



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 38/465 (2020.02); A61K 48/00 (2020.02); C12N 15/52 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2017134741, 10.03.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.03.2016Дата регистрации:
06.11.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
11.03.2015 US 62/131,827

(43) Дата публикации заявки: 04.04.2019 Бюл. № 10

(45) Опубликовано: 06.11.2020 Бюл. № 31

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 04.10.2017(86) Заявка РСТ:
US 2016/021693 (10.03.2016)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/145146 (15.09.2016)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

КУПЕР, Лоуренс, Дж. (US),
БЕЛОУСОВА, Наталья (US)

(73) Патентообладатель(и):

БОРД ОФ РИДЖЕНТС, ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕХАС СИСТЕМ
(US)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2010/008564 A2, 21.01.2010. WO
03/089618 A2, 30.10.2003. RU 2218406, 10.12.2003.

(54) ПОЛИПЕПТИДЫ ТРАНСПОАЗЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и медицине и представляет собой полипептиды и полинуклеотиды транспозазы, которые обладают высокой активностью в клетках млекопитающих.

Изобретение относится также к способу обеспечения ответа Т-клеток с использованием заявляемой транспозазы. 6 н. и 40 з.п. ф-лы, 2 ил., 1 пр.

RU 2 735 700 C 2

RU 2 735 700 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 38/465 (2020.02); A61K 48/00 (2020.02); C12N 15/52 (2020.02)(21)(22) Application: **2017134741, 10.03.2016**(24) Effective date for property rights:
10.03.2016Registration date:
06.11.2020

Priority:

(30) Convention priority:
11.03.2015 US 62/131,827(43) Application published: **04.04.2019** Bull. № 10(45) Date of publication: **06.11.2020** Bull. № 31(85) Commencement of national phase: **04.10.2017**(86) PCT application:
US 2016/021693 (10.03.2016)(87) PCT publication:
WO 2016/145146 (15.09.2016)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"**

(72) Inventor(s):

**BELOUSOVA, Natalya (US),
COOPER, Laurence, J. (US)**

(73) Proprietor(s):

**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY
OF TEXAS SYSTEM (US)**(54) **TRANSPOSASE POLYPEPTIDES AND USE THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology; medicine.

SUBSTANCE: invention represents polypeptides and transposase polynucleotides which have high activity in mammalian cells. Invention also relates to a method of providing a T-cell response using the

disclosed transposase.

EFFECT: disclosed are transposase polypeptides and use thereof.

46 cl, 2 dwg, 1 ex

RU 2 735 700 C2

RU 2 735 700 C2

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США 62/131,827 от 11 марта 2016 года, содержание которой включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Включение перечня последовательностей

5 [0002] Перечень последовательностей содержится в файле под названием "UTFCP1256WO_ST25.txt", размером 18 кб (измерено в MS-Windows®) и созданном 3 марта 2016 года, подается в данном документе в электронной форме и включен в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

10 1. Область техники

[0003] Предложенное изобретение относится к областям медицины, клеточной биологии и молекулярной биологии. В определенных аспектах область изобретения к полипептидам транспозазы и к их использованию в генной инженерии. The present invention relates generally to the fields of medicine, immunology, cell biology, and molecular biology. In certain aspects, the field of the invention concerns transposase polypeptides and the used thereof in genetic engineering.

2. Уровень техники

[0004] В эпоху функциональной геномики существует потребность в эффективных средствах изменения кодирующих последовательностей в геноме клеток. Такая генная инженерия может быть использована для получения клеток, в которых стабильно экспрессируются трансгены, и для перепрограммирования клеток. Одним из подходящих инструментов в генной инженерии являются системы транспозонов/транспозаз. Транспозоны или транспонируемые элементы включают (короткую) последовательность нуклеиновой кислоты с концевыми повторами с обоих концов и кодируют ферменты, которые облегчают вырезание и встраивание нуклеиновой кислоты в целевые последовательности ДНК. Несколько систем транспозонов/транспозаз были адаптированы для генетического встраивания гетерологичных последовательностей ДНК, включающих Sleeping Beauty (SB), Tc1 /mariner-подобный элемент, полученный из рыбы, который проявляет транспозиционную активность в различных клеточных линиях позвоночных, эмбриональных стволовых клетках и in vivo (Ivics et al., 1997). Однако ни одна из этих систем не была адаптирована для генной инженерии клеток человека/млекопитающих. Соответственно, есть необходимость в системах транспозонов/транспозаз с высоким уровнем активности в клетках млекопитающих.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

