качестве фидерных клеток. LCL могут быть облучены гамма-лучами в диапазоне от 6000 до 10000 рад. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения LCL облучают гамма-лучами с интенсивностью 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500 или 10000 рад или с любым значением интенсивности, которое находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя конечными точками из перечисленных значений, чтобы предотвратить деление клеток. Фидерные клетки LCL могут быть обеспечены в любом подходящем количестве, так, что соотношение фидерных клеток LCL и исходных Т-лимфоцитов составляет по меньшей мере приблизительно 10:1.

[000139] При необходимости способ размножения может дополнительно включать этап добавления антитела к CD3 и/или антитела к CD28 к культуральной среде (например, в концентрации по меньшей мере около 0,5 нг/мл). При необходимости способ размножения может дополнительно включать этап добавления ИЛ-2 и/или ИЛ-15 к культуральной среде (например, концентрация ИЛ-2 составляет по меньшей мере приблизительно 10 Ед/мл).

[000140] После выделения Т-лимфоцитов цитотоксические и хелперные Т-лимфоциты могут быть рассортированы перед или после этапа размножения на субпопуляции наивных Т-клеток, Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток.

[000141] $CD8^+$ клетки могут быть получены с применением стандартных способов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения $CD8^+$ клетки далее сортируют на наивные клетки, клетки центральной памяти и клетки эффекторной

памяти путем идентификации поверхностных антигенов клеток, которые связаны с каждым из указанных типов CD8⁺ клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Т-клетки памяти присутствуют в обеих подгруппах, CD62L⁺ и CD62L⁻, CD8⁺ лимфоцитов периферической крови. МКПК сортируют на CD62L⁻CD8⁺ и CD62L⁺CD8⁺ фракции после окрашивания с применением антител к CD8 и антител к CD62L. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения экспрессия фенотипических маркеров T_{CM} центральной памяти включает CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и CD127 и уровень экспрессии гранзима В является низким или отсутствует. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Т-клетки центральной памяти представляют собой CD45RO⁺CD62L⁺, CD8⁺ Т-клетки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения эффекторные T_E являются отрицательными в отношении экспрессии CD62L, CCR7, CD28 и CD 127 и положительными в отношении экспрессии гранзима В и перфорина. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения наивные CD8⁺ Т-лимфоциты характеризуются экспрессией фенотипических маркеров наивных Т-клеток, включая CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD 127 и CD45RA.

[000142] Хелперные CD4⁺ Т-клетки сортируют на наивные Т-клетки, Т-клетки центральной памяти и эффекторные Т-клетки путем выявления клеточных популяций, которые несут поверхностные антигены клеток. CD4⁺ лимфоциты могут быть получены стандартными способами. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения наивные CD4⁺ Т-лимфоциты включают CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺ и CD4⁺ Т-клетки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения CD4⁺ клетки центральной памяти включают CD62L⁺ и CD45RO⁺ клетки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения эффекторные CD4⁺ клетки включают CD62L⁻ и CD45RO⁻ клетки.

[000143] Является ли клетка или клеточная популяция положительной в отношении конкретного поверхностного маркера клеток, можно определить методом проточной цитометрии путем окрашивания специфичными антителами к поверхностному маркеру и соответствующим антителом для контроля изотипа. Клеточная популяция, отрицательная в отношении экспрессии маркера, относится к отсутствию значительного окрашивания клеточной популяции специфичным антителом, по сравнению с окрашиванием антителом для контроля изотипа, положительная популяция относится к равномерному окрашиванию популяции клеток, по сравнению с окрашиванием антителом для контроля изотипа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения снижение экспрессии одного или более маркеров относится к уменьшению средней интенсивности флуоресценции на величину 1 log10 и/или уменьшению процента клеток, которые несут маркер, составляющему по меньшей мере 20% клеток, 25% клеток, 30% клеток, 35% клеток, 40% клеток, 45% клеток, 50% клеток, 55% клеток, 60% клеток, 65% клеток, 70% клеток, 75% клеток, 80% клеток, 85% клеток, 90% клеток, 95% клеток и 100% клеток и любую величину от 20 до 100%, по сравнению с эталонной популяцией клеток, или любую величину, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми из указанных выше значений, по сравнению с эталонной популяцией клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего

изобретения популяция клеток, положительная в отношении экспрессии одного или более маркеров, относится к проценту клеток, которые несут маркер, составляющему по меньшей мере 50% клеток, 55% клеток, 60% клеток, 65% клеток, 70% клеток, 75% клеток, 80% клеток, 85% клеток, 90% клеток, 95% клеток и 100% клеток и любой процент в пределах диапазона, определенного любыми двумя из указанных выше процентных значений, по сравнению с эталонной популяцией клеток.

[000144] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения популяции CD4⁺ и CD8⁺, которые являются антигенспецифичными, могут быть получены путем стимуляции наивных или антигенспецифичных Т-лимфоцитов антигеном. Например, антигенспецифичные линии Т-клеток или клоны могут быть получены для антигенов цитомегаловируса путем выделения Т-клеток от инфицированных субъектов и путем стимуляции клеток аналогичным антигеном в условиях *in vitro*. Также могут быть использованы наивные Т-клетки. Любое количество антигенов из опухолевых клеток может быть использовано в качестве мишеней для индукции Т-клеточных реакций. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиции для адоптивной клеточной иммунотерапии можно применять при лечении заболевания или расстройства, включая солидные опухоли, гематологические злокачественные опухоли, рак молочной железы или меланому.

Модификация популяций Т-лимфоцитов.

[000145] Согласно некоторым вариантам реализации желательным может быть введение функциональных генов в Т-клетки, которые будут применять в иммунотерапии в соответствии с настоящим изобретением. Например, введенный ген или гены могут улучшить эффективность терапии путем стимулирования жизнеспособности и/или функции перенесенных Т-клеток; или они могут обеспечить генетический маркер для отбора и/или оценки выживаемости или миграции в условиях *in vivo*; или они могут включать функции, которые улучшают безопасность иммунотерапии, например, путем придания клетке восприимчивости к контролируемой экспрессии трансгена. Введение гена можно осуществлять в соответствии с известными методиками, которые будут очевидны специалистам в данной области техники на основании настоящего описания.

[000146] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Т-клетки модифицированы с применением вектора, кодирующего генетические метки, описанные в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки модифицированы с применением вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор, функционально соединенный с генетической меткой. Согласно другим вариантам реализации клетки модифицированы с применением вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий только генетическую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Т-клетки получают от субъекта, подлежащего лечению. Согласно другому варианту лимфоциты получают от аллогенных доноров-людей, предпочтительно здоровых доноров-людей.

[000147] Химерные рецепторы могут быть сконструированы так, чтобы обладать специфичностью в отношении любого поверхностного маркера клеток благодаря использованию антигенсвязывающих фрагментов или переменных областей антител, например, молекул антител. Антигенсвязывающие молекулы могут быть связаны с одним или более модулями для передачи сигналов в клетке. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения модули для передачи сигналов в клетке включают трансмембранный домен CD3, внутриклеточные сигнальные домены CD3 и трансмембранные домены CD28. Согласно некоторым вариантам реализации

настоящего изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит трансмембранный и сигнальный домены CD28, соединенные с внутриклеточным доменом дзета-цепи CD3.

5 [000148] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аналогичный или другой химерный рецептор может быть введен в каждую из популяций CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный рецептор в каждой из указанных популяций содержит лигандсвязывающий домен, который специфично связывается с аналогичным лигандом на опухоли или инфицированной клетке или с другим антигеном или эпитопом. Модули 10 для передачи сигналов в клетке могут различаться. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения внутриклеточный сигнальный домен CD8⁺ цитотоксических Т-клеток аналогичен внутриклеточному сигнальному домену CD4⁺ Т-хелперов. Согласно другим вариантам реализации внутриклеточный сигнальный 15 домен CD8⁺ цитотоксических Т-клеток отличается от внутриклеточного сигнального домена CD4⁺ Т-хелперов. Каждый химерный рецептор функционально соединен с отличающейся генетической меткой, что обеспечивает отбор и выявление трансдуцированных клеток, экспрессирующих оба химерных антигенных рецептора.

20 [000149] Другие варианты включают способы изготовления композиций, содержащих клетки-хозяева, описанные в настоящем изобретении. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ включает введение в клетку-хозяина выделенной нуклеиновой кислоты, такой как нуклеиновая кислота, кодирующая выделенный полипептид, который по меньшей мере на 95% идентичен 25 последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 511 по 652 или с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2; и культивирование клеток-хозяев в среде, 30 содержащей по меньшей мере один фактор роста. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает отбор клеток-хозяев для экспрессии Her2t до или после или как до, так и после, и после этапа культивирования. Согласно другим вариантам реализации способ изготовления дополнительно включает введение в клетку-хозяина второй нуклеиновой кислоты, 35 кодирующей второй химерный антигенный рецептор и вторую генетическую метку. Согласно некоторым вариантам реализации способ дополнительно включает отбор клеток-хозяев для экспрессии второй генетической метки до или после или как до, так и после, и после этапа культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки-предшественники 40 Т-лимфоцитов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой гемопоэтические стволовые клетки.

[000150] Согласно другим вариантам реализации способ включает введение в первую клетку-хозяина первой выделенной нуклеиновой кислоты, такой как нуклеиновая 45 кислота, кодирующая выделенный полипептид, который по меньшей мере на 95% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 511 по 652 или с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2; отбор первой популяции

клеток-хозяев, которые экспрессируют Her2t, введение второй нуклеиновой кислоты, кодирующей второй химерный антигенный рецептор и вторую генетическую метку, во вторую клетку-хозяина, отбор второй популяции клеток-хозяев для экспрессии второй генетической метки и необязательно культивирование первой и второй популяций
 5 клеток-хозяев в среде, содержащей по меньшей мере один фактор роста. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиция включает первую и вторую популяции клеток-хозяев. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки-предшественники Т-лимфоцитов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения
 10 клетки-хозяева представляют собой гемопоэтические стволовые клетки.

[000151] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения каждый из CD4 или CD8 Т-лимфоцитов может быть отсортирован в группу наивных Т-клеток, Т-клеток центральной памяти, Т-клеток эффекторной памяти или эффекторных клеток перед трансдукцией, описанной в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам
 15 реализации настоящего изобретения каждый из CD4 или CD8 Т-лимфоцитов может быть отсортирован в группу наивных Т-клеток, Т-клеток центральной памяти, Т-клеток эффекторной памяти или эффекторных клеток после трансдукции.

[000152] Как описано в настоящем изобретении, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения наивные CD4⁺ клетки представляют собой CD45RO⁻,
 20 CD45RA⁺, CD62L⁺ и/или CD4⁺ положительные Т-клетки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения CD4⁺ клетки центральной памяти представляют собой CD62L положительные и/или CD45RO положительные клетки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения эффекторные CD4⁺ клетки
 25 представляют собой CD62L отрицательные и/или CD45RO положительные клетки. Каждая из этих популяций может быть независимо модифицирована с применением химерного рецептора.

[000153] Как описано в настоящем изобретении, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Т-клетки памяти присутствуют в обеих подгруппах,
 30 CD62L⁺ и/или CD62L⁻, CD8⁺ лимфоцитов периферической крови. МКПК сортируют на фракции CD62L⁻, CD8⁺ и/или CD62L⁺CD8⁺ после окрашивания с применением антител к CD8 и антител к CD62L. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения экспрессия фенотипических маркеров Т-клеток центральной памяти (T_{CM})
 35 включает CD62L, CCR7, CD28, CD3 и/или CD127 и низкий уровень экспрессии гранзима В или отсутствие его экспрессии. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Т-клетки центральной памяти включают CD45RO⁺, CD62L⁺ и/или CD8⁺ Т-клетки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения эффекторные Т-клетки (T_E) являются отрицательными в отношении экспрессии CD62L,
 40 CCR7, CD28 и/или CD127, и положительными в отношении экспрессии гранзима В и/или перфорина. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения наивные CD8⁺ Т-лимфоциты характеризуются как CD8⁺, CD62L⁺, CD45RO⁺, CCR7⁺, CD28⁺ CD127⁺ и/или CD45RO⁺. Каждая из этих популяций может быть независимо
 45 модифицирована с применением химерного рецептора.

[000154] Были разработаны различные методы трансдукции, в которых для доставки генов используются частицы рекомбинантных инфекционных вирусов. Описанный подход в настоящее время является предпочтительным для трансдукции Т-лимфоцитов

согласно настоящему изобретению. Вирусные векторы, которые были использованы таким способом, включают вирусные векторы, полученные из вируса обезьян 40, аденовируса, аденоассоциированного вируса (AAV), лентивирусных векторов и ретровирусов. Соответственно, известны многочисленные способы переноса и экспрессии генов, однако основной их задачей является введение и экспрессия генетического материала в клетках млекопитающих. Некоторые из указанных выше методик были использованы для трансдукции кроветворных или лимфоидных клеток, включая трансфекцию с применением фосфата кальция, слияние протопластов и инфекцию рекомбинантным аденовирусом, аденоассоциированным вирусом и ретровирусными векторами. Первичные Т-лимфоциты были успешно трансдуцированы методом электропорации и путем инфицирования ретровирусами или лентивирусами.

[000155] Ретровирусные и лентивирусные векторы обеспечивают высокоэффективный способ переноса генов в эукариотические клетки. Кроме того, интеграция ретровирусов или лентивирусов происходит контролируемым образом и приводит к стабильной интеграции одной или более копий новой генетической информации на клетку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ретровирусные или лентивирусные векторы используют для переноса генов в эукариотические клетки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки представляют собой клетки человека.

[000156] Предполагается, что избыточная экспрессия стимулирующего фактора (например, лимфокина или цитокина) может быть токсичной для индивидуума, которого лечат. Следовательно, в объем настоящего изобретения включены сегменты генов, которые придают Т-клеткам согласно настоящему изобретению восприимчивость к отрицательному отбору в условиях *in vivo*. Термин «отрицательный отбор» подразумевает, что клетка после инъекции может быть устранена в результате изменения состояния индивидуума в условиях *in vivo*. Фенотип, подходящий для отрицательной селекции, может возникнуть в результате введения гена, который придает чувствительность к введенному агенту, например, соединению. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения генетическая метка Her2t также обеспечивает отрицательный отбор в условиях *in vivo*. Например, если необходимо устранить CAR-экспрессирующие клетки с генетической меткой Her2t, то субъекту вводят антитело, которое связывается с доменом IV Her2 (например, трастузумаб), или антитело, которое конкурирует за связывание с антителом, которое связывается с доменом IV Her2. В предпочтительных вариантах реализации для устранения трансдуцированных клеток антитела содержат область Fc для активации реакций антитело-зависимой клеточной цитотоксичности, чтобы вызвать гибель трансдуцированных клеток. Согласно другим вариантам реализации антитело или его фрагмент связан с цитотоксическим агентом. Цитотоксический конъюгат связывается с клетками, экспрессирующими CAR и Her2t, и вызывает гибель клеток. Указанный способ обеспечивает абляцию введенных клеток, которые связаны с токсичностью или нежелательными побочными эффектами.

[000157] Другие гены, подходящие для отрицательного отбора, известны в данной области техники и включают, помимо всего прочего, следующие: ген тимидинкиназы вируса простого герпеса типа I (HSV-I TK), который придает чувствительность к ганцикловиру; ген клеточной гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), ген клеточной аденинфосфорибозилтрансферазы (APRT) и ген бактериальной цитозиндезаминазы.

[000158] Для трансдукции Т-лимфоцитов могут быть использованы различные

способы, хорошо известные в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансдукцию осуществляют с применением лентивирусных векторов.

[000159] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения каждая из CD4⁺ и CD8⁺ клеток может быть по отдельности модифицирована с применением вектора экспрессии, кодирующего химерный рецептор, чтобы получить определенные популяции. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки могут быть модифицированы по отдельности с помощью вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий CAR и первую генетическую метку, и/или вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий CAR и отличающуюся вторую генетическую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конструкции CAR могут быть одинаковыми или различными. Например, CD8 Т-клетки трансдуцируют конструкцией CAR, содержащей первую генетическую метку, и CD4 Т-клетки трансдуцируют аналогичной конструкцией CAR, содержащей вторую генетическую метку.

[000160] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанные клетки затем дополнительно сортируют на субпопуляции наивных клеток, клеток центральной памяти и эффекторных клеток, описанных выше, путем сортировки на основании экспрессии поверхностных антигенов клеток, уникальных для каждой из указанных клеточных популяций. Кроме того, популяции клеток CD4⁺ или CD8⁺ могут быть отобраны на основании их цитокинового профиля или пролиферативной активности. Например, могут быть отобраны CD4⁺ Т-лимфоциты, которые при стимуляции антигеном имеют повышенную выработку цитокинов, таких как ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ФНО-альфа и/или ИФН-гамма, по сравнению с контрольными трансдуцированными клетками или трансдуцированными CD8⁺ клетками. Согласно другим вариантам могут быть отобраны наивные CD4⁺ Т-клетки или CD4⁺ Т-клетки центральной памяти, которые имеют повышенную выработку ИЛ-2 и/или ФНО-альфа. Аналогичным образом, могут быть отобраны CD8⁺ клетки, которые имеют повышенную выработку ИФН-гамма, по сравнению с контрольными трансдуцированными CD8⁺ клетками. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения популяции CD4⁺ или CD8⁺ клеток отбирают на основании их цитокинового профиля или пролиферативной активности. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения могут быть отобраны CD4⁺ Т-лимфоциты, которые при стимуляции антигеном имеют повышенную выработку цитокинов, таких как ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ФНО-альфа и/или ИФН-гамма, по сравнению с контрольными трансдуцированными клетками или трансдуцированными CD8⁺ клетками.

[000161] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отбирают CD4⁺ и CD8⁺ клетки, которые являются цитотоксическими по отношению к клеткам, несущим антиген. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения CD4⁺ клетки, как ожидается, будут обладать незначительной цитотоксичностью по сравнению с CD8⁺ клетками. В предпочтительном варианте отбирают трансдуцированные лимфоциты, такие как CD8⁺ клетки центральной памяти, которые вызывают гибель опухолевых клеток в условиях *in vivo* в животной модели, общепринятой для исследования конкретного типа рака.

[000162] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения отбирают транедуцированные клетки, которые способны экспрессировать генетическую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения после трансдукции клетки, экспрессирующие, например, Her2t или EGFRt, отбирают с помощью антител, которые связываются с генетическими метками. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела обеспечивают отбор популяции клеток, содержащей по меньшей мере 80-100% клеток положительных в отношении экспрессии генетической метки.

[000163] Отобранные клетки можно оценивать для определения уровня экспрессии трансгена с применением таких методик как вестерн-блоттинг или проточная цитометрия. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки, отобранные для оценки уровня экспрессии генетической метки, также дополнительно характеризуют, чтобы оценить уровень экспрессии CAR с помощью исследования, например, количества стимулирующего домена (например, CD3-дзета), белка L и T2A. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отбирают клетки, имеющие соотношение уровней экспрессии CAR и генетической метки приблизительно от 1:0,1 до 10:0,1.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отбирают клетки, имеющие соотношение уровней экспрессии CAR и генетической метки приблизительно 1:0,1, 2:0,1, 3:0,1, 4:0,1, 5:0,1, 6:0,1, 7:0,1, 8:0,1, 9:0,1 или 10:0,1, или любое другое соотношение уровней экспрессии CAR и генетической метки, которое находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя из перечисленных соотношений. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения генетическая метка Her2t может быть использована в тех случаях, когда уровень экспрессии CAR является низким, поскольку она обеспечивает более высокие уровни экспрессии трансгенов, чем EGFRt. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения генетическая метка Her2t обеспечивает увеличение уровней экспрессии трансгена по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 5 раз или 10 раз, по сравнению с генетической меткой EGFRt, или любое другое относительное увеличение, величина которого находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя из указанных значений.

[000164] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения отбирают транедуцированные Т-клетки, экспрессирующие химерный рецептор, которые могут сохраняться в условиях *in vivo* в животной модели, общепринятой для исследования конкретного типа рака. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения было показано, что транедуцированные CD8⁺ клетки центральной памяти, экспрессирующие химерный рецептор, сохраняются в условиях *in vivo* после введения в организм животного в течение приблизительно 3 дней или более, 10 дней или более, 20 дней или более, 30 дней или более, 40 дней или более, или 50 дней или более, или в течение любого другого промежутка времени, величина которого находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя из указанных значений. Сохранение в условиях *in vivo* может быть определено путем визуализации с помощью детектируемого меченого антитела, которое связывается с генетической меткой, такой как Her2t или EGFRt.

[000165] В настоящем изобретении предложено применение комбинаций CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в композициях. В одном варианте реализации настоящего изобретения комбинации трансдуцированных CD4⁺ клеток, экспрессирующих химерный рецептор, можно комбинировать с трансдуцированными CD8⁺ клетками, экспрессирующими

химерный рецептор, которые обладают специфичностью в отношении аналогичного лиганда, или комбинировать с CD8⁺ Т-клетками, которые являются специфичными в отношении другого опухолевого лиганда и другой генетической метки. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения трансдуцированные CD8⁺ клетки, экспрессирующие химерный рецептор, комбинируют с трансдуцированными CD4⁺ клетками, экспрессирующими химерный рецептор, которые специфичны в отношении другого лиганда, экспрессируемого на опухоли. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения трансдуцированные CD4⁺ клетки, экспрессирующие химерный рецептор, комбинируют с трансдуцированными CD8⁺ клетками, экспрессирующими химерный рецептор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения CD8⁺ и CD4⁺ клетки можно комбинировать в различных соотношениях, например, в соотношении CD8⁺ и CD4⁺ 1:1, в соотношении CD8⁺ и CD4⁺ 10:1, или в соотношении CD8⁺ и CD4⁺ 100:1, или в любом другом соотношении CD8⁺ и CD4⁺, величина которого находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя из указанных соотношений. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения комбинированную популяцию исследуют для оценки пролиферации клеток в условиях *in vitro* и/или в условиях *in vivo*, и отбирают соотношение клеток, которое обеспечивает пролиферацию клеток.