35 [0005] В первом варианте реализации предлагается рекомбинантный полипептид, содержащий или имеющий повышенную активность транспозазы в клетках млекопитающих. В некоторых аспектах реализации полипептид содержит или имеет последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1 (hSB110) или SEQ ID NO: 3 (hSB81). В некоторых аспектах полипептид содержит или имеет последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 либо последовательность по меньшей мере на 90% идентичную полной длине SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 и проявляет транспозазную активность в клетках млекопитающих. В других аспектах полипептид содержит или имеет последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, проявляет транспозазную активность в клетках млекопитающих и имеет один или несколько из следующих признаков: Арг в положении, соответствующем позиции 136 (в hSB110), Гис в положении, соответствующем положению 253 (в hSB110), Арг в положении, соответствующем положению 255 (в hSB110) и/или Тре в положении, соответствующем положению 314

(в hSB110). В других аспектах ранее указанный полипептид, по меньшей мере 90% идентичный указанным последовательностям, не содержит последовательность природного транспозазного фермента или не содержит последовательности SEQ ID NO: 5 (SB11), SEQ ID NO: 6 (SB10) или SEQ ID NO: 7 (SB100x). В некоторых аспектах реализации полипептид содержит или имеет последовательность, по меньшей мере, на 91%, на 92%, на 93%, на 94%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO: 1 (HSB110) или SEQ ID NO: 3 (hSB81). В некоторых аспектах реализации полипептид содержит или имеет последовательность, по меньшей мере, на 91%, на 92%, на 93%, на 94%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO: 1 (HSB110) или SEQ ID NO: 3 (hSB81) и проявляет транспозазную активность в клетках млекопитающих. В некоторых аспектах реализации полипептид содержит или имеет последовательность, по меньшей мере, на 91%, на 92%, на 93%, на 94%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO: 1 (HSB110) или SEQ ID NO: 3 (hSB81) и проявляет транспозазную активность в клетках млекопитающих и имеет один или несколько из следующих признаков: Арг в положении, соответствующем позиции 136 (в hSB110), Гис в положении, соответствующем положению 253 (в hSB110), Арг в положении, соответствующем положению 255 (в hSB110) и/или Тре в положении, соответствующем положению 314 (в hSB110). В некоторых аспектах указанный полипептид, который по меньшей мере на 91%, на 92%, на 93%, на 94%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичный приведенным последовательностям, не содержит последовательность природного транспозазного фермента и не содержит последовательности SEQ ID NO: 5 (SB11), SEQ ID NO: 6 (SB10) или SEQ ID NO: 7 (SB100x). В еще нескольких аспектах реализации изобретения полипептид транспозазы дополнительно содержит или имеет гетерологичную полипептидную последовательность, слитую с N- или C-концом последовательности транспозаз. Например, гетерологичная полипептидная последовательность может содержать или иметь репортер, метку для очистки или полипептида, позволяющий проникнуть в клетку (СРР). В других аспектах реализации изобретения клетка млекопитающих, в которой полипептиды проявляют транспозазную активность, представляет собой клетку человека. В других аспектах клетки человека представляют собой иммунные клетки. В других аспектах иммунные клетки человека являются Т-клетками. В следующих аспектах Т-клетки представляют собой хелперные Т-клетки (клетки Т_H), цитотоксические Т-клетки (Т_C-клетки или СТL), Т-клетки памяти (Т_{СМ} клетки), эффекторные Т-клетки (Т_{ЕМ} клетки), регуляторные Т-клетки (клетки Трега, а также известные как супрессорные Т-клетки), лимфоцитарные Т-клетки (NKT-клетки), связанные с слизистой оболочкой Т-клетки, альфа-бета Т-клетки (Т_{αβ}-клетки) и/или гамма-дельта Т-клетки (клетки Т_{γδ}).

[0006] В дополнительных аспектах реализации полипептид содержит или имеет последовательность, по меньшей мере, на 90%, на 91%, на 92%, на 93%, на 94%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO: 1 (HSB110) или SEQ ID NO: 3 (hSB81) и имеет один или несколько из следующих признаков: Арг в положении, соответствующем позиции 136 (в hSB110), Гис в положении, соответствующем положению 253 (в hSB110), Арг в положении, соответствующем положению 255 (в hSB110) и/или Тре в положении, соответствующем положению 314 (в hSB110) и дополнительно имеет один или несколько из следующих признаков: Арг в положении, соответствующем положению 14 (в hSB110), Ала в положении, соответствующем положению 33 (в hSB110), Гис в положении, соответствующем положению 115 (в hSB110), Асп в положении, соответствующем положению 214 (в hSB110), Ала в положении,

соответствующем положении 215 (в hSB110), Вал в положении, соответствующем положению 216 (в hSB110), Глу в положении, соответствующем положению 217 (в hSB110), и/или Гис в положении, соответствующем позиции 243 (в hSB110). В некоторых аспектах указанный полипептид, который по меньшей мере на 90%, на 91%, на 92%, на 93%, на 94%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичный приведенным последовательностям, не содержит последовательность природного транспорзасного фермента и не содержит последовательности SEQ ID NO: 5 (SB11), SEQ ID NO: 6 (SB10) или SEQ ID NO: 7 (SB100x). В некоторых аспектах реализации изобретения полипептид включает 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 признаков последовательности, выбранных из группы, состоящей из: Арг в положении, соответствующем положению 14 (в hSB110), Ала в положении, соответствующем положению 33 (в hSB110), Гис в положении, соответствующем положению 115 (в hSB110), Асп в положении, соответствующем положению 214 (в hSB110), Ала в положении, соответствующем положению 215 (в hSB110), Вал в положении, соответствующем положению 216 (в hSB110), Глу в положении, соответствующем положению 217 (в hSB110), и Гис в положении, соответствующем положению 243 (в hSB110). В других аспектах указанный полипептид, который по меньшей мере на 90%, на 91%, на 92%, на 93%, на 94%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичный приведенным последовательностям, содержит последовательность DAVQ в положении, соответствующем положению 214-217 (в hSB110).

[0007] В некоторых аспектах реализации полипептид содержит или имеет последовательность, по меньшей мере, на 90%, на 91%, на 92%, на 93%, на 94%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO: 1 (hSB110), содержит Асн в положении, соответствующем положению 314 (в hSB110), и имеет один или несколько из следующих признаков: Арг в положении, соответствующем положению 136 (в hSB110), Гис в положении, соответствующем положению 253 (в hSB110) и/или Арг в положении, соответствующем позиции 255 (в hSB110). В некоторых аспектах указанный полипептид, который по меньшей мере на 90%, на 91%, на 92%, на 93%, на 94%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичный приведенным последовательностям, не содержит последовательность природного транспорзасного фермента и не содержит последовательности SEQ ID NO: 5 (SB11), SEQ ID NO: 6 (SB10) или SEQ ID NO: 7 (SB100x). В конкретных аспектах полипептид включает или имеет последовательность SEQ ID NO: 1.

[0008] В некоторых аспектах реализации полипептид содержит или имеет последовательность, по меньшей мере, на 90%, на 91%, на 92%, на 93%, на 94%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO: 3 (hSB81), содержит Тре в положении, соответствующем положению 314 (в hSB110), и имеет один или несколько из следующих признаков: Арг в положении, соответствующем положению 136 (в hSB110), Гис в положении, соответствующем положению 253 (в hSB110) и/или Арг в положении, соответствующем позиции 255 (в hSB110). В некоторых аспектах указанный полипептид, который по меньшей мере на 90%, на 91%, на 92%, на 93%, на 94%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичный приведенным последовательностям, не содержит последовательность природного транспорзасного фермента и не содержит последовательности SEQ ID NO: 5 (SB11), SEQ ID NO: 6 (SB10) или SEQ ID NO: 7 (SB100x). В конкретных аспектах полипептид включает или имеет последовательность SEQ ID NO: 3.