[000166] Популяции клеток предпочтительно размножают в условиях *in vitro* перед или после трансдукции и/или отбора клеток, несущих химерный рецептор, для получения достаточного количества клеток, чтобы обеспечить по меньшей мере одну инфузию субъекту-человеку, как правило, приблизительно от 10⁴ клеток/кг до 10⁹ клеток/кг. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансдуцированные клетки культивируют в присутствии клеток, несущих антиген, антител к CD3, антител к CD28, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15 и/или ИЛ-21, а также их комбинаций.

[000167] Каждую из субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺ клеток можно комбинировать с другой. В конкретном варианте реализации настоящего изобретения модифицированные наивные CD4⁺ клетки или CD4⁺ клетки центральной памяти комбинируют с модифицированными CD8⁺ Т-клетками центральной памяти, чтобы обеспечить синергическое цитотоксическое действие на клетки, несущие антиген, такие как опухолевые клетки.

Композиции.

[000168] В настоящем изобретении предложены композиции для адоптивной клеточной иммунотерапии, содержащие препарат генетически модифицированных Т-лимфоцитов, описанных в настоящем изобретении.

[000169] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения препарат Т-лимфоцитов содержит CD4⁺ Т-клетки, которые несут химерный рецептор, содержащий внеклеточную вариабельную область антитела, специфичную в отношении лиганда, связанного с заболеванием или расстройством, спейсерный участок, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен рецептора Т-клеток и генетическую метку, описанную в настоящем изобретении. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения композиция для адоптивной клеточной иммунотерапии дополнительно содержит препарат опухолеспецифичных CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов, модифицированных химерным рецептором, который

обеспечивает клеточный иммунный ответ, причем препарат цитотоксических Т-лимфоцитов содержит CD8⁺ Т-клетки, которые несут химерный рецептор, содержащий внеклеточное одноцепочечное антитело, специфичное в отношении лиганда, связанного с заболеванием или расстройством, спейсерный участок, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен рецептора Т-клеток и генетическую метку, описанную в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения популяция Т-клеток, модифицированных химерным рецептором согласно настоящему изобретению, может сохраняться в условиях *in vivo* в течение по меньшей мере приблизительно 3-х дней или дольше. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения каждую из указанных популяций можно комбинировать с другой популяцией или с другими типами клеток с получением композиции.

[000170] Другие варианты реализации включают CD4 и/или CD8 клетки-хозяева, описанные в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин содержит выделенную нуклеиновую кислоту, такую как нуклеиновая кислота, кодирующая выделенный полипептид, который по меньшей мере на 95% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 511 по 652 или с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй химерный антигенный рецептор и вторую генетическую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки-предшественники Т-лимфоцитов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой гемопоэтические стволовые клетки.

[000171] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит первую клетку-хозяина, содержащую первую выделенную нуклеиновую кислоту, такую как нуклеиновая кислота, кодирующая выделенный полипептид, который по меньшей мере на 95% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 511 по 652 или с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и вторую клетку-хозяина, содержащую вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй химерный антигенный рецептор и вторую генетическую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первая клетка-хозяин и вторая клетка-хозяин могут быть аналогичными или могут различаться, например, первая клетка-хозяин может представлять собой CD8⁺ клетки центральной памяти, и вторая клетка-хозяин может представлять собой наивные CD4⁺ клетки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения каждая из первой и второй клеток-хозяев выбрана из группы, состоящей из CD8 Т-клеток, CD4 Т-клеток, CD4-наивных Т-клеток, CD8-наивных Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток центральной памяти, CD4 Т-клеток центральной памяти и их комбинаций.

[000172] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения хелперный CD4⁺ Т-лимфоцит выбран из группы, состоящей из наивных CD4⁺ Т-клеток,

CD4⁺ Т-клеток центральной памяти, CD4⁺ Т-клеток эффекторной памяти или общей популяции CD4⁺ Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения хелперный CD4⁺ лимфоцит представляет собой наивную CD4⁺ Т-клетку, 5
причем указанная наивная CD4⁺ Т-клетка включает CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺ CD4⁺ Т-клетку.

[000173] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения цитотоксический CD8⁺ Т-лимфоцит выбран из группы, состоящей из наивных CD8⁺ Т- 10
клеток, CD8⁺ Т-клеток центральной памяти, CD8⁺ Т-клеток эффекторной памяти или общей популяции CD8⁺ Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения цитотоксический CD8⁺ Т-лимфоцит представляет собой Т-клетку центральной памяти, причем указанная Т-клетка центральной памяти включает 15
CD45RO⁺, CD62L⁺, CD8⁺ Т-клетку. Согласно другим вариантам цитотоксический CD8⁺ Т-лимфоцит представляет собой Т-клетку центральной памяти, и хелперный CD4⁺ Т-лимфоцит представляет собой наивную CD4⁺ Т-клетку или CD4⁺ Т-клетку центральной памяти.

Способы

[000174] В настоящем изобретении предложены способы получения композиций для 20
адоптивной иммунотерапии и их применения, или способы применения указанных композиций для осуществления клеточной иммунотерапии у субъекта, имеющего заболевание или расстройство.

[000175] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предложены 25
способы изготовления композиций, содержащих клетки-хозяева, описанные в настоящем изобретении. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ включает введение в клетку-хозяина выделенной нуклеиновой кислоты, такой как нуклеиновая кислота, кодирующая выделенный полипептид, который по меньшей 30
мере на 95% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 511 по 652 или с 563 по 652 SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с 35
эпитопом в домене IV Her2; и культивирование указанных клеток-хозяев в среде, содержащей по меньшей мере один фактор роста. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает отбор клеток-хозяев для экспрессии Her2t до или после или как до, так и после, и после этапа 40
культивирования. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения способ изготовления дополнительно включает введение в клетку-хозяина второй нуклеиновой кислоты, кодирующей второй химерный антигенный рецептор и вторую генетическую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает отбор клеток-хозяев для экспрессии 45
второй генетической метки до или после, или как до, так и после этапа культивирования. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки-предшественники Т-лимфоцитов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой гемопоэтические стволовые клетки.

[000176] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения способ 50
включает введение в первую клетку-хозяина первой выделенной нуклеиновой кислоты,

такой как нуклеиновая кислота, кодирующая выделенный полипептид, который по меньшей мере на 95% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 511 по 652 или с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2; отбор первой популяции клеток-хозяев, которые экспрессируют Her2t, введение второй нуклеиновой кислоты, кодирующей второй химерный антигенный рецептор и вторую генетическую метку, во вторую клетку-хозяина, отбор второй клетки-хозяина для экспрессии второй генетической метки, и необязательно культивирование первой и второй популяций клеток-хозяев в среде, содержащей по меньшей мере один фактор роста. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиция включает первую и вторую популяцию клеток-хозяев.

[000177] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ изготовления композиций включает получение модифицированных наивных или хелперных CD4⁺ Т-клеток центральной памяти, причем указанный препарат модифицированных хелперных Т-лимфоцитов содержит CD4⁺ Т-клетки, которые несут химерный рецептор, содержащий лигандсвязывающий домен, который специфичен в отношении поверхностной молекулы опухолевых клеток, спейсерный участок, трансмембранный домен, внутриклеточный сигнальный домен и генетическую метку, описанную в настоящем изобретении.

[000178] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает получение модифицированных CD8⁺ Т-клеток центральной памяти, причем препарат указанных модифицированных CD8 Т-лимфоцитов центральной памяти содержит CD8⁺ клетки, которые несут химерный рецептор, содержащий лигандсвязывающий домен, специфичный в отношении поверхностной молекулы клеток опухоли, спейсерный участок, трансмембранный домен, внутриклеточный сигнальный домен и генетическую метку, описанную в настоящем изобретении. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения CD8⁺ клетки содержат рецептор цитокина или хемокина под контролем индуцируемого промотора.

[000179] Химерный антигенный рецептор и генетическая метка в модифицированных CD4⁺ Т-клетках и модифицированных цитотоксических CD8⁺ Т-клетках могут быть одинаковыми или различными. Например, модифицированные CD4⁺ Т-клетки содержат первый CAR и первую генетическую метку, в то время как цитотоксические CD8⁺ Т-клетки представляют собой CD8⁺ клетки, которые содержат отличающийся второй CAR и отличающуюся вторую генетическую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид может кодировать химерный антигенный рецептор, который является аналогичным для обеих популяций CD4⁺ и CD8⁺ клеток. Различие между указанными двумя конструкциями CAR может включать специфичность или аффинность лигандсвязывающего домена в отношении антигена или эпитопа, длину и последовательность спейсерного участка и внутриклеточные сигнальные компоненты.

[000180] Получение клеток CD4⁺ и CD8⁺, которые модифицированы химерным

рецептором, было описано выше, а также в примерах. Антигенспецифичные Т-лимфоциты могут быть получены от пациента, имеющего заболевание или расстройство, или могут быть получены путем стимуляции Т-лимфоцитов в условиях *in vitro* в присутствии антигена. Субпопуляции CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, которые не подвергают отбору в отношении антигенной специфичности, также могут быть выделены, как описано в настоящем документе, и комбинированы в способах изготовления. Популяции клеток преимущественно отбирают для экспрессии одной или более генетических меток, таких как Her2t и/или EGFRt.

[000181] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения комбинацию популяций клеток можно оценить для определения однородности поверхностных клеточных маркеров и способности пролиферировать на протяжении по меньшей мере двух поколений, чтобы получить одинаковый статус дифференцировки клеток. Контроль качества можно осуществлять путем определения соотношения уровней экспрессии CAR и генетической метки. Статус дифференцировки клеток и поверхностные клеточные маркеры на модифицированных Т-клетках, несущих химерный рецептор, могут быть определены методом проточной цитометрии. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения статус дифференцировки клеток и маркеры на CD8⁺ клетках включают CD3, CD8, CD62L, CD28, CD27, CD69, CD25, PD-1, CTLA-4, CD45RO и/или CD45RA. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения статус дифференцировки клеток и маркеры на CD4⁺ клетках включают CD3, CD4, CD62L, CD28, CD27, CD69, CD25, PD-1, CTLA-4 CD45RO и/или CD45RA.

[000182] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения модифицированные Т-клетки, несущие химерный рецептор, описанные в настоящем изобретении, могут сохраняться в условиях *in vivo* в течение не менее 3-х дней или по меньшей мере 10 дней. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения модифицированные Т-клетки, несущие химерный рецептор, описанные в настоящем документе, могут сохраняться в условиях *in vivo* в течение по меньшей мере 3 дней, 4 дней, 5, дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней или 10 дней, или на протяжении любого промежутка времени в диапазоне, определенном любыми двумя из указанных выше периодов времени. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения модифицированные Т-клетки, несущие химерный рецептор, могут размножаться в условиях *in vivo* на протяжении по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 поколений, согласно результатам определения по разбавлению красителя CFSE. Пролиферацию и сохранение модифицированных Т-клеток, несущих химерный рецептор, можно определить с применением животной модели заболевания или расстройства, и путем введения клеток и определения сохранения и/или пролиферативной способности перенесенных клеток с помощью детектирования клеток с применением детектируемого меченого антитела, которое связывается с генетической меткой, такого как эрбитукс (EGFRt) и/или герцептин (Her2t). При использовании антител или антигенсвязывающих фрагментов для детектирования клеток, экспрессирующих трансген, в условиях *in vivo*, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предпочтительно не содержит область Fc, чтобы минимизировать любую реакцию ADCC. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения пролиферацию и активацию можно исследовать в условиях *in vitro*, используя несколько циклов активации с применением клеток, несущих антиген.

[000183] В настоящем изобретении также предложены способы проведения клеточной

иммунотерапии у субъекта, имеющего заболевание или расстройство, включающие: введение композиции лимфоцитов, экспрессирующих один или более химерных антигенных рецепторов и генетическую метку, описанную в настоящем документе.

5 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ осуществления клеточной иммунотерапии у субъекта, страдающего заболеванием или расстройством, причем указанный способ включает введение композиции лимфоцитов, экспрессирующих один или более химерных антигенных рецепторов и генетическую метку.

10 [000184] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ лечения пациента, страдающего раком, экспрессирующим опухолевый антиген, включающий введение эффективного количества композиций, описанных в настоящем изобретении, причем клетки указанной композиции экспрессируют химерный антигенный рецептор, который содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с опухолевым антигеном, экспрессированным на раковой клетке, и генетическую метку.

15 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения раковые клетки экспрессируют опухолевый антиген, распознаваемый химерным антигенным рецептором на клетках. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, диффузной В-клеточной лимфомы, лимфомы, ОЛЛ, ХЛЛ и множественной миеломы.

20 [000185] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ лечения пациента, страдающего раком, экспрессирующим опухолевый антиген, включает введение эффективного количества композиций, описанных в настоящем документе, причем клетки указанной композиции экспрессируют первый химерный антигенный рецептор, который содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с

25 опухолевым антигеном, экспрессируемым на раковой клетке, и первую генетическую метку и второй химерный антигенный рецептор, который содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с опухолевым антигеном, экспрессируемым на раковой клетке, и вторую генетическую метку.

[000186] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ

30 лечения пациента, страдающего раком, экспрессирующим опухолевый антиген, включает введение эффективного количества композиции, содержащей первую клетку-хозяина, которая экспрессирует первый химерный антигенный рецептор, который содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с опухолевым антигеном, экспрессируемым на раковой клетке, и первую генетическую метку, и вторую клетку-

35 хозяина, содержащую второй химерный антигенный рецептор, который содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с опухолевым антигеном, экспрессируемым на раковой клетке, и вторую генетическую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки-предшественники Т-лимфоцитов. Согласно некоторым вариантам реализации

40 настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой гемопоэтические стволовые клетки.

[000187] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ лечения пациента, страдающего раком и/или экспрессирующего опухолевый антиген, причем указанный способ включает введение эффективного количества

45 композиции, описанной в настоящем изобретении, и антитела, которое специфично связывается с генетической меткой, при этом клетки указанной композиции экспрессируют химерный антигенный рецептор, который содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с опухолевым антигеном, экспрессируемым на раковой

клетке, и генетическую метку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело связывается с доменом IV Her2 или связывается с EGFRt. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела представляют собой герцептин или эрбитукс.

5 [000188] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, если наблюдается токсическое действие композиции, вводят антитело, которое связывается с генетической меткой. Антитело может связываться и вызывать гибель CAR-экспрессирующих клеток указанной композиции, чтобы избежать токсичных и/или смертельных побочных эффектов. Согласно некоторым вариантам реализации
10 настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предпочтительно содержит фрагмент Fc, чтобы активировать реакции ADCC. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгирован с цитотоксическим агентом. Цитотоксические агенты включают кантансиноиды, калихеамицин и/или ауристатины.
15 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения цитотоксические агенты включают кантансиноиды, калихеамицин и/или ауристатины.

[000189] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело детектируемо помечено меткой для того чтобы обеспечить возможность детектирования клеток в условиях *in vivo*. Согласно некоторым вариантам реализации
20 настоящего изобретения, если антитело используют для детектирования в условиях *in vivo*, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предпочтительно не содержит полноразмерной или части области Fc, чтобы избежать реакций ADCC. Детектируемые метки включают биотин, полигистидиновые метки, метки Мус, радиоактивные и/или флуоресцентные метки. Согласно некоторым вариантам реализации детектируемые
25 метки содержат биотин, полигистидиновые метки, метки Мус, радиоактивные и/или флуоресцентные метки.

[000190] Согласно другим вариантам реализации способ включает введение субъекту препарата генетически модифицированных цитотоксических Т-лимфоцитов, который обеспечивает клеточный иммунный ответ, причем указанный препарат цитотоксических
30 Т-лимфоцитов содержит CD8⁺ Т-клетки, которые содержат химерный рецептор, содержащий лигандсвязывающий домен, специфичный в отношении поверхностной молекулы опухолевых клеток, спейсерный участок, трансмембранный домен, внутриклеточный сигнальный домен и первую генетическую метку, описанную в настоящем изобретении, и/или препарат генетически модифицированных хелперных
35 Т-лимфоцитов, который вызывает непосредственное распознавание опухоли и увеличивает способность препаратов генетически модифицированных цитотоксических Т-лимфоцитов вызывать клеточный иммунный ответ, причем указанный препарат хелперных Т-лимфоцитов содержит CD4⁺ Т-клетки, которые несут химерный рецептор, содержащий лигандсвязывающий домен, специфичный в отношении поверхностной молекулы опухолевых клеток, спейсерный участок, трансмембранный домен,
40 внутриклеточный сигнальный домен и вторую генетическую метку.

[000191] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения описан способ осуществления клеточной иммунотерапии у субъекта, имеющего заболевание или расстройство, включающий: исследование биологического образца субъекта для
45 определения присутствия молекулы-мишени, связанной с заболеванием или расстройством, и введение композиций для адоптивной иммунотерапии, описанных в настоящем документе, причем указанный химерный рецептор специфично связывается с молекулой-мишенью.

[000192] Субъекты, которые могут получить лечение согласно настоящему изобретению, в целом включают человека и других субъектов-приматов, таких как обезьяны и человекообразные обезьяны, для ветеринарных целей. Субъекты могут быть мужского или женского пола, и могут иметь любой подходящий возраст, включая 5 младенцев, малолетних детей, подростков, взрослых и гериатрических субъектов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъектом является субъект-примат или человек.

[000193] Указанные способы можно применять в лечении, например, гематологических злокачественных новообразований, меланомы, рака молочной 10 железы и других эпителиальных злокачественных новообразований или солидных опухолей. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения молекула, связанная с заболеванием или расстройством, выбрана из группы, состоящей из орфанного тирозинкиназного рецептора ROR1, Her2, EGFR, CE7, hB7H3, CD19, CD20, CD22, мезотелина, CE A и поверхностного антигена вируса гепатита В.

[000194] Субъекты, которые могут получить лечение, включают субъектов, 15 страдающих раком, включая, но не ограничиваясь перечисленными, рак толстой кишки, рак легких, рак печени, рак молочной железы, рак почек, рак простаты, рак яичников, рак кожи (включая меланому), рак костей, рак мозга и т.д. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения известны ассоциированные с опухолью 20 антигены или молекулы, например, меланомы, рака молочной железы, плоскоклеточной карциномы, рака толстой кишки, лейкемии, миеломы и рака предстательной железы. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения ассоциированные с опухолью молекулы могут являться мишенью генетически модифицированных Т-клеток, экспрессирующих модифицированный химерный рецептор. Примеры включают, но не 25 ограничиваются ими, В-клеточную лимфому, рак молочной железы, рак предстательной железы и лейкемию. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект страдает В-клеточной лимфомой, раком молочной железы, раком простаты и/или лейкозом.

[000195] Клетки, полученные с помощью описанных выше способов, могут быть 30 использованы в способах и композициях для адоптивной иммунотерапии в соответствии с известными методиками или их разновидностями, которые будут очевидны специалистам в данной области техники на основании настоящего описания.

[000196] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки получают путем сбора их из культуральной среды с последующим промыванием и 35 концентрированием клеток в среде и контейнере, пригодном для введения («фармацевтически приемлемый» носитель) в терапевтически эффективном количестве. Подходящая среда для инфузии может представлять собой любой изотонический жидкий состав, как правило, нормальный физиологический раствор, Normosol R (Abbott) или Plasma-Lyte A (Baxter), также можно использовать 5% раствор декстрозы в воде или 40 раствор Рингера с лактатом. Среда для инфузии может быть дополнена сывороточным альбумином человека, эмбриональной бычьей сывороткой или другими компонентами сыворотки человека.

[000197] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапевтически эффективное количество клеток в композиции представляет собой 45 транедуцированные CD4 или CD8 клетки или по меньшей мере 2 подгруппы клеток (например, 1 подгруппа представляет собой CD8⁺ Т-клетки центральной памяти и 2 подгруппа представляет собой CD4⁺ Т-хелперы) или обычно количество составляет

более чем 10^2 клеток и вплоть до 10^6 , вплоть до или равное 10^8 или 10^9 клеток, и может быть более 10^{10} клеток или любое количество клеток, которое находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя конечными точками любого из перечисленных значений.

[000198] Количество клеток будет зависеть от конечной цели применения, для которой предназначена композиция, а также типа клеток, включенных в нее. Например, если желательны клетки, которые являются специфичными в отношении конкретного антигена, то популяция будет содержать более 70%, обычно более 80%, 85% и 90-95% указанных клеток, или любое процентное количество клеток, которое находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя из указанных выше процентных значений.

[000199] В отношении вариантов применения, предложенных в настоящем изобретении, клетки обычно обеспечены в объеме 1 литр или менее, но более 1 нл, или 500 мл или менее, но более 1 нл, или 250 мл или 100 мл или менее, но более 1 нл, или в любом объеме, который находится в пределах диапазона, определенного двумя конечными точками любого из перечисленных значений.

[000200] Следовательно, плотность желаемых клеток, как правило, более 10^4 клеток/мл и обычно более 10^7 клеток/мл, обычно 10^8 клеток/мл или более. Клинически значимое количество иммунных клеток может быть распределено на несколько инфузий, которые совокупно обеспечивают количество клеток, которое соответствует или превышает 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} или 10^{11} клеток или любое количество клеток, которое находится в пределах диапазона, определенного двумя из указанных выше значений.

[000201] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лимфоциты могут быть использованы для придания индивидуумам иммунитета. Термин «иммунитет» означает облегчение одного или более физических симптомов, связанных с ответом на инфекцию патогеном, или на опухоль, на которую направлен ответ лимфоцитов. Количество вводимых клеток обычно находится в диапазоне, который наблюдают у нормальных индивидуумов с иммунитетом к возбудителю. Следовательно, клетки обычно вводят путем инфузии, причем с каждой инфузией вводят от 2 клеток и вплоть до по меньшей мере 10^6 - 3×10^{10} клеток, предпочтительно в диапазоне от по меньшей мере 10^7 до 10^9 клеток или любое количество клеток, которое находится в пределах диапазона, определенного двумя из указанных выше количеств.

[000202] Т-клетки могут быть введены с помощью однократной инфузии или нескольких инфузий в течение какого-либо периода времени. Однако поскольку ожидается, что различные индивидуумы имеют различную восприимчивость, тип и количество клеток, вводимых с помощью инфузии, а также количество инфузий и период времени, в течение которого проводят несколько инфузий, определяются лечащим врачом и могут быть определены с помощью стандартного исследования. Получение достаточных уровней Т-лимфоцитов (включая цитотоксические Т-лимфоциты и/или хелперные Т-лимфоциты) может быть легко достигнуто с применением способа быстрого размножения согласно настоящему изобретению, который приведен в качестве примера в настоящем документе.

[000203] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композицию, описанную в настоящем документе, вводят внутривенно, внутривентально, внутриопухолево, в костный мозг, в лимфатический узел и/или в спинномозговую жидкость. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения

композиции, содержащие модифицированные химерные рецепторы, доставляют в очаг опухоли. Согласно другому варианту композиции, описанные в настоящем документе, можно комбинировать с соединением, которое направляет клетки к опухоли или в компартменты иммунной системы, и при этом указанные композиции не обладают направленным действием на такие органы как легкие.

[000204] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиции, описанные в настоящем документе, вводят с химиотерапевтическими агентами и/или иммунодепрессантами. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения пациент сначала получает химиотерапевтический агент, который ингибирует или разрушает другие иммунные клетки, с последующим введением композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых случаях применение химиотерапии может не требоваться. Настоящее изобретение дополнительно описано далее в примерах, приведенных ниже.

Дополнительные варианты

[000205] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен выделенный полипептид, причем указанный выделенный полипептид по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, при этом указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерный пептид содержит последовательность SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб.

[000206] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен выделенный полипептид, причем указанный выделенный полипептид по меньшей мере на 95%, 96%, 91%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, при этом указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her, и при этом указанный внеклеточный домен полипептида Her2, содержащий последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединен с трансмембранным доменом последовательностью, содержащей аминокислоты GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. Согласно некоторым вариантам лидерный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб.

[000207] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, причем указанная выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, при этом указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерный пептид содержит последовательность SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her, и при этом внеклеточный домен полипептида Her2, содержащий последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединен с трансмембранным доменом последовательностью, содержащей аминокислоты

GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624

5 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым

10 вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело

15 представляет собой трастузумаб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит трансген. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансген содержит

20 полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит антигенсвязывающий домен, спейсерный участок, трансмембранный домен и по меньшей мере один стимулирующий домен. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий трансген, соединен

25 с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид Her2, с помощью саморасщепляющегося линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в

30 SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения саморасщепляющийся линкер представляет собой линкер T2A, содержащий

35 последовательность LEGGGEGRGSLLTTCG (SEQ ID NO: 26). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность, представленную

40 в SEQ ID NO: 25 (CD20CAR). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения размер выделенной нуклеиновой кислоты составляет 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 14,9 тыс.п.н., или любой размер, величина которого находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя перечисленными размерами конструкции.

[000208] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения

45 предложена клетка-хозяин, причем указанная клетка-хозяин содержит выделенную нуклеиновую кислоту, при этом указанная выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен

последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, при этом указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерный пептид содержит последовательность SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her, и при этом внеклеточный домен Her2 полипептида, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединен с трансмембранным доменом последовательностью, содержащей аминокислоты GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит трансген. Согласно некоторым вариантам реализации

настоящего изобретения трансген содержит полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит антигенсвязывающий домен, спейсерный участок, трансмембранный домен и по меньшей мере один стимулирующий домен. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий трансген, соединен с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид Her2, с помощью саморасщепляющегося линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her2. Согласно некоторым вариантам реализации саморасщепляющийся линкер представляет собой линкер T2A, содержащий последовательность LEGGGEGRGSLLTCG (SEQ ID NO: 26). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 (CD20CAR). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из CD 8 Т-клеток, CD4 Т-клеток, CD4 наивных Т-клеток, CD8 наивных Т-клеток, CD8 клеток центральной памяти и CD4 клеток центральной памяти или их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин является аутологичной. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин является антигенспецифичной. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки-предшественники Т-лимфоцитов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой гемопоэтические стволовые клетки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения размер выделенной нуклеиновой кислоты составляет 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 14,9 тыс.п.н., или любой размер, величина которого находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя их перечисленных размеров конструкции.

[000209] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложена композиция, содержащая клетки-хозяева, причем указанные клетки-хозяева содержат выделенную нуклеиновую кислоту, при этом указанная выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении

595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерный пептид содержит последовательность SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, при этом указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her, и при этом внеклеточный домен полипептида Her2, содержащий последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединен с трансмембранным доменом последовательностью, содержащей аминокислоты GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит трансген. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансген содержит полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит антигенсвязывающий домен, спейсерный участок, трансмембранный домен и по меньшей мере один стимулирующий домен. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий трансген, связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид Ней, с помощью саморасщепляющегося линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен

последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения саморасщепляющийся линкер представляет собой линкер T2A, содержащий последовательность LEGGEGRGSLLTTCG (SEQ ID NO: 26). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 (CD20CAR). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из CD8 Т-клеток, CD4 Т-клеток, CD4 наивных Т-клеток, CD8 наивных Т-клеток, CD8 клеток центральной памяти и CD4 клеток центральной памяти или их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин является аутологичной. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин является антигенспецифичной. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки-предшественники Т-лимфоцитов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки-хозяева представляют собой гемопоэтические стволовые клетки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения размер выделенной нуклеиновой кислоты составляет 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 14,9 тыс.п.н., или любой размер, величина которого находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя из перечисленных размеров конструкции.

[000210] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ изготовления композиции, причем указанный способ включает введение выделенной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина и культивирование клеток-хозяев в среде, содержащей по меньшей мере один фактор роста. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный

полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерный пептид содержит последовательность SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her, и при этом внеклеточный домен Her2 полипептида, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединен с трансмембранным доменом последовательностью, содержащей аминокислоты GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 содержит аминокислоты 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен содержит аминокислоты 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид дополнительно содержит лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лидерный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит трансген. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансген содержит полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит антигенсвязывающий домен, спейсерный участок, трансмембранный домен и по меньшей мере один стимулирующий домен. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий трансген, соединен с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид Her2, с помощью саморасщепляющегося линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид Her2 по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида внеклеточного домена полипептида Her2, содержащего последовательность аминокислот с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, соединенного с трансмембранным доменом, причем указанный выделенный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV Her2, и при этом указанный выделенный полипептид не включает полноразмерный зрелый Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего

изобретения саморасщепляющийся линкер представляет собой линкер T2A, содержащий последовательность LEGGGEGRGSLLTCG (SEQ ID NO: 26). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 (CD20CAR). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из CD 8 Т-клеток, CD4 Т-клеток, CD4 наивных Т-клеток, CD8 наивных Т-клеток, CD8 клеток центральной памяти и CD4 клеток центральной памяти или их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин является аутологичной. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин является антигенспецифичной. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фактор роста выбран из ИЛ-15, ИЛ-7, ИЛ-21 или ИЛ-2, а также их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации способ дополнительно включает отбор клеток, которые экспрессируют полипептид Her2t. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки отбирают перед этапом культивирования клеток в среде. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки отобраны с применением антитела, которое связывается с доменом IV Her2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой трастузумаб. Согласно некоторым вариантам реализации способ дополнительно включает введение второй выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор, соединенный со второй генетической меткой. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает отбор клеток, экспрессирующих вторую генетическую метку.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вторая генетическая метка содержит EGFRt.

[000211] Получение трансдуцированных клеток, содержащих CAR и последовательность маркера Her2t, описано далее.

30 Антитела и проточная цитометрия

[000212] Конъюгированные с флуорохромом антитела для контроля изотипа к CD3, CD4, CD8, CD45, Her2 и стрептавидину получали от BD Biosciences. Цетуксимаб (эрбитукс) и трастузумаб (герцептин) были приобретены у Детского научно-исследовательского института в Сиэтле (США). Эрбитукс и герцептин биотинилировали (Pierce) или напрямую конъюгировали с APC (Solulink) в соответствии с инструкциями изготовителя. Сбор данных проводили на LSRFortessa (BD Biosciences), и процент клеток в области анализа рассчитывали с применением программного обеспечения для обработки данных FlowJo.

Линии клеток

40 [000213] Все линии клеток поддерживали в среде RPMI 1640 с добавлением 2 mM L-глутамина, 25 mM HEPES (Irvine Scientific) и 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (HyClone or Atlas), если не оговорено иное. Линии целевых клеток эритролейкоза K562 были любезно предоставлены доктором Стэнли Риддл (Stanley Riddell) (Центр исследования рака Фреда Хатчинсона). Другие линии клеток, 45 Т-лимфобласты линии H9, клетки линии Raji (лимфома Беркитта человека) и 293T (производная линия от линии клеток мезонефроса человека 293 с высокой эффективностью трансфекции) были получены из Американской коллекции типовых культур. Линии лимфобластных клеток, трансформированные вирусом Эпштейна-Барр

(TM-LCLS), получали из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), как описано ранее (Pelloquin et al., 1986). Линии клеток, экспрессирующие GFP:ffluc, транедуцировали GFP:ffluc_epHIV7 и сортировали с помощью сортера FACSJazz BD.

Конструирование вектора и получение лентивируса, кодирующего Her2t или EGFRt

[000214] Лентивирусная конструкция второго поколения, 41BB-zeta CD19CAR-T2A-EGFRt_epHIV7, была описана ранее (Hudecek et al. 2013). (таблица 1)

[000215] CD20CAR-T2A-EGFRt_epHIV7 содержит scFv из Leu16 (мышинное антитело к CD20 человека), гибридный с частью спейсерного участка IgG4Hinge-CH3 человека (119 аминокислот) из IgG4, совместно с аналогичными сигнальными компонентами CD19CAR (4-1BB-zeta). (таблица 9)

[000216] Her2t синтезировали с помощью ПЦР, используя pDONR223-ErbB2 (Addgene) в качестве матрицы, и лентивирусный вектор epHIV7 в качестве остова, (таблицы 6 и 8) Готовый продукт, Her2t_epHIV7, содержит лидерный пептид рецептора гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (GMCSFRss), гибридный с доменом IV (аминокислоты 563-652) в пределах одной открытой рамки считывания, и трансмембранные компоненты Her2 (аминокислоты 653-675). EGFRt в конструкции CD19CAR-T2A-EGFRt_epHIV7 замещали Her2t с помощью ПЦР и клонирования по Гибсону. EGFRt синтезировали, как описано ранее (Wang et al. 2011). (таблица 7)

[000217] Лентивирусы, кодирующие CD19CAR-T2A-Her2t, CD19CAR-T2A-EGFRt, CD20CAR-T2A-EGFRt, Her2t и EGFRt, нарабатывали в клетках 293T с применением упаковочных векторов pCHGP-2, PCMV-Rev2 и pCMV-G.

Получение линий клеток, экспрессирующих CAR, Her2t и/или EGFRt

[000218] Для получения CD4 или CD8 Т-клеток центральной памяти, МКПК человека выделяли с помощью Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech) из отбракованных образцов крови здоровых доноров (Центр крови Пьюджет-Саунд). МКПК от каждого донора разделяли на две группы (выделение CD4 или CD8 Т-клеток центральной памяти), и затем истощали с помощью сепаратора AutoMACS с применением наборов для выделения, специфичных в отношении CD4 или CD8, и микрогранул, специфичных в отношении CD45RA (Miltenyi Biotec), в соответствии с протоколом производителя. Истощенную фракцию затем подвергали положительному отбору с помощью AutoMACS с применением микрогранул, специфичных в отношении CD62L, чтобы получить CD4⁺CD45RO⁺CD62L⁺ или CD8⁺CD45RO⁺CD62L⁺ Т-клетки центральной памяти. Выделенные клетки затем стимулировали с применением 50 Ед/мл интерлейкина-2 (ИЛ-2), 2 нг/мл интерлейкина-15 (ИЛ-15) и микрогранул, специфичных в отношении CD3/CD28 (Life Technologies). Первичные линии Т-клеток транедуцировали на 3-й день после активации с помощью сульфата протамина (разведение 1:100) и величине MOI вируса составляющей 1, с последующим центрифугированием при 800g в течение 45 мин при 32°C. Все остальные линии клеток также транедуцировали на ранних этапах пассирования.

[000219] Подгруппы Her2t⁺ или EGFRt⁺ для каждой линии клеток обогащали с помощью иммуномагнитной селекции, используя биотин-конъюгированный герцептин или эрбитукс и микрогранулы, специфичные в отношении биотина (Miltenyi).

Отобранные CD19 или CD20CAR⁺ Т-клетки размножали через 12-18 дней после трансдукции путем стимуляции облученными (8000 рад) TM-LCL, при соотношении Т клетки:TM-LCL составляющем 1:7, в присутствии 50 Ед/мл ИЛ-2 и 2 нг/мл ИЛ-15.

CD19CAR-T2A-Her2t⁺/CD20CAR-T2A-EGFRt⁺ Т-клетки сортировали с применением биотинилированного герцептина и микрогранул, специфичных в отношении биотина

Multisort (Miltenyi), затем удаляли микрогранулы, помечали клетки с применением эрбитукс-APC и связывали с микрогранулами, специфичными в отношении APC (Miltenyi).

Определение концентрации белка.

5 [000220] Лизис клеток проводили в буфере RIPA, содержащем коктейль ингибиторов протеаз. Клеточные лизаты исследовали с помощью набора для количественного исследования BCA (Pierce), вносили в равных количествах на гели, и вестерн-блоты исследовали с применением первичных антител к Her2 и фосфо-Her2 (Cell Signaling Technology), антител к CD247 (CD3 ζ , биотинилированного герцептина или антител к β -актину (для контроля количества внесенного образца). Вторичный стрептавидин, конъюгированный с IRDye 800CW, или антитела козы к Ig мыши или кролика (LI-COR) добавляли в соответствии с инструкциями изготовителя. Блоты визуализировали на инфракрасной системе визуализации Odyssey (LI-COR).

Количественные исследования цитотоксичности, выработки цитокинов и пролиферации

15 [000221] Цитотоксичность: Количественные исследования высвобождения хрома в течение 4 часов проводили, как описано ранее (Wang et al. 2011). Антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) определяли, используя не более $2,5 \times 10^5$ T_{CM} клеток, экспрессирующих CD19CAR с маркером Her2t, CD20CAR с маркером EGFRt, CD19CAR-Her2t и CD20CAREGFRt, а также CD19CAR с маркерной
20 последовательностью EGFRt, в качестве эффекторных клеток в совместных культурах с 5×10^3 Cr⁵¹-меченых клеток K562, экспрессирующих CD19 или CD20.

[000222] Выработка цитокина: Т-клетки (5×10^5) высевали в трех повторах совместно с клетками-мишенями при соотношении Е:Т составляющем 2:1 в 96-луночный планшет, и супернатанты исследовали методом проточной цитометрии микрогранул с
25 применением панели Bio-Plex Human Cytokine (Bio-Rad) в соответствии с инструкциями изготовителя.

[000223] Пролиферация: Т-клетки метили с применением 0,2 мкМ эфира карбоксифлуоресцеинсукцинимидила (CFSE; Invitrogen), промывали и высевали в трех
30 повторах совместно со стимулирующими клетками в среду, не содержащую экзогенных цитокинов. Через 72 ч инкубации клетки метили антителами к CD3, окрашивали для определения количества живых/мертвых клеток и исследовали методом проточной цитометрии для оценки клеточного деления жизнеспособных CD3⁺ клеток.

Приживание Т-клеток в условиях *in vivo* и ADCC

35 [000224] Все эксперименты на мышах были одобрены Комитетом по уходу за животными и их использованию Детского научно-исследовательского института в Сиэтле. Мыши линии NOD/Scid IL2R γ C^{null} были получены из лаборатории Джексона или разведены в исследовательском центре.

40 [000225] Приживание: мышам линии NOD/Scid IL2R γ C^{null} в возрасте от 6 до 10 недель вводили внутривенно на 0-й день 10^7 Her2t/EGFRt-отрицательных Т-клеток (контроль) или Her2t или EGFRt-отобранных Т-клеток и подкожно вводили 5×10^6 жизнеспособных клеток NS0-IL15, чтобы обеспечить системное поступление ИЛ-15
45 человека в условиях *in vivo*. Костный мозг собирали у убитых животных через 14 дней, и суспензии клеток исследовали методом проточной цитометрии с применением антител к CD45, окрашивающих реагентов для выявления живых/мертвых клеток, антител к CD4, CD8, биотинилированного герцептина или эрбитукса и стрептавидин-APC,

предоставленных BD Biosciences. Согласно другому варианту бедренные кости фиксировали в 10% формалине в течение 24 часов, декальцинировали в течение 2-х часов (Richard-Allan Scientific) и заливали парафином для иммуногистохимического окрашивания с применением антител к CD45 (DAKO), антител к EGFR (клон 31G7; Invitrogen) в соответствии с инструкциями изготовителя, или с применением биотинилированного герцептина и SA-AF647 с последующим контрастирующим окрашиванием Hoechst. Аналогичным образом, линии клеток Her2⁺ или Her2t⁺ прикрепляли к стеклам с применением поли-L-лизина и затем окрашивали с применением биотинилированного герцептина и SA-AF647. Флуоресцентные изображения получали с применением визуализирующей системы Nuance FX Biomarker.

Статистический анализ

[000226] Статистический анализ проводили с применением программного обеспечения Prism (GraphPad). Т-тесты Стьюдента проводили как двусторонние парные тесты с доверительным интервалом 95%, и результаты со значением Р менее 0,05 рассматривали как значимые. Статистический анализ выживаемости проводили с применением логарифмического рангового критерия, и результаты со значением Р менее 0,05 рассматривали как значимые.

Дизайн и начальная характеристика многофункционального поверхностного эпитопа на основе ErbB2 человека (Her2).

[000227] Применение и отбор гомогенных продуктов иммунных клеток является ограничивающим фактором для клинического успеха и воспроизводимости стратегий адоптивной терапии. Для преодоления этих ограничений был сконструирован неиммуногенный эпитоп на основе Her2 человека, названный Her2t, в качестве генетической метки-кандидата и инструмента для клеточной инженерии (фигура 1, панель А). Her2t лишен всех внутриклеточных компонентов Her2, но содержит трансмембранный участок Her2, конформационно неповрежденный связывающий эпитоп, который распознается моноклональным антителом трастузумабом (герцептин) и GMCSFRss, чтобы облегчить поверхностную экспрессию (фигура 1, панель В). Три варианта конструкции Her2t, один из которых содержит полноразмерный домен IV Her2 и два содержат минимальные конформационные эпитопы, разработанные на основе трехмерной структуры Her2 в комплексе с герцептином (Garrett et al 2007; Cho et al 2003), первоначально встраивали в лентивирусную упаковывающую плазмиду ерНIV7 и характеризовали в клетках CHO. Конструкция Her2t, включая аминокислоты 563-652, представленная на фигуре 1, панель В, проявила максимальный уровень кратковременной поверхностной экспрессии, согласно результатам проточной цитометрии с применением биотинилированного герцептина и стрептавидин-конъюгированного флуорофора, и на этом основании была отобрана для последующего описания (данные не приведены).

Her2t представляет собой перспективную и функционально инертную генетическую метку

[000228] После первоначального исследования кратковременной экспрессии, конструкцию ерНIV7, содержащую Her2t, применяли для получения псевдотипированных самоинактивирующихся лентивирусов с применением плазмиды, экспрессирующей VSV-g. Полученный вирус затем транецировали в различные типы клеток, что позволило получить 8,2-65% Her2t⁺ популяций (данные не приведены), при этом транецированные клетки эритролейкоза K562 (13,8% Her2t⁺) представлены в качестве типичного примера (фигура 2, панель А). Чтобы оценить возможность применения

Her2t в качестве мишени для селективного обогащения популяций клеток, экспрессирующих трансген, транедуцированную популяцию K562 подвергали двухэтапной иммуномагнитной очистке с применением биотинилированного герцептина и микрогранул, специфичных в отношении биотина. Указанный способ позволял
5 рутинно получать популяции клеток, содержащие $\geq 95\%$ Her2t⁺ клеток (фигура 2, панель В). Последующие титровочные эксперименты выявили, что 1,2 нг или менее биотинилированного герцептина является достаточным, чтобы максимально пометить 10^6 Her2t⁺ клеток, (фигура 2, панель А).

[000229] Как показано в молекулярной модели в настоящем документе (фигура 1, панель А), Her2t лишен внеклеточных доменов I-III и содержит эпитоп связывания домена IV, необходимый для распознавания антител. Соответственно, было выдвинуто предположение, что Her2t будет неспособен связываться с коммерческими антителами к Her2 и будет уникально распознаваться герцептином. Результаты проточной
10 цитометрии подтвердили, что герцептин может эффективно распознавать и окрашивать клетки K562, экспрессирующие Her2t и полноразмерный Her2, в то время как коммерческие антитела способны распознавать только полноразмерный Her2 (фигура 2, панель С).

[000230] Исследования Her2t и полноразмерного Her2 методом вестерн-блоттинга также проводили на отобранных с помощью герцептина клетках, экспрессирующих
20 Her2t⁺ или полноразмерный Her2⁺, соответственно. Как ожидалось, при использовании коммерческого антитела к Her2 полноразмерный белок Her2 массой 185 кДа детектировали только в лизатах из клеток, экспрессирующих полноразмерный Her2. Аналогичным образом, фосфорилирование Her2 детектировали только в лизатах клеток,
25 экспрессирующих полноразмерный Her2, обработанных нейрегулином. Полосу, соответствующую Her2t, детектировали только в лизатах Her2t⁺ клеток при окрашивании биотинилированным герцептином (фигура 2, панель D).