[0009] В следующем варианте реализации предлагается полинуклеотидная молекула, содержащая или имеющая последовательности, кодирующие полипептид в соответствии

с вариантами реализации. В некоторых аспектах молекулой может быть ДНК вектор экспрессии. Например, вектор экспрессии ДНК может содержать кодирующую транспозазу последовательность, функционально связанную с промотором для экспрессии полипептида *in vitro* (например, промотора T7 или SP6) или промотор для экспрессии полипептида в клетках млекопитающих. В некоторых аспектах молекула полинуклеотида может представлять собой РНК или мРНК. В дополнительных аспектах РНК может содержать 5'-кэп, 5' UTR мотив IRES (гетерологичный), 3' UTR (гетерологичный) и/или поли(А) последовательность. РНК может дополнительно содержать поли(А) последовательность от 20 до 300 нуклеотидов в некоторых аспектах.

[0010] В еще одном варианте реализации настоящее изобретение относится к способу получения полипептида транспозазы, как описано выше, включающему трансфекцию клетки полинуклеотидом, кодирующим полипептид транспозазы, и экспрессию полипептида на матрице полинуклеотида. В еще одном варианте реализации изобретение подразумевает наличие клетки-хозяина, содержащую полипептид или полинуклеотидную молекулу. В некоторых случаях клетка представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетка человека. В некоторых аспектах клетка представляет собой стволовую клетку или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPS). В других аспектах клетка является естественной киллерной (NK) клеткой, предшественником NK-клетки, Т-клеткой, предшественником Т-клетки или иммунной клеткой. В некоторых случаях клетка может содержать РНК, кодирующую полипептид транспозазы. В еще одном варианте реализации предложена популяция клеток, содержащих полипептид или полинуклеотидную молекулу.

[0011] В другом варианте реализации предложен способ генной инженерии клетки, включающий: трансфекцию клетки полипептидом транспозазы, как описано выше, или нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид транспозазы, и вектор ДНК, содержащий последовательность, кодирующую выбранный генетический элемент, фланкированный транспозоновыми повторами, затем инкубируют клетку в условиях, подходящих для (временной или стабильной) активности транспозазы, тем самым интегрируя выбранный генетический элемент в геном клетки. В некоторых аспектах вариантов реализации вектор ДНК, кодирующий выбранный генетический элемент, фланкированный повторами транспозонов, дополнительно содержит последовательность, кодирующую полипептид транспозазы. Таким образом, в некоторых аспектах реализации способ включает трансфекцию клетки вектором ДНК, содержащей последовательность, кодирующую выбранный генетический элемент, фланкированный повторами транспозонов, и последовательность, кодирующую транспозазу, которая находится под контролем промоторной последовательности, затем инкубируют клетку в условиях, подходящих для экспрессии и активности транспозазы, тем самым интегрируя выбранный генетический элемент в геном клетки. В некоторых аспектах способ включает в себя третий этап выделения или культивирования трансфецированной ячейки. В некоторых аспектах выбранный генетический элемент является скринируемым или селектируемым маркером. В других аспектах выбранный генетический элемент может кодировать антитело, ингибирующую нуклеиновую кислоту (например, небольшую интерферирующую РНК (siRNA)), терапевтический полипептид, рецептор Т-клеток (TCR), рецептор химерного антигена (CAR), или энхансер функции иммунной клетки. В конкретных аспектах выбранный генетический элемент кодирует CAR или TCR. В других аспектах выбранный генетический элемент может представлять собой ген или его часть, которая используется для замены или модификации соответствующего гена клетки (например, для изменения

последовательности или экспрессии гена или гена нок-аута экспрессии). В некоторых аспектах трансфицированная клетка представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетка человека. В некоторых случаях клетка может быть стволовой клеткой или iPS-клеткой. В определенных аспектах клетка может представлять собой клетку иммунной системы или ее предшественник, такую как НК-клетка, Т-клетка, предшественник НК-клетки или предшественник Т-клетки.