Her2t является узкоспецифичным и дополнительным селективным эпитопом для Т-клеточной терапии.

[000231] Высокоэффективный селективный эпитоп для лекарственных препаратов Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), обозначенный EGFRt, был выявлен ранее (Wang et al 2011). Проводили исследование того, может ли совместная экспрессия Her2t в CAR-содержащих вирусных векторах облегчить
30 клиническое применение в условиях ex vivo сконструированных лекарственных средств, экспрессирующих CAR, с широкой областью действия. Кроме того, Her2t обеспечивает разнообразие репертуара доступных, неиммуногенных селективных маркеров для CAR-перенаправленных Т-клеточных лекарственных средств и может выступать в качестве альтернативы или дополнения к стратегиям отбора на основе EGFRt (т.е. придает Т-клетке двойную специфичность в отношении нескольких опухолевых антигенов-кандидатов).

[000232] Для того чтобы оценить возможность применения Her2t в CAR-терапии, конструировали многодоменную конструкцию ДНК, состоящую из описанных ранее CD19CAR (Hudecek et al 2013) и последовательности T2A, обеспечивающей перескок
45 рибосом, чтобы направить коэкспрессию с Her2t (фигура 1, панель С). Полученную конструкцию CD19CAR-T2A-Her2t затем встраивали в pHIV7 и получали вирусные частицы, как было описано ранее.

[000233] Для того чтобы оценить функциональность Her2t в качестве селективного маркера, по сравнению или совместно с экспрессией EGFRt, CD4⁺ или CD8⁺ клетки

центральной памяти (T_{CM}) (фигура 3, панель А) трансдуцировали панелью вирусных векторов, содержащих CAR-T2A-Her2t и/или CAR-T2A-EGFRt (фигура 3, панель В).

$CD4^+$ или $CD8^+$ T_{CM} , трансдуцированные одним CAR-содержащим вектором, содержали

5 22-72% Her2t⁺ или EGFRt⁺ на этапе предварительного иммуномагнитного отбора с применением биотинилированного герцептина (Her2t) или эрбитукса (EGFRt) и микрогранул, специфичных в отношении биотина, однако популяция была последовательно обогащена до однородной чистоты (>90% после отбора (фигура 3В).

10 Двойные положительные Her2t⁺- и EGFRt⁺-трансдуцированные клетки подвергали другому варианту иммуномагнитной сортировки с применением комбинации Multisort и микрогранул, специфичных в отношении APC (материалы и методы), что позволило получить >90% клеток, положительных в отношении обоих трансгенов (фигура 6).

[000234] Согласно другому варианту двойные трансдуцированные линии клеток могут быть отсортированы с применением свободного биотина или стрептавидина в 15 качестве альтернативы удалению микрогранул. Поскольку обработка данных по средней интенсивности флуоресценции (MFI) проточной цитометрии выявила, что Her2t-отобранные популяции T_{CM} могут экспрессировать более низкие уровни трансгенов по отношению к EGFRt-отобранным популяциям (фигура 3, панель В), далее были 20 проведены исследования прямой корреляционной зависимости между уровнем Her2t и более низким уровнем экспрессии CAR. Для проведения указанных исследований T_{CM} , экспрессирующие CD19CAR, которые были отобраны на основании экспрессии Her2t или EGFRt, лизировали, и клеточные лизаты исследовали с помощью CD3ζ-направленного вестерн-блоттинга. Результаты показывают, что Her2t-соединенные 25 трансгены могут быть отобраны при более высоком уровне экспрессии (например, приблизительно в 2 раза), чем EGFRt-соединенные трансгены (фигура 3, панель С). Полученные результаты означают, что Her2t обеспечивает более строгий процесс отбора по сравнению с отбором на основании экспрессии EGFRt. Результаты исследования методом вестерн-блоттинга также выявили совместную экспрессию CD19CAR и 30 CD20CAR в T_{CM} , подвергнутых двойному отбору (фигура 3, панель С).

Тем, подвергнутые двойному отбору, сохраняют эффекторный фенотип и целевую специфичность в условиях *in vitro*

[000235] Различные типы рака подавляют или вызывают мутации антигенов-мишеней в качестве способа избегания терапии. Следовательно, одновременное нацеленное 35 воздействие на несколько ассоциированных с опухолью антигенов является перспективным терапевтическим подходом к преодолению ускользания опухоли и может расширить терапевтический охват Т-клеточных лекарственных средств. Для того чтобы оценить, может ли совместная экспрессия двух CAR (CD19- и CD20-CAR), опосредованная отбором поверхностного маркера (Her2t и EGFRt), усилить 40 функциональные свойства CAR-перенаправленных Т-клеток, исследовали функцию двойных положительных CAR-экспрессирующих T_{CM} в условиях *in vitro* по сравнению с их моноположительными CAR-экспрессирующими аналогами. Результаты исследования цитотоксичности выявили, что каждая CAR-перенаправленная подгруппа T_{CM} (клетки, экспрессирующие CD19-, CD20- или CD19- и CD20-CAR) приводила к 45 аналогичным уровням специфичного лизиса при использовании в качестве мишеней клеток K562, которые экспрессируют CD19, CD20 или оба белка (фигура 4, панель А), однако не вызывала распознавание CD19-/CD20- исходных клеток-мишеней K562 (фигура 4, панель В).

[000236] Далее исследовали парную функциональность двойных положительных CAR-экспрессирующих T_{CM} в отношении целевой панели K562 (фигура 4, панель B), и полученные результаты выявили, что только двойные положительные CAR-экспрессирующие T_{CM} смогли обеспечить специфичный лизис K562, экспрессирующих все мишени. Напротив, CD19- или CD20-специфичные CAR-экспрессирующие клетки T_{CM} обладали цитолитической активностью только в отношении клеток K562, экспрессирующих их когнатные антигены-мишени (фигура 4, панель B).

[000237] Результаты количественного исследования выработки цитокинов в ответ на стимуляцию целевой панелью K562 указывают на аналогичную специфичность. В то время как ни одна CAR-экспрессирующая T_{CM} не была способна вырабатывать цитокины в ответ на совместное культивирование с исходными клетками K562, двойные положительные CAR-экспрессирующие T_{CM} вырабатывали ИЛ-2, ИФН и ФНО-альфа в ответ на совместное культивирование с клетками, экспрессирующими все мишени, и выработка цитокинов была ограничена целевыми клетками K562/CD19-CD20 и K562/CD19 или K562/CD20 для моноположительных CAR-экспрессирующих T_{CM}. (фигура 4, панель C). Полученные результаты указывают на то, что только двойные положительные CAR-экспрессирующие T_{CM} являются биспецифичными в отношении CD19 и CD20, и опосредуют активацию и нацеливание T-клеток при контакте с каким-либо антигеном по отдельности. Интересно отметить, что Her2t-отобранные CD19CAR-экспрессирующие T_{CM} вырабатывали более разнообразный и расширенный профиль цитокинов (например, приблизительно в 2-3 раза больше) по сравнению с их EGFRt-отобраным аналогом, (фигура 3, панель D). Это может быть связано с узкоспецифичным характером отбора на основании экспрессии Her2t и полученным в результате повышением общего уровня экспрессии CAR в Her2x-отобранных T_{CM}.

[000238] Поскольку противоопухолевая активность CAR коррелирует с пролиферацией и выживанием перенесенных T-клеток, проводили количественное исследование разбавления CFSE, чтобы оценить пролиферацию CAR-модифицированных T_{CM} после связывания с соответствующей мишенью(ми). Было установлено, что двойная экспрессия CAR способствует пролиферации T_{CM} после стимуляции на уровне, который аналогичен таковому для CD19CAR-экспрессирующих T_{CM}.

Отслеживание адоптивно перенесенных Her2t⁺ T-клеток с помощью проточной цитометрии и иммуногистохимии.

[000239] Большинство клинических исследований CAR-терапии на сегодняшний день полагались на методики, основанные на ПЦР, чтобы количественно оценить сохранение генетически модифицированных клеток после терапевтического дозирования. Применение генетических меток, специфичных для конкретного способа терапии, таких как Her2t, может дополнительно обеспечить многопараметрический фенотипический анализ и выявление инъектированных подгрупп CAR-экспрессирующих T-клеток, что может коррелировать с терапевтическими ответами.

[000240] Чтобы оценить возможность применения Her2t в качестве агента для отслеживания в условиях *in vivo*, образцы костного мозга мышей NOD/ScidIL-2R γ C^{null}, которым приживляли CD19CAR⁺Her2t⁺CD4 и CD8 T_{CM}, собирали и исследовали обработанные образцы методом проточной цитометрии. (фигура 5, панель A).

Аналогичные уровни приживления CD45⁺ T-клеток были обнаружены у мышей, которым

вводили клетки, не экспрессирующие маркер, Her2t⁺ и EGFRt⁺ клетки (фигура 5, панель В). Из всей подгруппы CD45⁺ Т-клеток 11,7-45,7% подвергали двойному окрашиванию CD8, что указывает на преимущественное размножение CD4⁺ Т-клеток. Кроме того, совместное окрашивание Her2t с применением биотинилированного герцептина и APC-конъюгированного стрептавида, позволило отличить Her2t⁺ Т-клетки от их Her2t-отрицательных аналогов (фигура 5, панель С). Полученные результаты показывают, что Her2t является перспективным маркером для отслеживания адоптивно перенесенных Т-клеток.

[000241] Далее определяли, является ли Her2t перспективной мишенью для иммуногистохимического окрашивания (ИНС). В качестве предварительного исследования Her2t⁺ клетки прикрепляли к стеклам и окрашивали биотинилированным герцептином и флуорохром-конъюгированным стрептавидином (фигура 5, панель D).

Связывание герцептина с Her2t сенсibiliзирует Т-клетки человека к ADCC.

[000242] Включение механизма безопасности во введенные Т-клетки является значимым признаком в случае возникновения нежелательного клинического явления во время терапии. Исследование цитотоксичности Her2t⁺ или EGFRt⁺ Т-клеток при совместном культивировании с МКПК, стимулированными ГМ-КСФ, в условиях *in vitro* будет проведено с применением герцептина или эрбитукса.

[000243] Клетки Н9 (Т-клетки) (5×10⁶ исходных клеток, Her2t⁺, EGFRt⁺ или Her2t⁺/EGFRt⁺) смешивали и затем подвергали очистке, (фигура 6). Клетки сначала очищали с помощью биотинилированного герцептина и микрогранул, специфичных в отношении биотина, Multisort. Затем микрогранулы Multisort удаляли, и положительную фракцию подвергали очистке с применением эрбитукс-APC и микрогранул, специфичных в отношении APC. Готовая положительная фракция представляла собой двойную положительную фракцию в отношении Her2t и EGFRt. (фигура 6).

[000244] В используемой системе стимулированные МКПК будут выступать в качестве источника эффекторных клеток, способных индуцировать антитело-зависимую цитотоксичность в присутствии антитела. Цель может заключаться в селективном уничтожении Her2t⁺ или EGFRt⁺ клеток, когда к совместной культуре добавляют герцептин или эрбитукс, соответственно. Область применения указанных исследований будет расширена в условиях *in vivo* с применением ffluc⁺ T_{CM}, которые коэкспрессируют Her2t или EGFRt. В этих условиях T_{CM} будут приживлены мышам NOD/Scid IL-2RγC^{null} с последующим введением герцептина или эрбитукса и свежеективированных МКПК. Приживание в условиях *in vivo* и антитело-опосредованное выведение T_{CM} будет измерено с помощью биофотонной визуализации в условиях *in vivo*. Выведение, опосредованное герцептином или эрбитуксом, должно быть специфичным в отношении T_{CM}, экспрессирующих Her2t, EGFRt или оба маркера.

Комбинированный отбор Her2t и EGFRt обеспечивает двойную CAR-специфичность в условиях *in vivo*

[000245] Цель данных экспериментов заключается в том, чтобы показать селективную противоопухолевую активность в условиях *in vivo*. Опухолевые клетки K562 ffluc⁺, которые являются CD19⁺, CD20⁺ или CD19/CD20⁺, получают с помощью подкожной

инъекции в левый или правый бок мышей NOD/ScidIL-2R γ C^{null}. T_{CM}, экспрессирующие CD19CAR-Her2t, CD19CAR-EGFRt, CD20CAR-EGFRt или CD19CAR-Her2t и CD20CAR, вводят внутривенно после образования опухоли, и специфичность T-клеток определяют с помощью биофотонной визуализации. Потеря активности люциферазы опухоли (общий поток фотонов) будет означать регресс опухоли.

[000246] Регрессия опухоли должна происходить для всех опухолевых мишеней, если мыши получают двойные положительные CAR-экспрессирующие T_{CM}, тогда как только CD19- или CD20-экспрессирующие опухоли K562 должны регрессировать, если мыши получают T_{CM}, экспрессирующие их когнатный CAR. Согласно другому варианту CD19⁺, CD20⁺ или CD19/CD20⁺ клетки K562 получают, как описано выше, и ffIuc⁺CAR⁺T_{CM} вводят после образования опухоли. Локализация T_{CM} на основе CAR-специфичности определяют с помощью биофотонной визуализации. Her2t⁺EGFRt⁺T-клетки, подвергнутые двойному отбору, должны быть локализованы на обоих боках, независимо от антигена-мишени на опухолях K562, в то время как клетки, экспрессирующие CD19 или CD20CAR, должны быть локализованы в опухоли K562, содержащей их специфичный антиген-мишень.

Введение линкерного домена (Her2tG) между доменом IV Her2 и трансмембранным доменом позволяет усилить связывание с антителом герцептином.

[000247] На фигуре 7 представлены схемы первичной последовательности Her2t и Her2tG. Her2tG отличается от Her2t добавлением последовательности линкера между доменом IV Her2 и трансмембранным участком, и содержит последовательность GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45), указанная конструкция обозначена Her2tG. Клетки H9 транедуцировали лентивирусами, несущими Her2t или Her2tG, при MOI=1. Транедуцированные клетки затем очищали с помощью биотинилированного герцептина и микрогранул, специфичных в отношении биотина, согласно протоколу производителя. Очищенные популяции затем окрашивали для выявления Her2t или Her2tG с применением биотинилированного герцептина и стрептавидин-фикоэритрина (ФЭ). Данные, представленные на гистограммах, свидетельствуют о более высоком уровне связывания с Her2tG (фигура 8). Как показано на фигуре 9, клетки H9 транедуцировали лентивирусами, взятыми в объеме 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1 и 3 мкл (слева направо), и через пять дней исследовали для определения связывания герцептина. Вариант Her2t, Her2t (CD28hinge), был способен связаться с герцептином с уровнями, аналогичными таковым для исходного Her2t (окрашивание Her2t не показано, использовали данные по интенсивности окрашивания из предшествующих экспериментов). Her2t(IgG4hinge) усиливал связывание герцептина по сравнению с Her2t или Her2t(CD28hinge), тогда как вариант Her2tG обладал наибольшей способностью связывать герцептин и окрашивать транедуцированные клетки H9.

[000248] На основании результатов экспериментов установлено, что линкер (SEQ ID NO: 45) между доменом IV и трансмембранным доменом Her2t позволил получить конструкцию Her2tG. Линкер используют для того чтобы придать гибкость участку последовательности между белковыми доменами. В других примерах scFv многих CAR содержат четыре последовательные субъединицы G3S, помещенные между областями VH и VL из scFv CAR. Это обеспечивает гибкость при складывании двух доменов scFv. Целесообразность подхода в настоящем изобретении заключается в том, что двух линкерных субъединиц G3S достаточно, чтобы обеспечить аналогичную гибкость для Her2tG.

[000249] Две линкерные субъединицы G3S (SEQ ID NO: 45) также применяли для имитации длины спейсера CD28hinge и IgG4hinge. Оба, CD28hinge и IgG4hinge, использовали в качестве спейсеров между scFv и трансмембранной областью в CAR, которые являются функциональными. CD28hinge и IgG4hinge содержат цистеин, который облегчает димеризацию. Несмотря на то, что димеризация обеспечивает преимущества для CAR, она может ингибировать гибкость Her2t и вследствие этого препятствует значительному распознаванию герцептином. Преимущество применения двух линкеров G3S (SEQ ID NO: 45), по сравнению с тремя или четырьмя, заключается в том, чтобы ограничить полезную нагрузку вектора, устранить потенциально ненужные последовательности и в то же время добиться расширенных функциональных возможностей.

[000250] В настоящем документе описан многоцелевой поверхностный маркер клеток, обозначенный Her2t. Указанный новый маркер содержит только 113 из 1255 аминокислот, составляющих полноразмерный Her2, и лишен всех дополнительных или внутриклеточных доменов, ответственных за интактный путь передачи сигналов с участием Her2 в клетке. Гемопозитические клетки лишены экспрессии Her2, что делает Her2t главным кандидатом для применения в качестве селективного маркера трансгенов, который, благодаря его дизайну, является функционально инертными, однако при этом позволяет проводить очистку донорных Т-клеток с получением однородных терапевтических продуктов, экспрессирующих трансген. Дизайн Her2t включает гибридизацию N-концевого фрагмента Her2t с лидерным пептидом альфа-цепи рецептора ГМ-КСФ человека. Гибридизация облегчает поверхностную экспрессию Her2t и обеспечивает уникальное распознавание минимального связывающего эпитопа трастузумабом, моноклональным антителом фармацевтического качества (герцептин).

[000251] Было показано, что благодаря минимальной занимаемой площади кДНК Her2t можно экспрессировать по отдельности или скоординированно встраивать в самоинактивирующиеся лентивирусные векторы совместно с биологически активными трансгенами, а именно химерным антигенным рецептором (CAR). Координированные уровни экспрессии трансгена были достигнуты путем добавления Her2t к CAR посредством ликера T2A, обеспечивающего перескок рибосом, и были проверены методами проточной цитометрии и вестерн-блоттинга Her2t-очищенных CD8 Т-клеток центральной памяти. Кроме того, было показано, что Her2t является узкоспецифичным селективным эпитопом, который, по сравнению со стратегиями, основанными на отборе с помощью EGFRt, позволяет отбирать Т-клетки с более значительным уровнем экспрессии CAR и выработкой эффекторных цитокинов в условиях *ex vivo*. Указанная характеристика может обеспечить преимущества, если желательны более высокие уровни экспрессии трансгена, как в случае расширения области применения CAR-терапии для лечения различных типов опухолей.

[000252] Помимо повышения уровней экспрессии трансгена в Т-клетках, возможность придать отдельным Т-клеткам двойную специфичность в отношении нескольких опухолевых антигенов может обеспечить преимущества в клинических условиях. Действительно, в различных типах рака обычно наблюдается подавление или мутирование антигенов-мишеней, что требует применения стратегий, которые выходят за рамки терапии с применением только одного CAR. Аналогичным образом, было показано, что Her2t является дополнительным селективным эпитопом для EGFRt, что, в случае если каждый селективный эпитоп добавлен к CAR, может облегчить очистку Т-клеток, экспрессирующих два CAR, с применением набора Multisort. Аналогичные уровни цитотоксической активности и выработки эффекторных цитокинов между

моноположительными и двойными положительными CAR-экспрессирующими T-клетками указывают на то, что отдельная или согласованная экспрессия Her2t и EGFRt не приводит к какому-либо явному функциональному нарушению.

[000253] Герцептин поддается биотинилированию или химической конъюгации.

5 Состав герцептина для коммерческого использования восстанавливается H_2O , соответствующей требованиям для применения в клинических условиях, и сохраняет Her2-специфичное высокоаффинное связывание после биотинилирования. Перечисленные признаки, в сочетании с наличием микрогранул, специфичных в отношении биотина (Miltenyi Biotec), соответствующих требованиям кНМП, позволяют отбирать
10 терапевтически значимые Her2t⁺ клетки на устройстве CliniMACS. Было показано, что популяция клеток, содержащая не более 13,8% Her2t-положительных клеток, может быть иммуномагнитно обогащена до чистоты >90%. Кроме того, полученные результаты свидетельствуют о том, что биотинилированный герцептин можно комбинировать с
15 антителами к маркерам T-клеток, чтобы обеспечить многопараметрический фенотипический анализ и отслеживать распределение терапевтических CAR-экспрессирующих T-клеток в условиях *in vivo*.

[000254] Терапевтический охват иммунотерапии на основе CAR быстро расширяется за пределы своего первоначального успеха в лечении опухолей кроветворного
20 происхождения. Существует потребность в других генетических метках, которые по своей природе являются неиммуногенными, уникальными для популяций T-клеток и высокоэффективными при отборе. Her2t обладает всеми вышеупомянутыми характеристиками и обеспечивает разнообразие репертуара селективных эпитопов, которые будут использованы для CAR-терапии. Кроме того, Her2t является главным
25 кандидатом для согласованного отбора терапевтических средств, содержащих CAR, оснащенных мультиплексными генетическими системами.

[000255] Преимущество использования Her2t заключается в его миниатюрном размере. По этой причине Her2t обладает преимуществом эффективной упаковки совместно с
еще большими конструкциями. Для того чтобы воспользоваться преимуществами системы предпочтительно иметь конструкцию с размером менее 5 тыс.п.н. Согласно
30 некоторым вариантам реализации настоящего изобретения размер конструкции составляет 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 14,9 тыс.п.н. или любой размер, который находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя из перечисленных
размеров конструкции. Небольшой размер необходим, поскольку конструкции, размер которых превышает 15 тыс.п.н., могут иметь низкие титры.

35 [000256] Приведенное выше описание иллюстрирует настоящее изобретение и не должно быть истолковано как ограничивающее. Объем настоящего изобретения определен нижеследующей формулой изобретения, которая включает эквиваленты формулы изобретения. Все ссылки и документы, упомянутые в настоящем документе,
40 полностью включены в него посредством ссылки.