[0012] В некоторых аспектах трансфицирующие клетки могут включать использование химического реагента для трансфекции, электропорации клеток или других технологий, обеспечивающих доставку нуклеиновой кислоты и/или белка в цитоплазму и ядро клеток. Например, клетки могут быть трансфицированы с использованием солей (например, CaPO_4), липидов (например, заряженных или неполярных липидов), катионных полимеров, ПЭГ-комплексов и/или белковых комплексов (например, катионных полипептидов). В некоторых аспектах трансфекция может включать использование липосом, таких как фосфолипидные липосомы (например, липосомы, которые включают глицерофосфолипиды или сфинголипиды). В других аспектах клетки могут быть трансдуцированы с помощью вирусного вектора (например, аденовирусного, аденоассоциированного вирусного, ретровирусного (например, лентивируса) вектора или вектора вируса оспы). В некоторых аспектах реализации изобретения вирусный вектор представляет собой неинтегрируемый вирусный вектор. Специалист в данной области техники поймет, что в некоторых аспектах реализации изобретения транспозаза может быть доставлена в клетки вместе с или отдельно от повторяющихся последовательностей, кодирующих нуклеиновую кислоту. Например, в некоторых аспектах транспозаза может быть доставлена в клетки в виде рекомбинантного полипептида с использованием реагента для трансфекции белков, а молекула нуклеиновой кислоты, содержащая повторы транспозонов, может быть доставлена с использованием системы трансфекции нуклеиновых кислот или вирусных векторов. В дополнительных аспектах РНК, кодирующая транспозазу, котрансфицирует с ДНК, содержащую повторы транспозонов и выбранный генетический элемент.

[0013] В дальнейших аспектах реализации изобретения способ дополнительно включает трансфекцию популяции клеток полипептидом транспозазы или нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид транспозазы, и ДНК-вектором, содержащим последовательность, кодирующую выбранный генетический элемент, фланкированный повторами транспозонов, а затем инкубирование популяции в условиях, подходящих для активности транспозазы, тем самым интегрируя выбранный генетический элемент в геноме клеток. В конкретных аспектах способ включает трансфекцию популяции Т-клеток или предшественников Т-клеток полипептидом транспозазы или нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид транспозазы, и ДНК-вектором, содержащим последовательность, кодирующую CAR, фланкированную повторами транспозонов, и инкубирование в условиях, подходящих для активности транспозазы, тем самым интегрируя CAR в геноме клеток и создавая популяцию Т-клеток или предшественников Т-клеток, экспрессирующих заданный элемент. В дальнейших аспектах реализации изобретения способ включает трансфекцию популяции Т-клеток или предшественников Т-клеток с вектором ДНК, содержащим последовательность, кодирующую CAR, фланкированную транспозоновыми повторами, и последовательность, кодирующую транспозазу (функционально связанную с промотором) и инкубации популяции в условиях, подходящих для активности транспозазы, тем самым интегрируя CAR в геноме клеток и создавая популяцию инженерированных Т-клеток или предшественников Т-клеток. В некоторых аспектах культивирование трансфицированных клеток в среде,

которая избирательно усиливает пролиферацию Т-клеток, экспрессирующих CAR, может быть дополнительно выполнено.

[0014] В еще одном варианте реализации изобретения предлагается способ обеспечения ответа Т-клеток у больного человека, включающий сначала получение популяции инженерированных Т-клеток или предшественников Т-клеток, при этом необязательно культивирование клеток в среде, которая избирательно усиливает пролиферацию CAR-экспрессирующих Т-клеток и затем введение эффективного количества Т-клеток больному, экспрессирующих CAR, для того, чтобы обеспечить ответ Т-клеток.

[0015] Таким образом, в некоторых аспектах реализации изобретения способ включает в себя: (a) получение образца клеток от больного, причем образец содержит Т-клетки или предшественники Т-клеток; (b) трансфекцию клеток ДНК, кодирующей рецептор химерного антигенного транспозона (CAR), фланкированного транспозоном, и транспозазу, эффективным для интеграции ДНК, кодирующей CAR, в геном клеток, чтобы обеспечить популяцию трансгенных клеток экспрессирующих CAR; (c) необязательно, культивирование популяции трансгенных CAR-клеток *ex vivo* в среде, которая избирательно усиливает пролиферацию CAR-экспрессирующих Т-клеток; и (d) введение эффективного количества трансгенных клеток экспрессирующих CAR больному для обеспечения ответа Т-клеток. Таким образом, в некоторых аспектах трансгенные клетки экспрессирующие CAR культивируют *ex vivo* менее чем 21 день, например, менее чем 20 дней, менее чем 19 дней, менее чем 18 дней, менее чем 17 дней, менее чем 16 дней, менее чем 15 дней, менее чем 14 дней, менее чем 13 дней, менее чем 12 дней, менее чем 11 дней, менее чем 10 дней, менее чем 9 дней, менее чем 8 дней, менее чем 7 дней, менее чем 6 дней, менее чем 5 дней, менее чем 4 дня, менее чем 3 дня, менее чем 2 дня или меньше. В некоторых аспектах клетки CAR культивируют *ex vivo* не более 3-5 дней. В еще одном аспекте стадии (a) - (d) мгновенного метода (т.е. получение образцов клеток для введения CAR Т-клеток) завершаются за не более чем 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 дней. В дополнительных аспектах образец клеток от больного может быть менее чем 200 мл периферической крови или пуповинной крови. В некоторых аспектах образец может быть собран путем афереза. В некоторых аспектах образец собирают с помощью метода, который не включает аферез (например, венопунктурой). В еще одном аспекте образец клеток имеет начальный объем менее 175 мл, менее около 175 мл, менее 150 мл, менее около 150 мл, менее 125 мл, менее около 125 мл, менее 100 мл, менее около 100 мл, менее 75 мл, менее около 75 мл, менее 50 мл, менее около 50 мл, менее 25 мл или менее около 25 мл (например, образец клеток имеет начальный объем от около 50 до около 200 мл, от около 50 до около 100 мл или от около 100 до около 200 мл, когда он получен от больного).

[0016] В некоторых аспектах реализации изобретения способы касаются трансфекции клеток ДНК, кодирующей рецептор химерного антигена (CAR) и транспозазу. Способы трансфекции клеток хорошо известны в данной области, но в некоторых аспектах используются высокоэффективные методы трансфекции, такие как электропорация. Например, нуклеиновые кислоты могут быть введены в клетки с использованием устройства для нуклеофилизации. В некоторых вариантах реализации этап трансфекции не включает в себя инфицирование или трансдукцию клеток вирусом, который может вызвать генотоксичность и/или привести к иммунному ответу направленному на клетки, содержащие вирусные последовательности у больного, короткого латент.

[0017] Другие аспекты реализации изобретения касаются трансфекции клеток вектором экспрессии, кодирующим CAR. Широкий диапазон конструкций CAR и векторов экспрессии для них известен в данной области техники. Например, в некоторых аспектах

реализации изобретения вектор экспрессии CAR представляет собой вектор экспрессии ДНК, такой как плазида, вектор линейной экспрессии либо эписому. В некоторых аспектах реализации изобретения вектор содержит дополнительные последовательности, такие как последовательность, которая облегчает экспрессию CAR, такие как промотор, энхансер, поли-А сигнал и/или один или несколько интронов. В некоторых аспектах реализации изобретения кодирующая последовательность CAR фланкирована последовательностями транспозонов, так что присутствие транспозазы позволяет кодирующей последовательности интегрироваться в геном трансфицированной клетки.

[0018] Как подробно описано выше, в некоторых аспектах клетки дополнительно трансфицируются транспозазой, которые облегчают интеграцию кодирующей последовательности CAR в геном трансфицированных клеток. В некоторых аспектах транспозаза предложена в виде вектора экспрессии ДНК. В некоторых аспектах транспозаза предложена в виде экспрессируемой РНК или белка, таким образом долгосрочная экспрессия транспозазы не происходит в трансгенных клетках. Например, в некоторых аспектах транспозаза предложена как кодируемая мРНК (например, мРНК, содержащая кэп и поли-А-хвост).