Таблица 1 CD19CAR**GMCSFR**ДНК: ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCC

5

АК: M L L L V T S L L L C E L P H P A

CD19scFv

ДНК: TTTCTGCTGATCCCC:GACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGC

10

АК: F L L I P D I Q M T Q T T S S L S

ДНК: GCCAGCCTGGGCGACCGGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATC

АК: A S L G D R V T I S C R A S Q D I

15

ДНК: AGCAKGTACCTGAKCTGGTATCAGCAGAKGCCCCGACGGCACCGTCAKGTG

АК: S K Y L N W Y Q Q K P D G T V K L

ДНК: CTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGGCGTGCCCAGCCGGTTTAGC

20

АК: L I Y H T S R L H S G V P S R F S

ДНК: GGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAКCCTGGAKCAG

АК: G S G S G T D Y S L T I S N L E Q

25

ДНК: GAKGATATCGCCACCTACTTTTGCCAGCAGGGCAKCACTGCCCTACACC

АК: E D I A T Y F C Q Q G N T L P Y T

ДНК: TTTGGCGGCGGAKCAKAGCTGGAKATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGC

30

АК: F G G G T K L E I T G S T S G S G

ДНК: AKGCCTGGCAGCGGCGAGGGCAGCACCAKGGGCGAGGTGAKGCTGCAGGAK

АК: K P G S G E G S T K G E V K L Q E

35

ДНК: AGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACC

АК: S G P G L V A P S Q S L S V T C T

ДНК: GTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCCGGCAGCCC

40

АК: V S G V S L P D Y G V S W I R Q P

ДНК: CCCAGGAKGGGCTGGAKTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACC

АК: P R K G L E W L G V I W G S E T T

45

ДНК: TACTACAКCAGCGCCCTGAKGAGCCGGCTGACCATCATCAKGGACAКCAGC

АК: Y Y N S A L K S R L T I I K D N S

ДНК: AKGAGCCAGGTGTTCCCTGAKGATGAKCAGCCTGCAGACCGACGACACCGCC
AK: K S Q V F L K M N S L Q T D D T A

5

ДНК: ATCTACTACTGCGCCAKGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGAC
AK: I Y Y C A K H Y Y Y G G S Y A M D

IgG4hinge

10

ДНК: TACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGC : GAGAGCAKGTACGGA
AK: Y W G Q G T S V T V S S E S K Y G

CD28tm

15

ДНК: CCGCCCTGCCCCCTTGCCT : ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTTCGGAGGC
AK: P P C P P C P M F W V L V V V G G

20

ДНК: GTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTCACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGG
AK: V L A C Y S L L V T V A F I I F W

41BB

25

ДНК: GTG : AKACGGGGCAGAKAGAKACTCCTGTATATATTCAKACAKCCATTTATG
AK: V K R G R K K L L Y I F K Q P F M

30

ДНК: AGACCAGTACAKACTACTCAKGAGGAKGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCA
AK: R P V Q T T Q E E D G C S C R F P

CD3Zeta

35

ДНК: GAKGAKGAKGAKGGAGGATGTGAKCTGCGGGTGAAG : TTCAGCAGAKGCGCC
AK: E E E E G G C E L R V K F S R S A

ДНК: GACGCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAKTCAGCTGTACAKCGAGCTGAKC
AK: D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N

40

ДНК: CTGGGCAGAKGGGAKGAGTACGACGTCCTGGATAKCGGAGAGGCCGGGAC
AK: L G R R E E Y D V L D K R R G R D

45

ДНК: CCTGAGATGGGCGGCAKGCCTCGGCGGAKGAKCCCCAGGAKGGCCTGTAT
AK: P E M G G K P R R K N P Q E G L Y

ДНК: AKCGAKCTGCAGAKAGACAKGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATG
AK: N E L Q K D K M A E A Y S E I G M

ДНК: AKGGGCGAGCGGAGGCGGGCAKGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCTG

AK: K G E R R R G K G H D G L Y Q G L

ДНК: TCCACCGCCACCAKGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCC

5 AK: S T A T K D T Y D A L H M Q A L P

T2A

ДНК: CCAKGG:CTCGAGGGCGGGCAGAGGGCAGAGGAKGTCTTCTAKCATGCGGT (SEQ ID NO: 46)

10 AK: P R L E G G G E G R G S L L T C G (SEQ ID NO: 2)

ДНК: GACGTGGAGGAGAKTCCCGGCCCTAGG (SEQ ID NO:1)

Таблица 2 Uniprot P10747 CD28 (SEQ ID NO:3)

15
10 20 30 40 50 60

MLRLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYДHKVNLSC KYSYNLFSRE FRASLHKGLD

20
70 80 90 100 110 120

SAVEVCVVYG NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESVTFYLQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP

25
130 140 150 160 170 180

PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR

30
190 200 210 220

SKRSRLHSD YMNMTPRRPG PTRKHYPYA PPRDFAKYRS

1-18 - сигнальный пептид

35 19-152 - внеклеточный домен

153-179 - трансмембранный домен

180-220 - внутриклеточный домен

Положение 186-187 LL→GG

40

45

Таблица 3 Uniprot Q07011 4-1BB (SEQ ID NO:4)

5 10 20 30 40 50 60
 MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR

 10 70 80 90 100 110 120
 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC

 15 130 140 150 160 170 180
 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE

 20 190 200 210 220 230 240
 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG

 25 250
 CSCRFPEEEEE GGCEL

1-23 - сигнальный пептид
 24-186 - внеклеточный домен
 187-213 - трансмембранный домен
 214-255 - внутриклеточный домен

Таблица 4 Uniprot P20963 изоформа 3 CD3ζ человека (SEQ ID NO: 5)

35 10 20 30 40 50 60
 MKWKALFTAK ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD

 40 70 80 90 100 110 120
 APAYQQGQNO LYNELNLGRR EEDVDLDRR GRDPEMGGKP QRRKNPQEGE YNELQKDKMA

 45 130 140 150 160

 EAYSEIGMKG ERRRGKGHDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR

1-21 - сигнальный пептид

22-30 - внеклеточный домен
 31-51 - трансмембранный домен
 52-164 - внутриклеточный домен
 61-89 ITAM1
 100-128 - ITAM2
 131-159 - ITAM3

Таблица 5 Типичная последовательность шарнирной области

10	IgG1 человека	EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 6)
	IgG2 человека	ERKCCVVECPSP (SEQ ID NO:7)
	IgG3 человека	ELKTPPLGDTHTCPSP (EPKSCDTPPPCPSP) ₃ (SEQ ID NO:8)
15	IgG4 человека	ESKYGPPCPSP (SEQ ID NO:9)
	Модифицированный IgG4 человека	ESKYGPPCPPSP (SEQ ID NO: 10)
	Модифицированный IgG4 человека	YGPPCPPSP (SEQ ID NO: 11)
	Модифицированный IgG4 человека	KYGPPCPPSP (SEQ ID NO: 12)
20	Модифицированный IgG4 человека	EVVKYGPSP (SEQ ID NO: 13)

25

30

35

40

45

Таблица 6 Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO:14) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:15) Her2t

HER2t(CHP) Nucleotide and Amino Acid Sequence

5

M L L L V T S L L L C E L P H
 ATGCT TCTCCTGGT ACAAGCCTT TGCTCTGTGA GTTACCACAC
 TACGA AGAGGACCAC TGTTCCGAAG ACGAGACACT CAATGGTGTG

10

P A F L L I P C H P E C Q P Q N G S V T C F G P E A D Q C V A C A H
 CCAGCATCC TCCTGATCCC ATGCCACCCT GAGTGTGAGC CCCAGAATGG CTCAGTGACC TGTTTGGAC CGGAGGCTGA CCAGTGTGTG GCCTGTGCC
 GGTCTAAGG AGGACTAGGG TACGGTGGGA CTACAGTCTG GGTCTTACC GAGTCACTGG ACAAACCTG GGTCCGACT GGTCAACAC CGGACACGG

· Y K D P P F C V A R C P S G V K P D L S Y M P I W K F P D E E G A
 ACATAAGGA CCCTCCTTC TGGTGGCC GTCGCCAG CGGTGTGAA CCTGACCTCT CCTACATGCC CATCTGGAAG TTTCCAGATG AGGAGGGGC
 TGATAATCCT GGGAGGGAAG ACGCACGGG CGACGGGTC GCCACACTT GACTGGAGA GGATGTACGG GTAGACCTTC AAAGGTCTAC TCCTCCCGG

15

· C Q P C P I N C T H S C V D L D D K G C P A E Q R A S P L T E I I
 ATGCCAGCT TGCCCATCA ACTGGACCA CTCCTGTGTG GACTGGATG ACAAGGGCTG CCCGCGAG CAGAGAGCA GCCCTGTAC GTCCATC
 TACGGTGGGA ACGGGTAGT TGACGTGGGT GAGGACACAC CTGGACTAC TGTTCCGAC GGGGGGCTC GTCTCTCGGT CCGGAGACTG CAGGTAGTAG

S A V V G I L L V V V L G V V F G I L I *
 TCTGCGGTG TTGCCATCT GCTGTCTGTG GTCTGGGG TGCTCTTGG GATCCTCATC TGA
 AGACGCCACC AACCGTAAGA CGACCAGCAC CAGACCCCC ACCAGAAACC CTAGGAGTAG ACT

20

1-MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP-22 (GMCSFRss) (SEQ ID NO:17)

563 - CHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSPGVKPDLSYMPI
 WKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLT652

25

(Остатки в последовательности Her2, выделенные жирным шрифтом, идентифицированы как связывающиеся с герцептином) (SEQ ID NO:18)

30

653- SIISAVVGILLVVVLGVVFGILI – 675 (SEQ ID NO:19)

563 - CHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSPGVKPDLSYMPI
 WKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIISAVVGILLVVVLGV
 VFGILI – 675 (SEQ ID NO:20)

35

40

45

Таблица 7 Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO:21) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:22) EGFRt

5 ДНК: **ATGCTTCTCCTGGTGACAKGCCTT**
 АК: M L L L V T S L

ДНК: **CTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCAKAGTG**
 10 АК: L L C E L P H P A F L L I P R K V

ДНК: **TGTAKCGGAKTAGGTATTGGTGAKTТТАKAGACTCACTCTCCATAKATGCT**
 АК: C N G I G I G E F K D S L S I N A

15 ДНК: **ACGAKTATTAKACACTTCAKAKACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCAC**
 АК: T N I K H F K N C T S I S G D L H

ДНК: **ATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTG**
 20 АК: I L P V A F R G D S F T H T P P L

ДНК: **GATCCACAGGAKCTGGATATTCTGAKAKCCGTAKAGGAKATCACAGGGTTT**
 АК: D P Q E L D I L K T V K E I T G F

25 ДНК: **TTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAKAKCAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAG**
 АК: L L I Q A W P E N R T D L H A F E

ДНК: **AKCCTAGAKATCATACGCGGCAGGACCAKGCATGGTCAGTTTTCTCTT**
 30 АК: N L E I I R G R T K Q H G Q F S L

ДНК: **GCAGTCGTCAGCCTGAKCATAKCATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAKGGAG**
 АК: A V V S L N I T S L G L R S L K E

35 ДНК: **ATAKGTGATGGAGATGTGATAKTТTCAGGAKACAKAKATTTGTGCTATGCA**
 АК: I S D G D V I I S G N K N L C Y A

40 ДНК: **AKTACAKTAKACTGGAKAKAKCTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAKAKCCAKA**
 АК: N T I N W K K L F G T S G Q K T K

ДНК: **ATTATAKGCACAGAGGTGAKAKCAGCTGCAKGGCCACAGGCCAGGTCTGC**
 АК: I I S N R G E N S C K A T G Q V C

45 ДНК: **CATGCCTTGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGGGACTGC**
 АК: H A L C S P E G C W G P E P R D C

ДНК: **GTCTCTTGCCGGAKTGTGAGCCGAGGCAGGGAKTGCCTGGACAKGTGCAKC**

АК: V S C R N V S R G R E C V D K C N

5

ДНК: **CTTCTGGAGGGTGAGCCAKGGGAGTTTGTGGAGAKCTCTGAGTGCATACAG**

АК: L L E G E P R E F V E N S E C I Q

ДНК: **TGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAKCATCACCTGCACAGGACGG**

АК: C H P E C L P Q A M N I T C T G R

10

ДНК: **GGACCAGACAKCTGTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGC**

АК: G P D N C I Q C A H Y I D G P H C

15

ДНК: **GTCAGACCTGCCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAKAKCAKACCCTGGTCTGG**

АК: V K T C P A G V M G E N N T L V W

ДНК: **AKGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAКACTGCACC**

АК: K Y A D A G H V C H L C H P N C T

20

ДНК: **TACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAKGGCTGTCCAКGAKTGGGCCTAKG**

АК: Y G C T G P G L E G C P T N G P K

25

ДНК: **ATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTG**

АК: I P S I A T G M V G A L L L L L V

ДНК: **GTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGTGA** (SEQ ID NO:21)

30

АК: V A L G I G L F M * (SEQ ID NO:22)

35

40

45

Таблица 8 Изоформа 1 полноразмерного Her2 (Uniprot P04626-1)(SEQ ID NO:23)

MELAKLCRWG LLLALLPPGA ASTQVCTGTD MKLRLPASPE THLDMLRHLY 50
 5 QGCQVVQGNL ELTYLPTNAS LSFLQDIQEV QGYVLIAHNQ VRQVPLQRLR 100
 IVRGTQLFED NYALAVLDNG DPLNNTTPVT GASPGGLREL QLRSLTEILK 150
 GGVLIQRNPQ LCYQDTILWK DIFHKNNQLA LTLIDTNRSR ACHPCSPMCK 200
 GSRCWGESSE DCQSLTRTVC AGGCARCKGP LPTDCCHEQC AKGCTGPKHS 250
 10 DCLACLHFNH SGICELHCPA LVTYNTDTFE SMPNPEGRYT FGASCVTACP 300
 YNYLSTDVGS CTLVCPLHNQ EVTAEDGTQR CEKCSKPCAR VCYGLGMEHL 350
 REVRAVTSAN IQEFAGCKKI FGSLAFLPES FDGDPASNTA PLQPEQLQVF 400
 ETLEEITGYL YISAWPDSL PDLVVFQNLQV IRGRILHNGA YSLTLQGLGI 450
 15 SWLGLRSLRE LGSGLALIIH NTHLCFVHTV PWDQLFRNPH QALLHTANRP 500
 EDECVGEGLA CHQLCARGHC WPGPPTQCVN CSQFLRGQEC VEECRVLQGL 550
 PREYVVARHC LPCHPECQPQ NGSVTCFGPE ADQCVACAHY KDPPFCVARC 600
 PSGVKPDLSY MPIWKFPDEE GACQPCPINC THSCVDLDDK GCPAEQRASP 650
 20 LTSIISAVVG ILLVVVLGVV FGILIKRRQQ KIRKYTMRRL LQETELVEPL 700
 TPSGAMPNQA QMRILKETEL RKVKVLGSGA FGTVYKGIWI PDGENVKIPV 750
 AIKVLRENTS PKANKEILDE AYVMAGVGSP YVSRLLGICL TSTVQLVTQL 800
 MPYGCLLDHV RENRGRIGSQ DLLNWCMQIA KGMSYLEDVR LVHRDLAKRN 850
 25 VLVKSPNHVK ITDFGLARLL DIDETEYHAD GGKVPKWMA LESILRRRFT 900
 HQSDVWSYGV TVWELMTFGA KPYDGIPARE IPDLLEKGER LPQPPICTID 950
 VYMIMVKCWM IDSECRPRFR ELVSEFSRMA RDPQRFVVIQ NEDLGPASPL 1000
 DSTFYRSLLE DDDMGDLVDA EEYLVPQQGF FCPDPAPGAG GMVHHRHRSS 1050
 30 STRSGGDLT LGLEPSEEEA PRSPLAPSEG AGSDVFDGDL GMGAKKGLQS 1100
 LPTHDPSPLO RYSEDPTVPL PSETDGYVAP LTCSPQPEYV NQPDRPQPP 1150
 SPREGPLPAK RPAGATLERP KTLSPGKNGV VKDVFAFGGA VENPEYLTPQ 1200
 GGAKPQPHPP PAFSPAFDNL YYWDQDPPER GAPPSTFKGT PTAENPEYLG 1250
 35 LDVPV 1255

1-22 - сигнальный пептид

23-652 - внеклеточный домен

653-675 - трансмембранный домен

676-1255 - цитоплазматическая часть

40

45

Таблица 9 Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO:24) и полипептид (SEQ ID No:25) CD20CAR

Последовательность нуклеиновой кислоты scFV CD20

5 AtggagacagacacactcctgctatgggtgctgctgctctgggtccaggtccacaggtgacattgtgctgacctAKtctccagctatcc
 tgtctgcatctccaggggagAKggtcacAKtgacttgaggccagctcAKgtgtAKattacatggactggtaccagAKgAKgccag
 gatcctccccAKaccctggatttatgccacatccAKcctggcttctggagtcctgctcgcttcagtgagcagtgaggctctggacctttac
 10 tctctcacAKtcagcagagtggaggctgAKgatgctgccacttattactgccagcagtgaggattttAKtccaccacggttcggaggggg
 gaccAKgctggAKatAKAKggcagtagcgggtggctccggggcggttccgggtggggcgccagcagcagaggtgcagctgc
 agcagctctggggctgagctgggtgAKgcctggggcctcagtgAKgatgtcctgcAKggcttctggctacacattaccagttacAKtatg
 cactgggtAKagcagacacctggacagggcctggAKtgattggagctatttatccaggAKatggtgatacttctacAKtcagAKgt
 15 tcAKagggAKggccacattgactgcagacAKatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaggactctgcgga
 ctattactgtgcAKgatctAKttattacggtagtagctactggttcttcgatgtctggggcgaggaccacgggtcaccgtctcctca

IgG4-Hinge (SEQ ID NO: 47)

20 GagagcAKgtacggaccgcccctgcccccttgcct

CH3 (SEQ ID NO: 48)

25 GgccagcctcgagagccccaggtgtacaccctgcctccctcccaggAKgagatgaccAKgAKccaggtgtccctgacctgctgggt
 AKgggcttctacccagcgacatcgccgtggagtgggagagcAKcggccagcctgagAKcAKctacAKgaccaccctcccgtgct
 ggacagcgagcggcagcttcttctgtacagccggctgaccgtggacAKgagccgggtggcaggAKggcAKcgtctttagctgcagcgtg
 atgcacgagggcctgcacAKccactacaccagAKgagcctgagcctgtccctgggcAKg

30 Белок scFV CD20 (SEQ ID NO: 25)

M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G D I V L T Q S P A I L S A S P G E K V T M T C R A S S V N Y
 M D W Y Q K K P G S S P K P W I Y A T S N L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S R V E A E D A
 35 A T Y Y C Q Q W S F N P P T F G G G T K L E I K G S T S G G G S G G G S G G G S S E V Q L Q Q S G
 A E L V K P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y N M H W V K Q T P G Q G L E W I G A I Y P G N G D
 T S Y N Q K F K G K A T L T A D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A D Y Y C A R S N Y Y G S S Y W F
 F D V W G A G T T V T V S S

40

IgG4-Hinge (SEQ ID NO: 49)

E S K Y G P P C P P C P

45

CH3 (SEQ ID NO: 50)

G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N
 Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L
 S L S L G K

Остальная часть конструкции CD20CAR (CB28tm-41BB-zeta-T2A-EGFRt) аналогична конструкции CD19CAR-T2A-EGFRt.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- 10 <110> Seattle Children's Hospital
 dba Seattle Children's Research Institute
 Jensen, Michael C.
 Johnson, Adam
- 15 <120> ТРАНСТЕННЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТКИ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ
- <130> SCRI.066WO
- <150> 62/058,973
- <151> 2014-10-02
- <150> 61/977,751
- <151> 2014-04-10
- 20 <150> 61/986,479
- <151> 2014-04-30
- <150> 62/089,730
- <151> 2014-12-09
- <150> 62/090,845
- 25 <151> 2014-12-11
- <150> 62/088,363
- <151> 2014-12-05
- <160> 50
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- 30 <210> 1
- <211> 27
- <212> ДНК
- <213> Искусственная последовательность
- <220>
- 35 <223> CD19CAR ДНК, кодирующая часть модифицированной шарнирной области IgG4
- <400> 1
- gacgtggagg agaatccccgg ccctagg 27
- <210> 2
- <211> 476
- 40 <212> PRT
- <213> Искусственная последовательность
- <220>
- <223> CD19 CAR
- <400> 2
- 45 Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
- 1 5 10 15
- Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
- 20 25 30
- Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser

RU 2 729 112 C2

		35					40					45					
		Gln	Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly
		50						55					60				
		Thr	Val	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val
5		65					70					75				80	
		Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr
						85					90				95		
		Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Gln	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln
					100						105				110		
10		Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile
					115					120				125			
		Thr	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	Glu	Gly	Ser
		130					135						140				
		Thr	Lys	Gly	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala
15		145					150					155				160	
		Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu
						165						170				175	
		Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu
					180						185				190		
20		Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser
					195				200					205			
		Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln
		210						215						220			
		Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr
25		225					230					235				240	
		Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
						245						250				255	
		Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly
					260						265				270		
30		Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Met	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly
					275						280				285		
		Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile
		290						295					300				
		Phe	Trp	Val	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln
35		305					310					315					320
		Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser
						325						330				335	
		Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys
					340						345				350		
40		Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln
					355						360				365		
		Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu
		370						375					380				
		Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg
45		385					390					395					400
		Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met
						405						410				415	
		Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly

RU 2 729 112 C2

420 425 430
 Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
 435 440 445
 Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly
 5 450 455 460
 Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly
 465 470 475
 <210> 3
 <211> 180
 10 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> домен CD28
 <400> 3
 15 Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val
 1 5 10 15
 Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr
 20 20 25 30
 Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser
 20 35 40 45
 Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu
 50 55 60
 Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser
 65 70 75 80
 25 Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr
 85 90 95
 Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys
 100 105 110
 Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser
 30 115 120 125
 Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro
 130 135 140
 Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
 145 150 155 160
 35 Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
 165 170 175
 Phe Trp Val Arg
 180
 <210> 4
 40 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> домен 4-1BB
 45 <400> 4
 Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
 1 5 10 15
 Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro

RU 2 729 112 C2

		20		25		30											
	Ala	Gly	Thr	Phe	Cys	Asp	Asn	Asn	Arg	Asn	Gln	Ile	Cys	Ser	Pro	Cys	
			35					40					45				
	Pro	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Ser	Ala	Gly	Gly	Gln	Arg	Thr	Cys	Asp	Ile	
5		50					55					60					
	Cys	Arg	Gln	Cys	Lys	Gly	Val	Phe	Arg	Thr	Arg	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser	
	65					70					75					80	
	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp	Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly	
				85						90					95		
10	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu	Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	
				100					105					110			
	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp	Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	
			115					120					125				
	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro	Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	
15		130					135					140					
	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr	Lys	Glu	Arg	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	
	145					150					155					160	
	Ser	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	
				165						170					175		
20	Pro	Ala	Arg	Glu	Pro	Gly	His	Ser	Pro	Gln	Ile	Ile	Ser	Phe	Phe	Leu	
				180					185					190			
	Ala	Leu	Thr	Ser	Thr	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Phe	Phe	Leu	Thr	Leu	
			195					200					205				
	Arg	Phe	Ser	Val	Val	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	
25		210					215					220					
	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	
	225					230					235					240	
	<210>	5															
	<211>	164															
30	<212>	PRT															
	<213>	Искусственная последовательность															
	<220>																
	<223>	изоформа 3 zeta CD3 человека															
	<400>	5															
35	Met	Lys	Trp	Lys	Ala	Leu	Phe	Thr	Ala	Ala	Ile	Leu	Gln	Ala	Gln	Leu	
	1			5						10					15		
	Pro	Ile	Thr	Glu	Ala	Gln	Ser	Phe	Gly	Leu	Leu	Asp	Pro	Lys	Leu	Cys	
			20						25					30			
	Tyr	Leu	Leu	Asp	Gly	Ile	Leu	Phe	Ile	Tyr	Gly	Val	Ile	Leu	Thr	Ala	
40			35					40					45				
	Leu	Phe	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	
	50					55						60					
	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	
	65					70					75					80	
45	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	
				85						90					95		
	Gly	Gly	Lys	Pro	Gln	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	
			100						105					110			

RU 2 729 112 C2

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
 115 120 125
 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
 130 135 140
 5 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
 145 150 155 160
 Leu Pro Pro Arg
 <210> 6
 <211> 15
 10 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> шарнирная область IgG1 человека
 <400> 6
 15 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15
 <210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> шарнирная область IgG2 человека
 <400> 7
 Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
 25 1 5 10
 <210> 8
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 30 <220>
 <223> шарнирная область IgG3 человека
 <400> 8
 Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro
 1 5 10 15
 35 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
 20 25 30
 Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro
 35 40 45
 Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 40 50 55 60
 <210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <223> шарнирная область IgG4 человека
 <400> 9
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

1 5 10
 <210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> модифицированная шарнирная область IgG4 человека
 <400> 10
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 10 1 5 10
 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <223> модифицированная шарнирная область IgG4 человека
 <400> 11
 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5
 20 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <223> модифицированная шарнирная область IgG4 человека
 <400> 12
 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 <210> 13
 30 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> модифицированная шарнирная область IgG4 человека
 35 <400> 13
 Glu Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 <210> 14
 <211> 408
 40 <212> DNA
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Her2t (усеченный Her2 белок)
 <400> 14
 45 atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg 60
 atcccatgcc accctgagtg tcagccccag aatggctcag tgacctgtt tggaccggag 120
 gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat aaggaccctc ccttctgcgt ggcccgtgc 180
 cccagcggtg tgaaacctga cctctcctac atgccatct ggaagtttcc agatgaggag 240

ggcgcacatgcc agccttgccc catcaactgc acccactcct gtgtggacct ggatgacaag 300
 ggctgccccg ccgagcagag agccagccct ctgacgtcca tcacatctctgc ggtgggtggc 360
 attctgctgg tcgtggtcctt ggggggtggtc tttgggatcc tcacatctga 408

<210> 15

5 <211> 135

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Her2t (усеченный Her2 белок)

10 <400> 15

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly
 20 25 30

15 Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala
 35 40 45

His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val
 50 55 60

20 Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu
 65 70 75 80

Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp
 85 90 95

Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr
 100 105 110

25 Ser Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly
 115 120 125

Val Val Phe Gly Ile Leu Ile
 130 135

<210> 16

30 <211> 35

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая генетическая метка

35 <400> 16

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly
 20 25 30

40 Ser Val Thr
 35

<210> 17

<211> 22

<212> PRT

45 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> лидерная последовательность расположения белка

<400> 17

RU 2 729 112 C2

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 1 5 10 15
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro
 20
 5 <210> 18
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 10 <223> Фрагмент белка Her2, распознаваемый анти-Her2
 антителом
 <400> 18
 Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly
 1 5 10 15
 15 Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro
 20 25 30
 Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr
 35 40 45
 Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys
 20 50 55 60
 Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys
 65 70 75 80
 Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr
 85 90
 25 <210> 19
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <223> Фрагмент трансмембранного домена Her2, трансмембранный домен Her2
 <400> 19
 Ser Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly
 1 5 10 15
 Val Val Phe Gly Ile Leu Ile Ile
 35 20
 <210> 20
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <223> трансмембранный домен Her2 в виде аминокислот 653-675
 <400> 20
 Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly
 1 5 10 15
 45 Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro
 20 25 30
 Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr
 35 40 45

RU 2 729 112 C2

Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys
50 55 60
Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys
65 70 75 80
5 Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val
85 90 95
Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly Ile Leu
100 105 110
Ile
10 <210> 21
<211> 1074
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
15 <223> кодирующая усеченный рецептор эпидермального фактора роста
<400> 21
atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacaccacgc attcctcctg 60
atcccacgca aagtgtgtaa cggaataggt attggtgaat ttaaagactc actctccata 120
aatgctacga atattaaaca cttcaaaaac tgcacctcca tcagtggcga tctccacatc 180
20 ctgccgggtgg catttagggg tgactccttc acacatactc ctctctgga tccacaggaa 240
ctggatattc tgaaaaccgt aaaggaaatc acagggtttt tgctgattca ggcttggcct 300
gaaaacagga cggacctcca tgcctttgag aacctagaaa tcatacgcgg caggaccaag 360
caacatggtc agttttctct tgcagtcgctc agcctgaaca taacatcctt gggattacgc 420
tccctcaagg agataagtga tggagatgtg ataatttcag gaaacaaaaa tttgtgctat 480
25 gcaaatataca taaactggaa aaaactgttt gggacctccg gtcagaaaaac caaaattata 540
agcaacagag gtgaaaacag ctgcaaggcc acaggccagg tctgccatgc cttgtgctcc 600
cccgagggct gctggggccc ggagcccagg gactgctctc cttgccggaa tgtcagccga 660
ggcaggggat gcgtggacaa gtgcaacctt ctggaggggtg agccaaggga gtttgtggag 720
aactctgagt gcatacagtg ccaccagag tgcctgcctc aggccatgaa catcacctgc 780
30 acaggacggg gaccagacaa ctgtatccag tgtgcccact acattgacgg cccccactgc 840
gtcaagacct gcccggcagg agtcatggga gaaaacaaca ccctggctctg gaagtacgca 900
gacgccggcc atgtgtgcca cctgtgccat ccaaactgca cctacggatg cactgggcca 960
ggctcttgaa gctgtccaac gaatgggcct aagatcccgt ccatcgccac tgggatgggtg 1020
ggggccctcc tcttctgctg ggtggtggcc ctggggatcg gcctcttcat gtga 1074
35 <210> 22
<211> 357
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
40 <223> Усеченный рецептор эпидермального фактора роста
<400> 22
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
45 20 25 30
Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe
35 40 45
Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

RU 2 729 112 C2

	50		55		60														
	Phe	Arg	Gly	Asp	Ser	Phe	Thr	His	Thr	Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu			
	65					70					75				80				
	Leu	Asp	Ile	Leu	Lys	Thr	Val	Lys	Glu	Ile	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Ile			
5					85					90					95				
	Gln	Ala	Trp	Pro	Glu	Asn	Arg	Thr	Asp	Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu			
				100					105					110					
	Glu	Ile	Ile	Arg	Gly	Arg	Thr	Lys	Gln	His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala			
				115					120					125					
10	Val	Val	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ser	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu			
				130					135					140					
	Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val	Ile	Ile	Ser	Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr			
	145					150					155				160				
	Ala	Asn	Thr	Ile	Asn	Trp	Lys	Lys	Leu	Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys			
15					165						170				175				
	Thr	Lys	Ile	Ile	Ser	Asn	Arg	Gly	Glu	Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly			
				180							185				190				
	Gln	Val	Cys	His	Ala	Leu	Cys	Ser	Pro	Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu			
				195					200					205					
20	Pro	Arg	Asp	Cys	Val	Ser	Cys	Arg	Asn	Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys			
				210					215					220					
	Val	Asp	Lys	Cys	Asn	Leu	Leu	Glu	Gly	Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Val	Glu			
	225					230					235				240				
	Asn	Ser	Glu	Cys	Ile	Gln	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met			
25					245						250				255				
	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala			
				260							265				270				
	His	Tyr	Ile	Asp	Gly	Pro	His	Cys	Val	Lys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val			
				275							280				285				
30	Met	Gly	Glu	Asn	Asn	Thr	Leu	Val	Trp	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ala	Gly	His			
							295						300						
	Val	Cys	His	Leu	Cys	His	Pro	Asn	Cys	Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro			
	305					310						315			320				
	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Pro	Thr	Asn	Gly	Pro	Lys	Ile	Pro	Ser	Ile	Ala			
35					325						330				335				
	Thr	Gly	Met	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Val	Ala	Leu	Gly			
				340							345				350				
	Ile	Gly	Leu	Phe	Met														
				355															
40	<210>	23																	
	<211>	1255																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Искусственная последовательность																	
	<220>																		
45	<223>	Полноразмерная изоформа 1 Her2 человека																	
	<400>	23																	
	Met	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Cys	Arg	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu			
	1				5					10					15				

RU 2 729 112 C2

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
 20 25 30
 Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
 35 40 45
 5 Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
 50 55 60
 Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
 65 70 75 80
 Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
 10 85 90 95
 Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
 100 105 110
 Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
 115 120 125
 15 Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
 130 135 140
 Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
 145 150 155 160
 Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
 20 165 170 175
 Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
 180 185 190
 His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
 195 200 205
 25 Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
 210 215 220
 Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
 225 230 235 240
 Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
 30 245 250 255
 His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
 260 265 270
 Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg
 275 280 285
 35 Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu
 290 295 300
 Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
 305 310 315 320
 Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
 40 325 330 335
 Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
 340 345 350
 Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
 355 360 365
 45 Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
 370 375 380
 Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
 385 390 395 400

RU 2 729 112 C2

Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
 405 410 415
 Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
 420 425 430
 5 Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
 435 440 445
 Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
 450 455 460
 Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
 10 465 470 475 480
 Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
 485 490 495
 Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
 500 505 510
 15 Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
 515 520 525
 Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
 530 535 540
 Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
 20 545 550 555 560
 Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
 565 570 575
 Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
 580 585 590
 25 Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
 595 600 605
 Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
 610 615 620
 Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
 30 625 630 635 640
 Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser
 645 650 655
 Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly
 660 665 670
 35 Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
 675 680 685
 Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
 690 695 700
 Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
 40 705 710 715 720
 Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
 725 730 735
 Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
 740 745 750
 45 Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
 755 760 765
 Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
 770 775 780

RU 2 729 112 C2

Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
 785 790 795 800
 Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
 805 810 815
 5 Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
 820 825 830
 Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
 835 840 845
 Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
 10 850 855 860
 Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
 865 870 875 880
 Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
 885 890 895
 15 Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
 900 905 910
 Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
 915 920 925
 Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
 20 930 935 940
 Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
 945 950 955 960
 Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
 965 970 975
 25 Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
 980 985 990
 Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
 995 1000 1005
 Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu
 30 1010 1015 1020
 Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly
 1025 1030 1035 1040
 Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly
 1045 1050 1055
 35 Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg
 1060 1065 1070
 Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly
 1075 1080 1085
 Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His
 40 1090 1095 1100
 Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu
 1105 1110 1115 1120
 Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln
 1125 1130 1135
 45 Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro
 1140 1145 1150
 Arg Glu Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu
 1155 1160 1165

RU 2 729 112 C2

Arg Pro Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val
 1170 1175 1180
 Phe Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln
 1185 1190 1195 1200
 5 Gly Gly Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala
 1205 1210 1215
 Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala
 1220 1225 1230
 Pro Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
 10 1235 1240 1245
 Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
 1250 1255
 <210> 24
 <211> 798
 15 <212> DNA
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CD20CAR ДНК химерного антигенного рецептора
 <400> 24
 20 atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt 60
 gacattgtgc tgacccaatc tccagctatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca 120
 atgacttgca gggccagctc aagtgtaaat tacatggact ggtaccagaa gaagccagga 180
 tcctccccc aaccctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 240
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcagagt ggaggctgaa 300
 25 gatgctgcca cttattactg ccagcagtg agttttaat caccacggt cggagggggg 360
 accaagctgg aaataaaagg cagtactagc ggtgggtggct ccgggggagg ttccgggtggg 420
 ggcggcagca gcgaggtgca gctgcagcag tctggggctg agctggtgaa gcctggggcc 480
 tcagtgaaga tgtcctgcaa ggcttctggc tacacattta ccagttacia tatgactggt 540
 gtaaagcaga cacctggaca gggcctggaa tggattggag ctatttatcc aggaaatggt 600
 30 gatacttcct acaatcagaa gttcaaaggc aaggccacat tgactgcaga caaatcctcc 660
 agcacagcct acatgcagct cagcagcctg acatctgagg actctgcgga ctattactgt 720
 gcaagatcta attattacgg tagtagctac tggttcttcg atgtctgggg cgcagggacc 780
 acggtcaccg tctcctca 798
 <210> 25
 35 <211> 266
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CD20CAR синтетический конструктор
 40 <400> 25
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
 20 25 30
 45 Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
 35 40 45
 Val Asn Tyr Met Asp Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
 50 55 60

RU 2 729 112 C2

Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
65 70 75 80
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95
5 Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe
100 105 110
Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser
115 120 125
10 Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
145 150 155 160
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175
15 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205
20 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Asp Tyr Tyr Cys
225 230 235 240
Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp
245 250 255
25 Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
260 265

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

30 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Саморасщепляющийся линкер T2A

<400> 26

Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly
35 1 5 10 15

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

40 <220>

<223> Вариабельная область легкой цепи, содержащая CDRL1

<400> 27

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn
1 5 10

45 <210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp
 1 5 10
 <210> 34
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Вариабельная область легкой цепи, содержащая CDRL2
 <400> 34
 10 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Вариабельная область легкой цепи, содержащая CDRL3
 <400> 35
 Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
 20 1 5
 <210> 36
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <223> Вариабельная область тяжелой цепи, содержащая последовательность CDRH1, синтетическую или человеческую последовательность
 <400> 36
 Ser Tyr Asn Met His
 30 1 5
 <210> 37
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <223> CDRH2, вариабельная область тяжелой цепи, содержащая синтетическую гуманизированную или человеческую последовательность
 <400> 37
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 40 1 5 10 15
 Gly
 <210> 38
 <211> 13
 <212> PRT
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> вариабельная область тяжелой цепи, содержащая CDRH3, синтетическую гуманизированную или человеческую последовательность

<400> 38
 Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp Val
 1 5 10
 <210> 39
 5 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> аминокислоты гибкого линкера
 10 <400> 39
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 Lys Gly
 <210> 40
 15 <211> 429
 <212> DNA
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Her2 домен IV и 7 аминокислотный линкер
 20 <400> 40
 atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg 60
 atcccatgcc accctgagtg tcagccccag aatggctcag tgacctgttt tggaccggag 120
 gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat aaggaccctc ccttctgcgt ggcccgctgc 180
 cccagcgggtg tgaaacctga cctctcctac atgcccatct ggaagtttcc agatgaggag 240
 25 ggcgcatgcc agccttgccc catcaactgc acccactcct gtgtggacct ggatgacaag 300
 ggctgccccg ccgagcagag agccagcccc ttaacgggtg gaggcagcgg aggtggctcc 360
 atcatctctg cggtggttgg cattctgctg gtcgtggtct tgggggtggt ctttgggatc 420
 ctcatctga 429
 <210> 41
 30 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Her2 домен IV и 7 аминокислотный линкер
 35 <400> 41
 Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 1 5 10 15
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly
 20 25 30
 40 Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala
 35 40 45
 His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val
 50 55 60
 Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu
 45 65 70 75 80
 Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp
 85 90 95
 Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr

	100		105		110
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile				
	115		120		125
	Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly Ile Leu Ile				
5	130		135		140
	<210> 42				
	<211> 5				
	<212> PRT				
	<213> Искусственная последовательность				
10	<220>				
	<223> Петля 1 белка Her2, область белка, белок человека				
	<400> 42				
	Glu Ala Asp Gln Cys				
15	1		5		
	<210> 43				
	<211> 4				
	<212> PRT				
	<213> Искусственная последовательность				
20	<220>				
	<223> Петля 2 белка Her2, область белка, белок человека				
	<400> 43				
	Asp Pro Pro Phe				
25	1				
	<210> 44				
	<211> 10				
	<212> PRT				
	<213> Искусственная последовательность				
30	<220>				
	<223> Петля 3 белка Her2, область белка, белок человека				
	<400> 44				
	Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro				
35	1		5		10
	<210> 45				
	<211> 8				
	<212> PRT				
	<213> Искусственная последовательность				
40	<220>				
	<223> Синтетический линкер				
	<400> 45				
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser				
45	1		5		
	<210> 46				
	<211> 1428				
	<212> DNA				
	<213> Искусственная последовательность				

<220>

<223> CD19 CAR

<400> 46

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60
 5 atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg 120
 gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag 180
 aagcccgcag gcaccgtcaa gctgctgatc taccacacca gccggctgca cagcggcgtg 240
 cccagccggg ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg 300
 gaacaggaag atatcgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacaccttt 360
 10 ggcggcgga caaagctgga aatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc 420
 ggcgagggca gcaccaaggg cgaggtgaag ctgcagaaa gcggccctgg cctgggtggc 480
 cccagccaga gcctgagcgt gacctgcacc gtgagcggcg tgagcctgcc cgactacggc 540
 gtgagctgga tccggcagcc ccccaggaag ggctggaat ggctgggctg gatctggggc 600
 agcgagacca cctactacaa cagcgccttg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac 660
 15 agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac 720
 tactgcgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc 780
 accagcgtga ccgtgagcag cgagagcaag tacggaccgc cctgcccccc ttgccctatg 840
 ttctgggtgc tgggtgggtg cggagcgtg ctggcctgct acagcctgct ggtcaccgtg 900
 gccttcatca tcttttgggt gaaacggggc agaaagaaac tctgtatat attcaaaaa 960
 20 ccatttatga gaccagtaca aactactcaa gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca 1020
 gaagaagaag aaggaggatg tgaactgcgg gtgaagtcca gcagaagcgc cgacgccctt 1080
 gcctaccagc agggccagaa tcagctgtac aacgagctga acctgggagc aaggaagag 1140
 tacgacgtcc tggataagcg gagagccggg gaccctgaga tgggcggcaa gcctcggcgg 1200
 aagaaccccc aggaaggcct gtataacgaa ctgcagaaa acaagatggc cgaggcctac 1260
 25 agcgagatcg gcatgaaggg cgagcggagg cggggcaagg gccacgacgg cctgtatcag 1320
 ggctgtcca ccgccaccaa ggatacctac gacgcctgc acatgcaggc cctgccccca 1380
 aggctcgagg gcggcggaga gggcagagga agtcttctaa catgcggt 1428

<210> 47

<211> 36

30 <212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> IgG4-шарнир

<400> 47

35 gagagcaagt acggaccgcc ctgccccct tgcct 36

<210> 48

<211> 321

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

40 <220>

<223> шарнирная область СН3

<400> 48

ggccagcctc gcgagcccca ggtgtacacc ctgcctccct cccaggaaga gatgaccaag 60
 aaccaggtgt ccctgacctg cctggtgaag ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 120
 45 tgggagagca acggccagcc tgagaacaac tacaagacca cccctcccgt gctggacagc 180
 gacggcagct tcttctgtga cagccggctg accgtggaca agagccggtg gcaggaaggc 240
 aacgtcttta gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 300
 ctgagcctgt ccctgggcaa g 321

<210> 49
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <223> IgG4-шарнир
 <400> 49
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 10 <210> 50
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <223> шарнирная область CH3
 <400> 50
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 1 5 10 15
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 20 25 30
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60
 25 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 30 100 105

(57) Формула изобретения

1. Полипептид для мечения клетки, содержащий: внеклеточный домен полипептида HER2, спейсер, соединенный с С-концом внеклеточного домена полипептида HER2, и трансмембранный домен, соединенный с С-концом спейсера;

причем указанный внеклеточный домен полипептида HER2 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотам с 563 по 652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23,

причем указанный спейсер выбран из группы, состоящей из шарнирного домена CD28, шарнирного домена IgG4, имеющего аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 09-13, и аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45,

причем указанный полипептид специфично связывается с антителом, которое связывается с эпитопом в домене IV HER2, и

при этом указанный полипептид не содержит домен I HER2, соответствующий аминокислотам 23-217 последовательности SEQ ID NO: 23, домен II HER2, соответствующий аминокислотам 218-341 последовательности SEQ ID NO: 23, домен III HER2, соответствующий аминокислотам 342-510 последовательности SEQ ID NO:

23, и внутриклеточный домен HER2.

2. Полипептид по п. 1, отличающийся тем, что указанный спейсер содержит шарнирный домен IgG4, имеющий аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 09-13.

5 3. Полипептид по п. 1, отличающийся тем, что указанный шарнирный домен IgG4 имеет аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 10-13.

4. Полипептид по п. 1, отличающийся тем, что указанный шарнирный домен IgG4 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 09.

10 5. Полипептид по п. 1, отличающийся тем, что указанный спейсер имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45.

6. Полипептид по п. 1, отличающийся тем, что указанный спейсер содержит шарнирный домен CD28.

7. Полипептид по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что указанный полипептид
15 содержит такие аминокислоты как глутаминовая кислота в положении 580, аспарагиновая кислота в положении 582, аспарагиновая кислота в положении 592, фенилаланин в положении 595 и глутамин в положении 624 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23.

8. Полипептид по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный внеклеточный
20 домен полипептида HER2 имеет аминокислотную последовательность из аминокислот 563-652 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23.

9. Полипептид по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что указанный трансмембранный домен имеет аминокислотную последовательность из аминокислот 653-675 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23.

25 10. Полипептид по любому из пп. 1-9, дополнительно содержащий лидерный пептид, который обеспечивает экспрессию на поверхности клеток.

11. Полипептид по п. 10, отличающийся тем, что указанный лидерный пептид имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17.

30 12. Полипептид по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой Трастузумаб или Цетуксимаб.

13. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по любому из пп. 1-12.

14. Клетка-хозяин для отбора с помощью метки, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 13, причем указанная клетка-хозяин не является эмбриональной клеткой человека.

35 15. Клетка-хозяин по п. 14, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из CD8 Т-клетки, CD4 Т-клетки, CD4 наивной Т-клетки, CD8 наивной Т-клетки, CD8 клетки центральной памяти и CD4 клетки центральной памяти.

16. Клетка-хозяин по п. 14 или 15, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин является аутологичной.

40 17. Клетка-хозяин по любому из пп. 14-16, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин является антигенспецифичной.

18. Клетка-хозяин по п. 14, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин представляет собой клетку-предшественника Т-лимфоцитов.

19. Клетка-хозяин по п. 14, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку.

45 20. Способ получения обогащенной популяции меченых клеток, включающий: введение нуклеиновой кислоты по п. 13 в клетку, причем указанная клетка не является эмбриональной клеткой человека;

культивирование указанной клетки в среде, содержащей по меньшей мере один

фактор роста, для получения популяции меченых клеток; и

обогащение мечеными клетками, экспрессирующими указанный полипептид, путем приведения популяции меченых клеток в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с указанным полипептидом.

5

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что указанный фактор роста выбран из группы, состоящей из ИЛ-15, ИЛ-7, ИЛ-21, ИЛ-2 и их комбинации.

22. Способ по п. 20, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой Трастузумаб или Цетуксимаб.

10

15

20

25

30

35

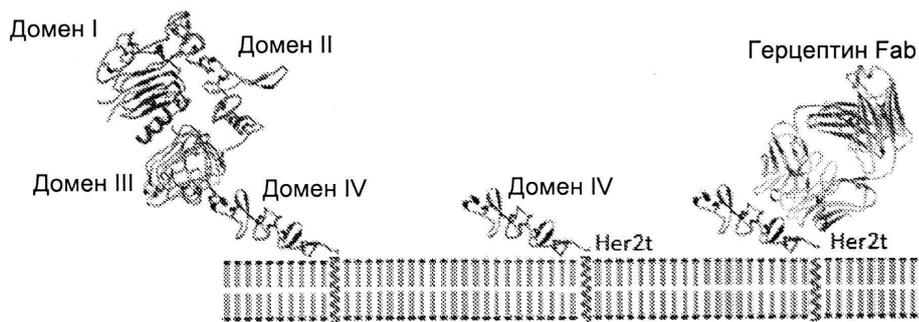
40

45

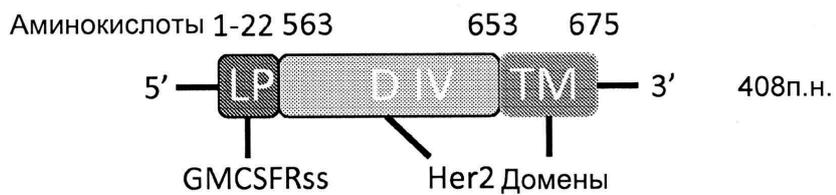
1

1/25

ФИГ. 1А

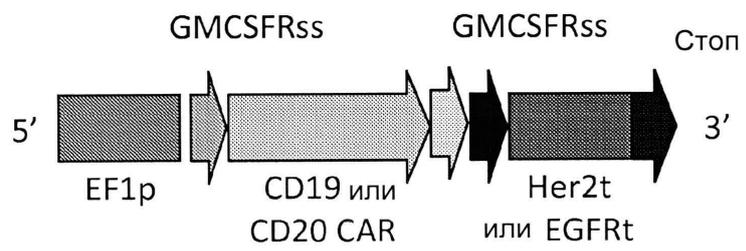


ФИГ. 1В

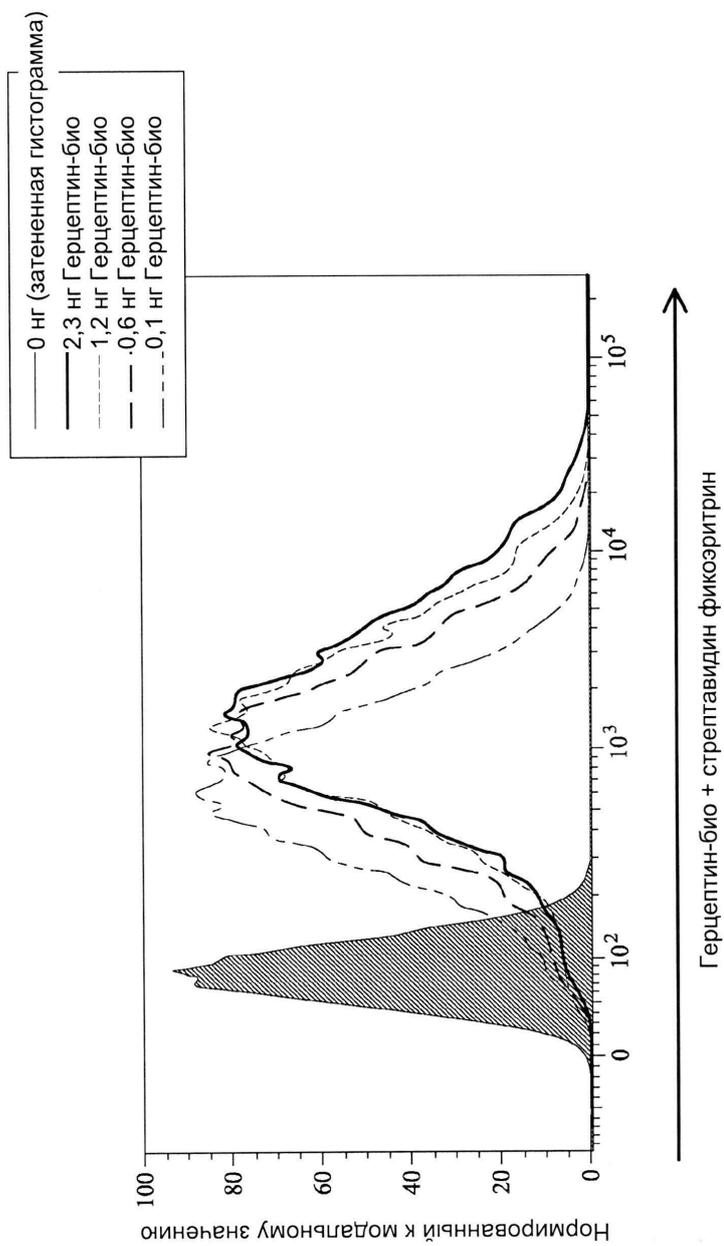


2

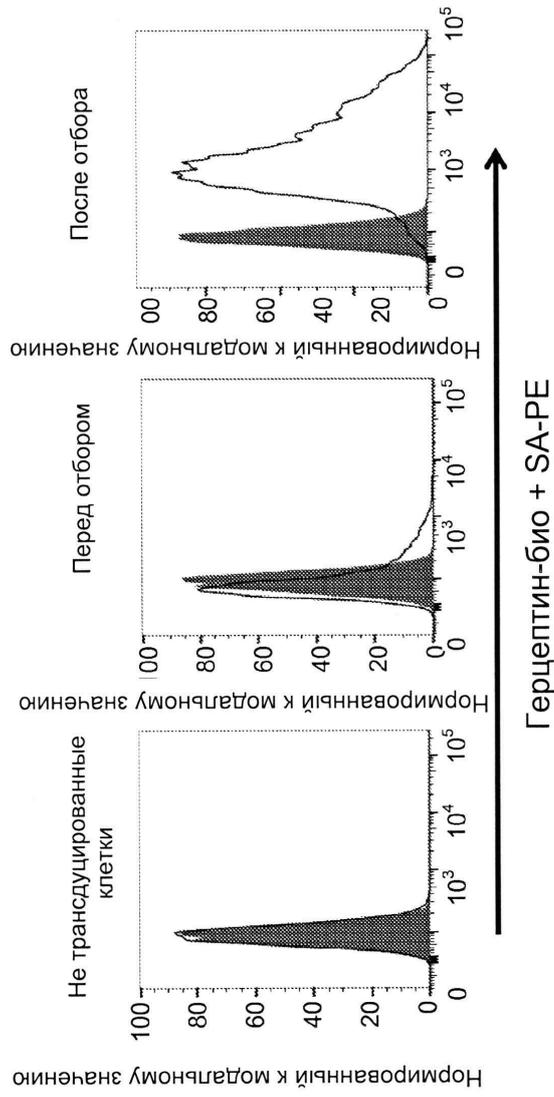
ФИГ. 1С



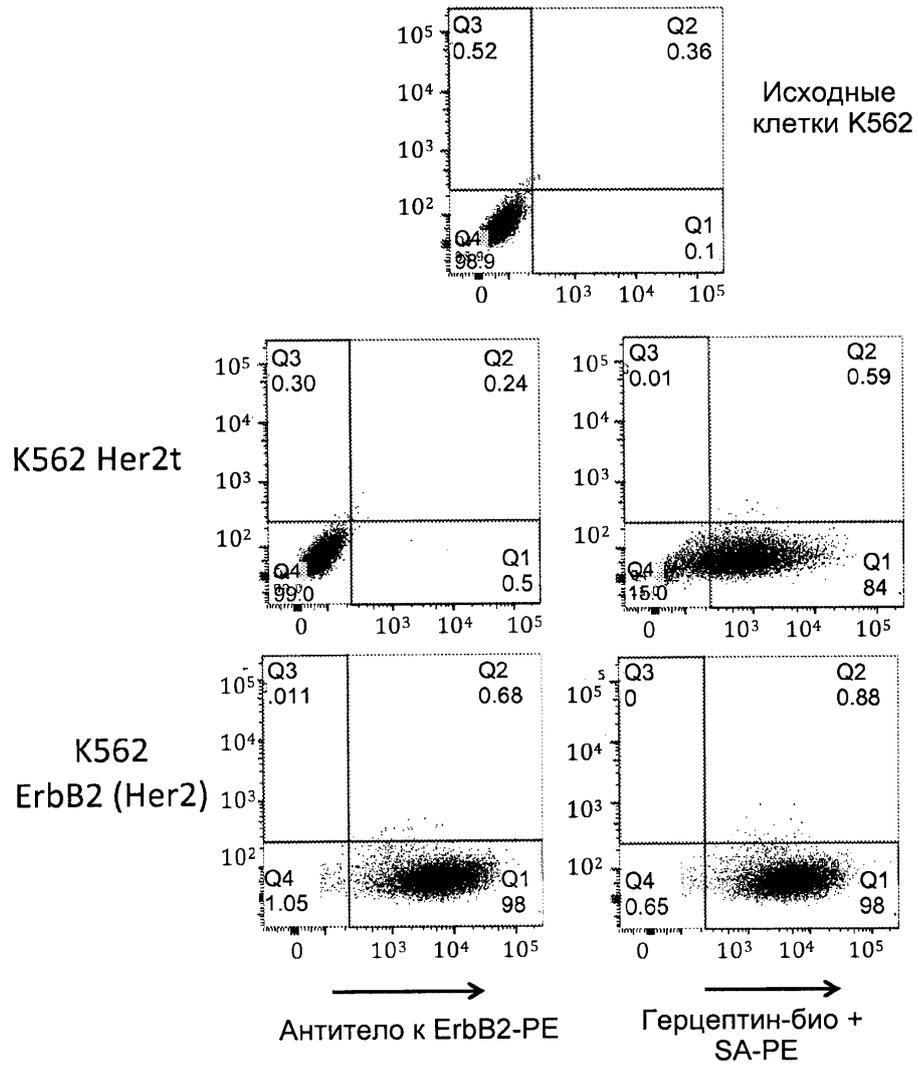
ФИГ. 2А



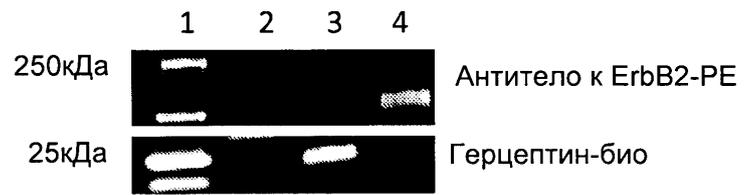
ФИГ. 2В



ФИГ. 2С

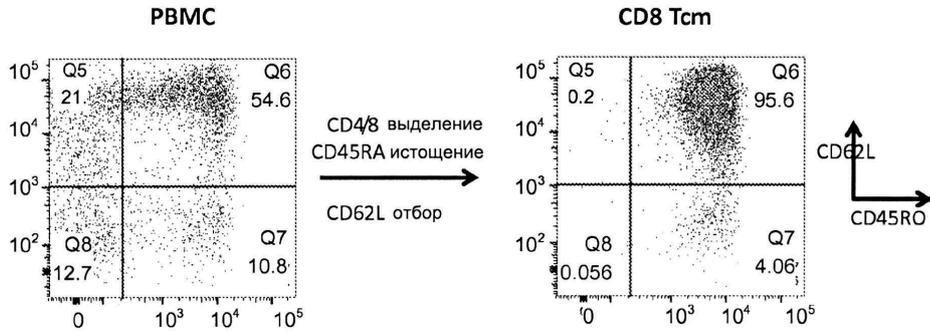


ФИГ. 2D

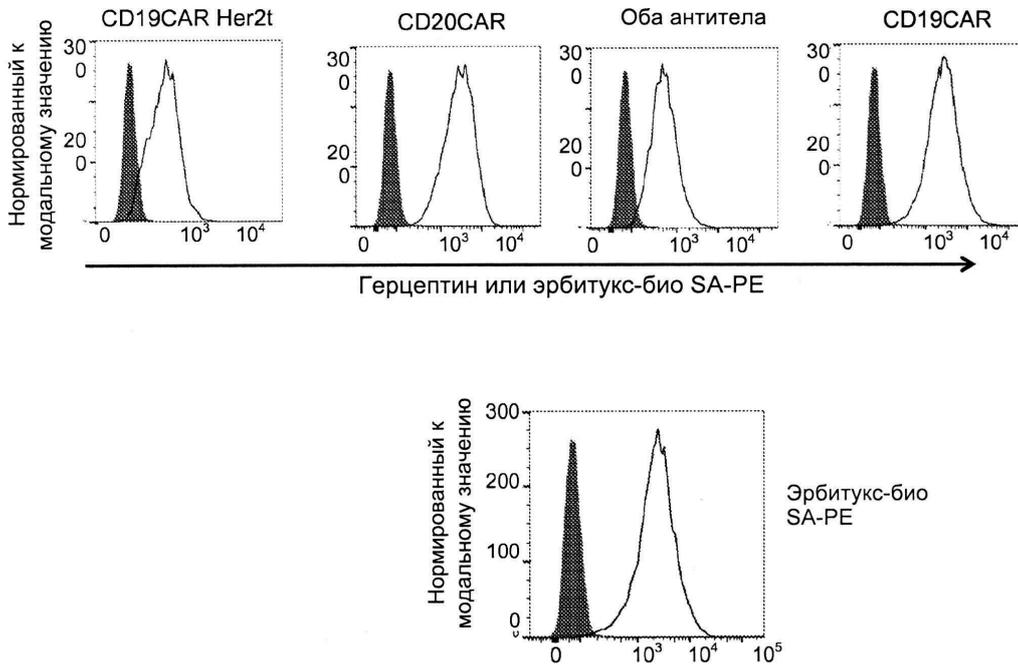


7/25

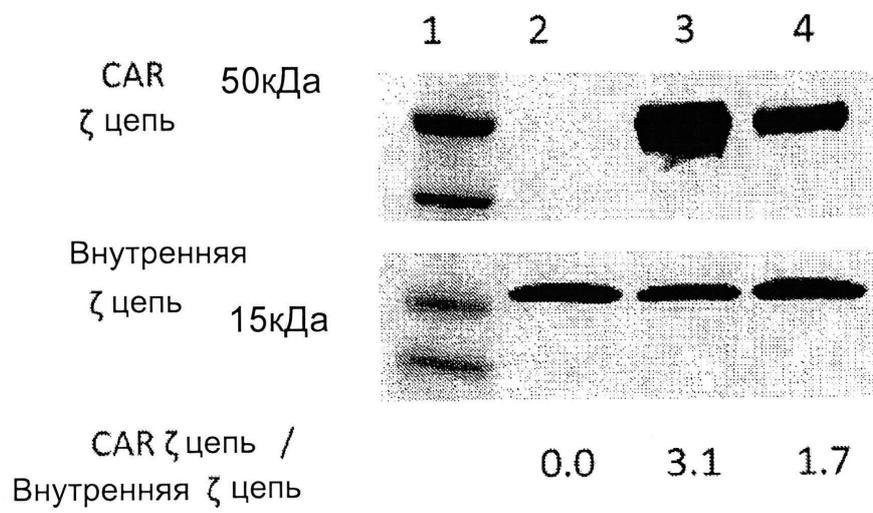
ФИГ. 3А



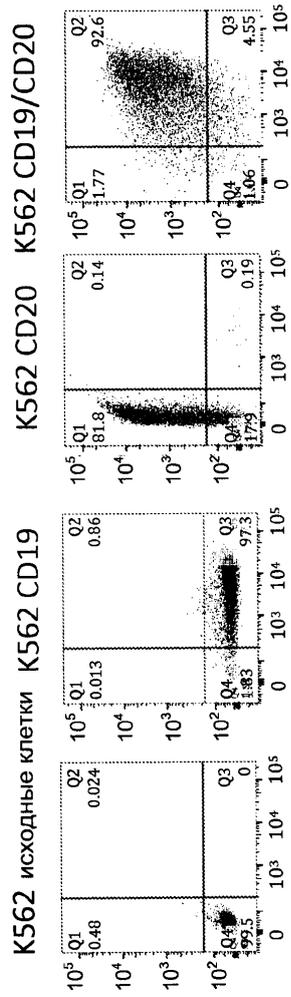
ФИГ. 3В



ФИГ. 3С



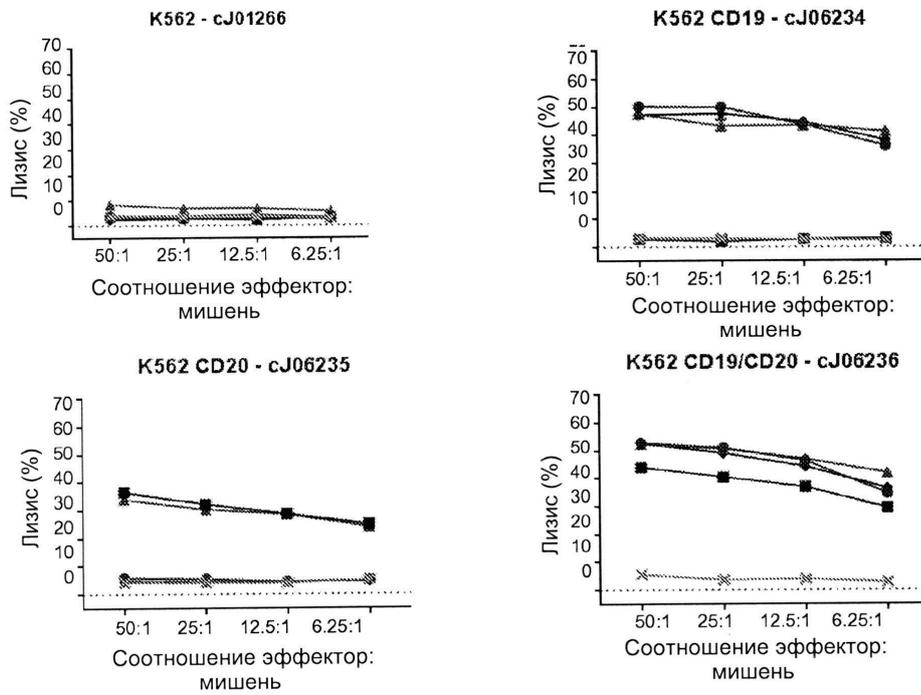
ФИГ. 4А



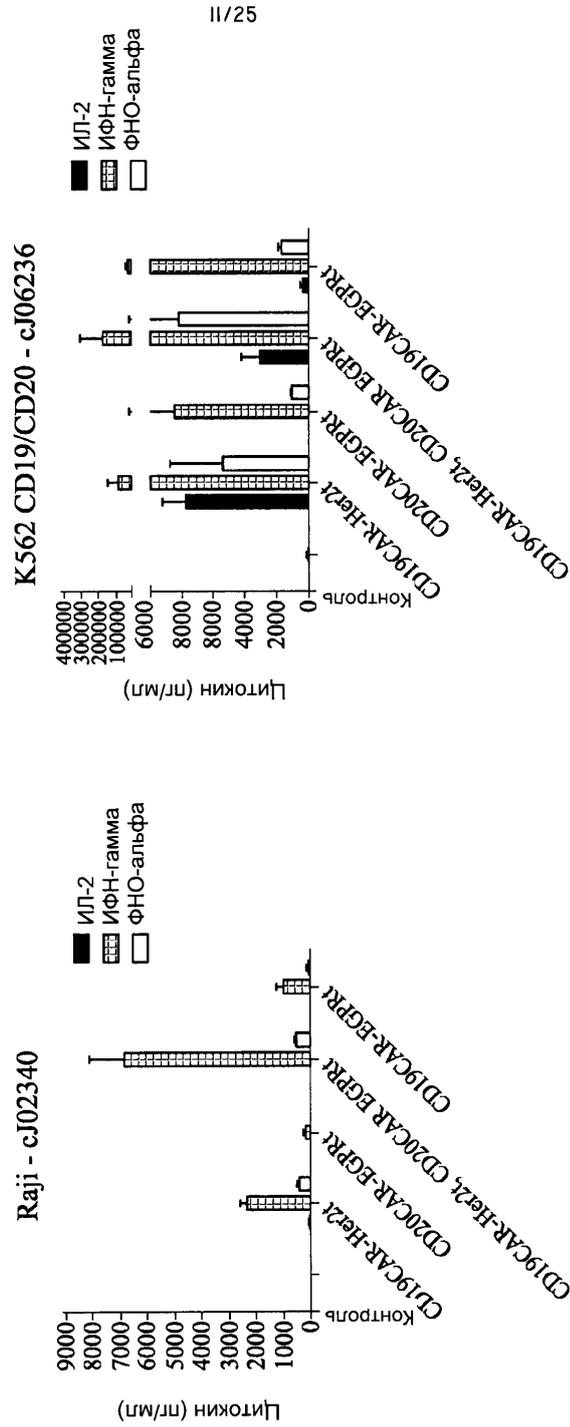
10/25

ФИГ. 4В

- ⊗ Контроль
- CD19CAR-Her2t
- CD20CAR-EGFRt
- ▲ CD19CAR-Her2t/CD20CAR-EGFRt
- ◆ CD19CAR-EGFRt

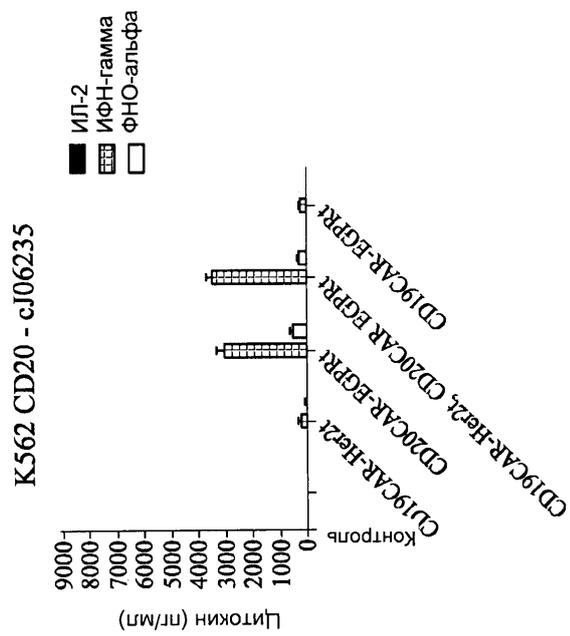


ФИГ. 4С

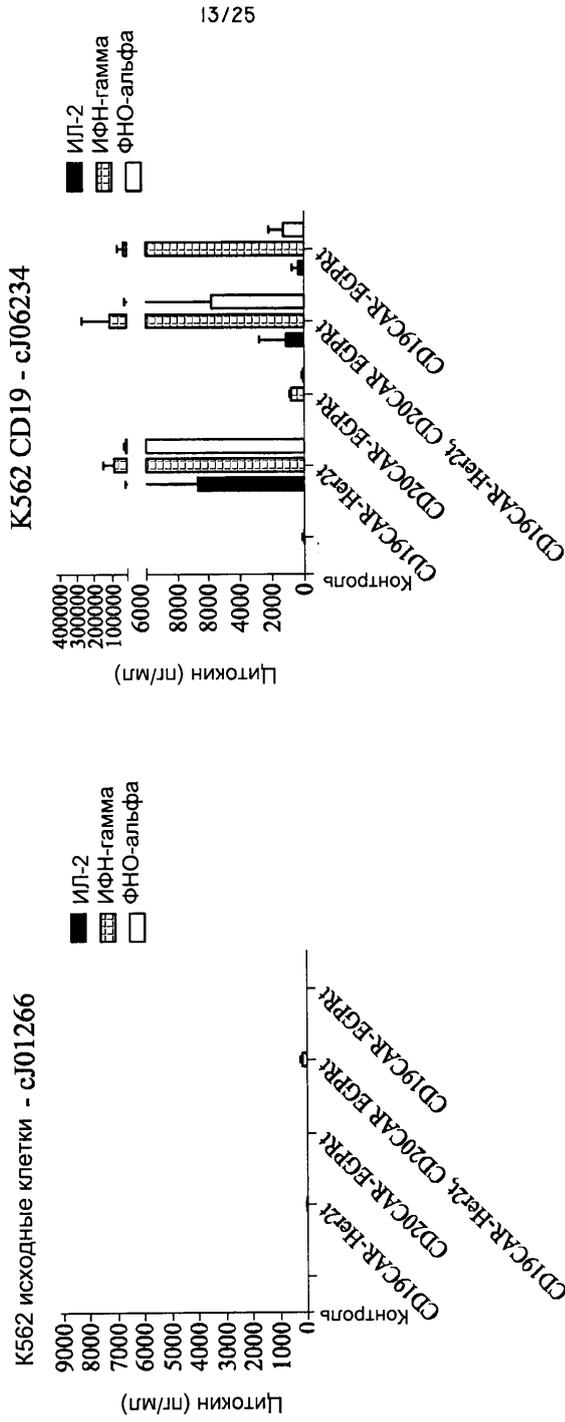


12/25

ФИГ. 4С (Продолж.)

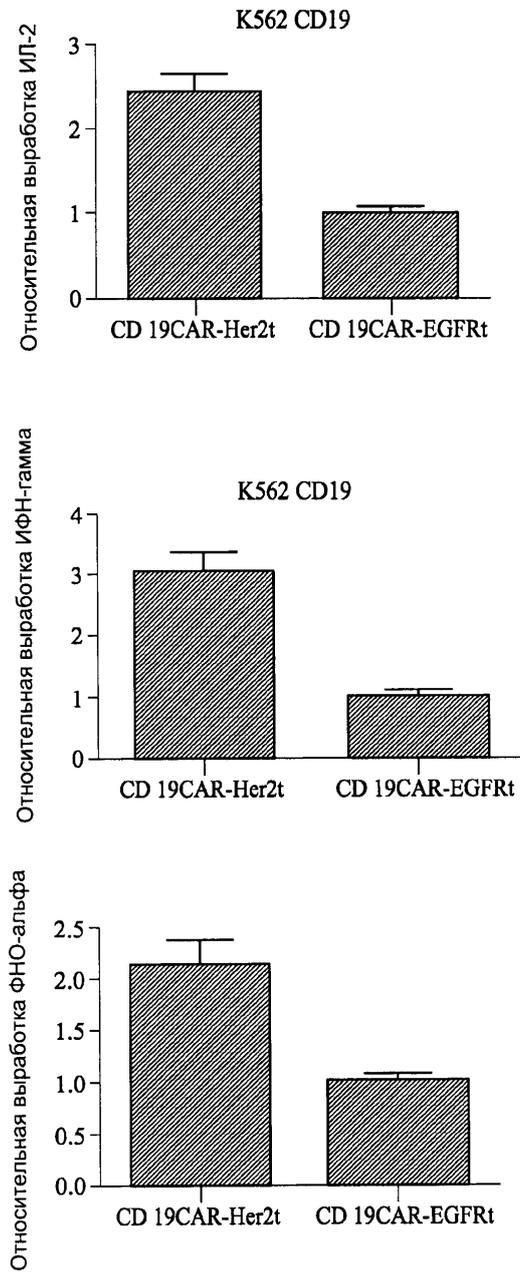


ФИГ. 4С (Продолж.)

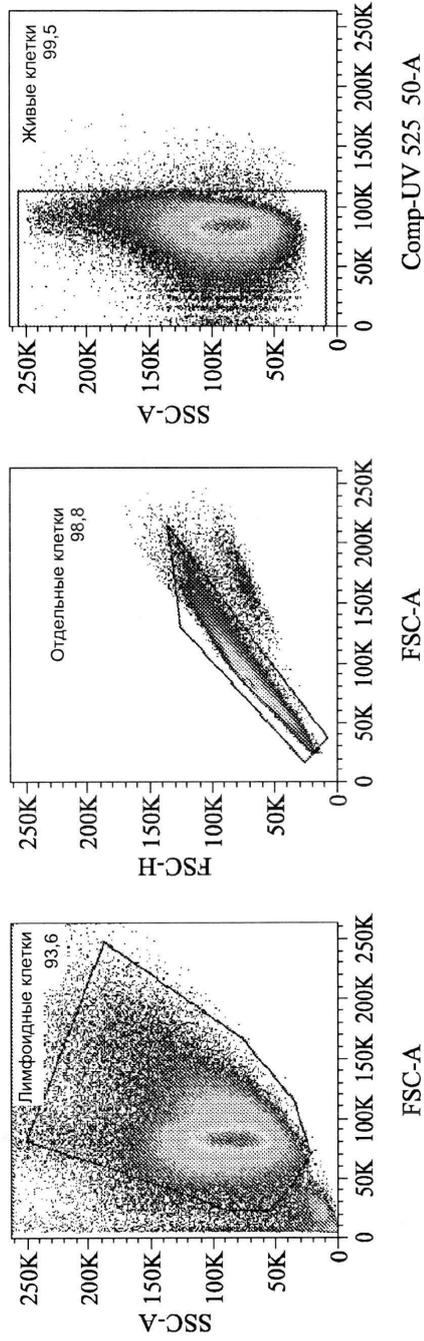


14/25

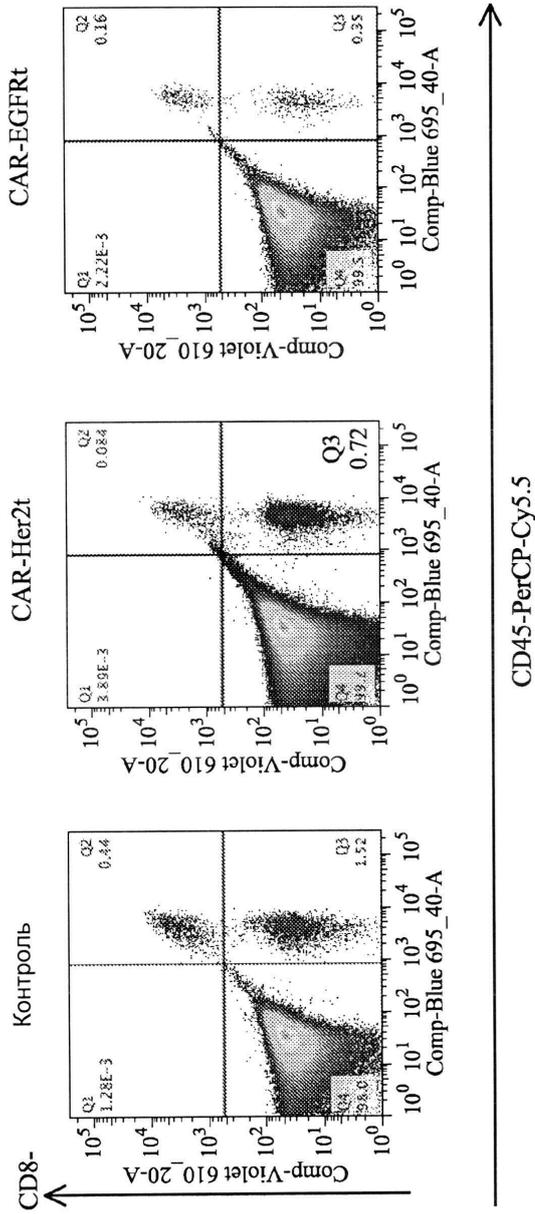
ФИГ. 4D



ФИГ. 5А

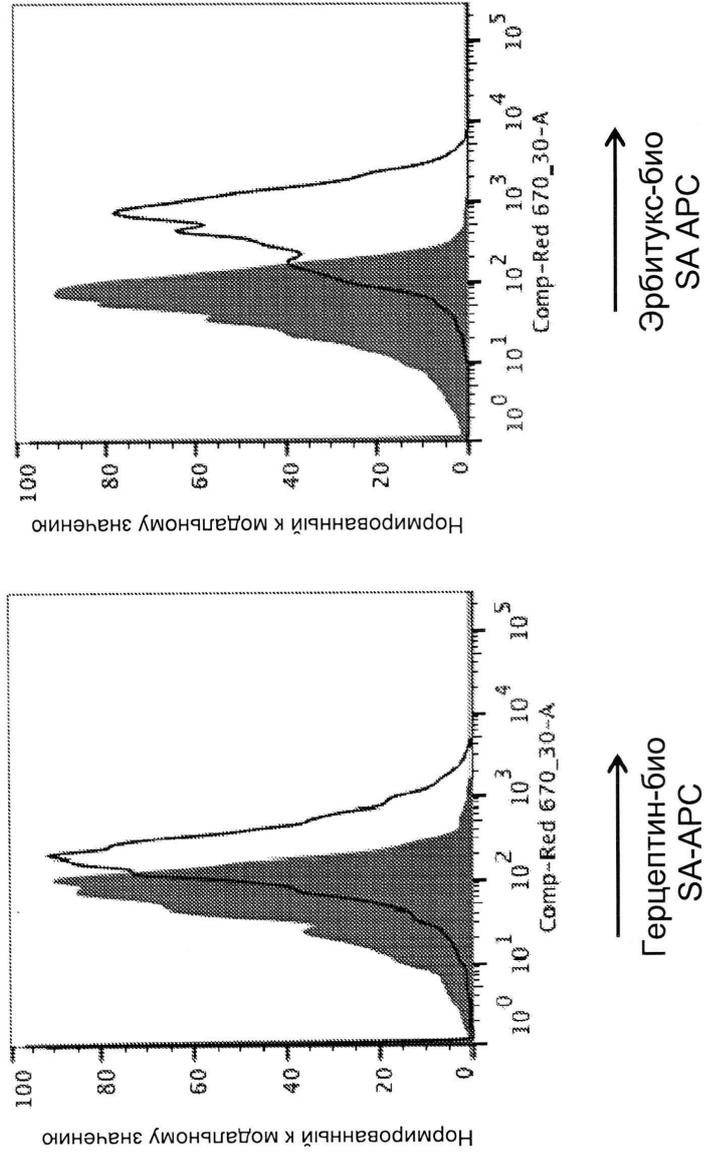


ФИГ. 5В

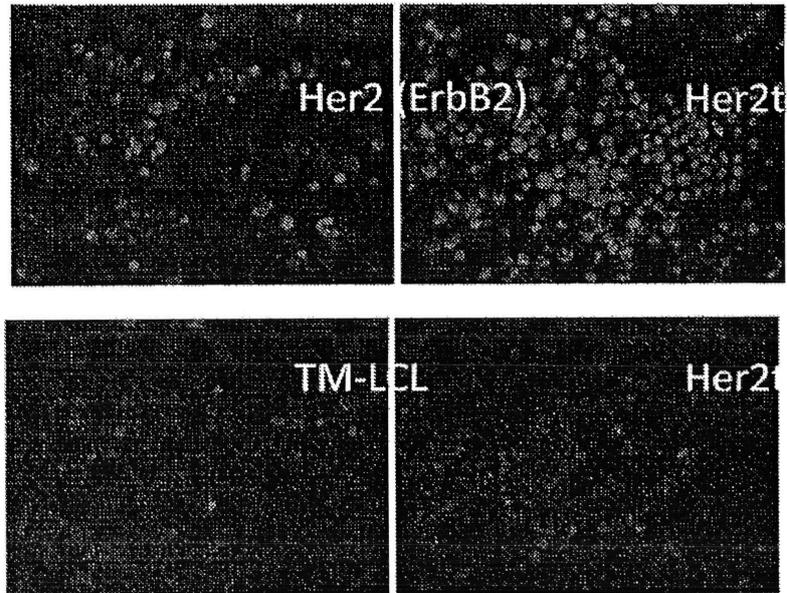


17/25

ФИГ. 5С



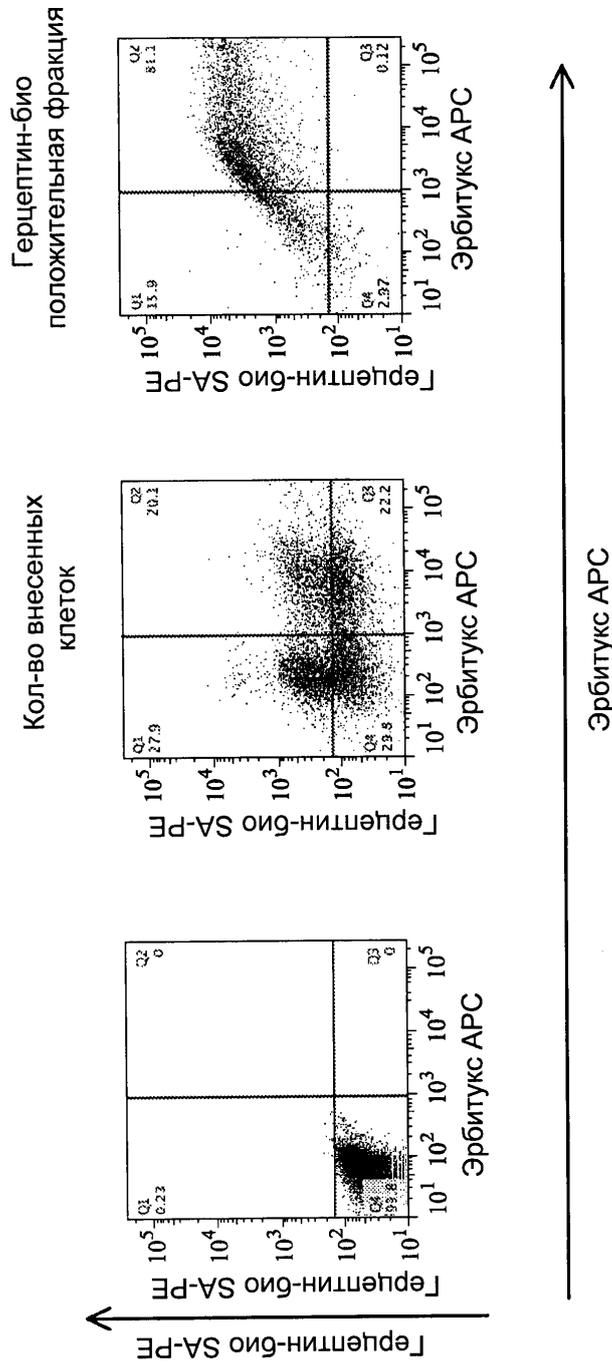
ФИГ. 5D



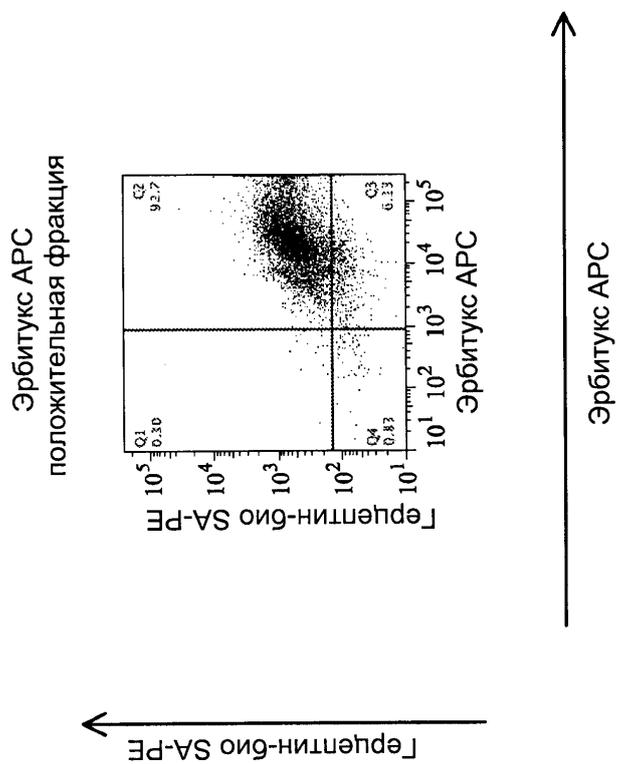
Герцептин-био SA-AF647

Hoechst

ФИГ. 6

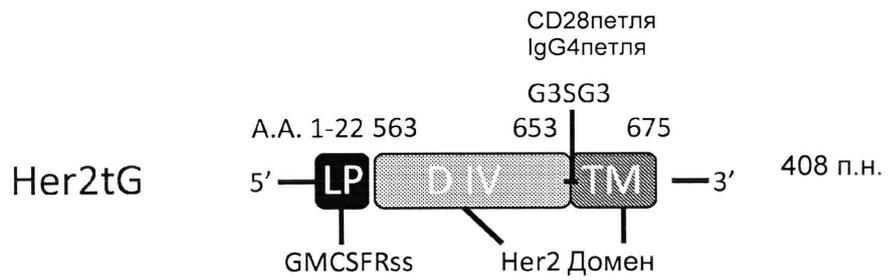
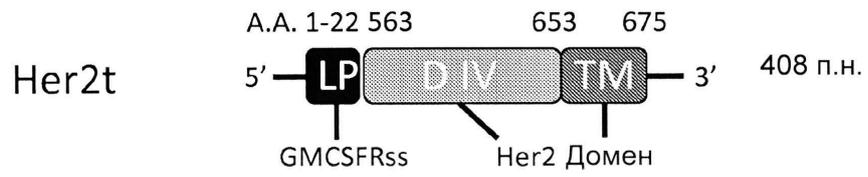


ФИГ. 6 (Продолж.)



21/25

ФИГ. 7



ФИГ. 8