[0019] В еще одном аспекте реализации изобретения трансгенная CAR-клетка дополнительно содержит вектор экспрессии для экспрессии связанного с мембраной цитокина, который стимулирует пролиферацию и/или выживание Т-клеток. В частности, клетки CAR, содержащие такие цитокины, могут пролиферировать и/или продолжать существовать с небольшой культурой *ex vivo* или без нее с активирующими и размножающимися клетками (AaPCs) или искусственными антигенпредставляющими клетками (aAPC) из-за имитации, обеспечиваемой экспрессией цитокинов. Подобным образом, такие клетки CAR могут пролиферировать *in vivo*, даже когда большое количество антигена, распознаваемого CAR, отсутствует (например, как у пациентов с раком при ремиссии или пациентов с минимальными остаточными заболеваниями). В некоторых аспектах клетки CAR содержат вектор экспрессии ДНК или РНК для экспрессии ζ цитокина и его элементов (например, трансмембранного домена) для обеспечения мембранной экспрессии цитокина. Например, клетки CAR могут содержать мембранные IL-7, IL-15 или IL-21. В некоторых аспектах цитокин связан с мембраной путем слияния кодирующей последовательности цитокинов с рецептором для цитокина. Например, клетка может содержать вектор для экспрессии гибридного белка IL-15-IL-15R α . В еще одном аспекте вектор, кодирующий мембранный ζ -цитокин, представляет собой вектор экспрессии ДНК, такой как вектор, интегрированный в геном клеток CAR, или внехромосомный вектор (например, эписомальный вектор). В еще одном аспекте экспрессия связанного с мембраной ζ -цитокина находится под контролем индуцибельного промотора (например, индуцируемого лекарством промотора), так что экспрессию цитокина в клетках CAR (и, следовательно, пролиферацию клеток CAR) можно контролировать, индуцируя или подавляя активность промотора.

[0020] Аспекты реализации изобретения касаются получения образца от пациента, содержащего НК-клетки, НКТ-клетки, Т-клетки или клетки-предшественники Т-клеток. Например, в некоторых случаях образец представляет собой пуповинную кровь, периферическую кровь (например, фракцию мононуклеарных клеток) или кровь пациента, содержащую плюрипотентные стволовые клетки. В некоторых аспектах образец от пациента может быть культивирован для генерации индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS) и этих клеток, используемых для получения НК-клеток, НКТ-клеток или Т-клеток. Образцы клеток могут быть помещены в культуру непосредственно после отбора у пациента или могут быть заморожены перед

использованием. В некоторых аспектах получение образцов клеток включает сбор образцов клеток. В других аспектах образец получен третьей стороной. В еще одном аспекте образец от пациента может быть обработан для очистки или концентрирования Т-клеток или предшественников Т-клеток в образце. Например, образец может быть подвергнут градиентной очистке, селектированию клеточной культуры и/или сортировке клеток (например, посредством проточной цитометрии (FACS)).

[0021] В некоторых аспектах реализации изобретения способ дополнительно включает использование антигенпредставляющих клеток (например, для роста трансгенных клеток). Например, клетки, представляющие антиген, могут представлять собой дендритные клетки, активирующие и размножающиеся клетки (AaPC) или инактивированные (например, облученные) клетки, представляющие искусственный антиген (aAPCs). Способы получения таких антигенпредставляющих клеток известны в данной области и подробно описаны в данном документе. Таким образом, в некоторых аспектах трансгенные клетки CAR совместно культивируют с антигенпредставляющими клетками (например, инактивированными aAPC) *ex vivo* в течение ограниченного периода времени, чтобы развить популяцию CAR-клеток. Стадию кокультивирования клеток CAR можно проводить в среде, которая включает, например, интерлейкин-21 (IL-21) и/или интерлейкин-2 (IL-2). В некоторых аспектах кокультивирование выполняется при соотношении CAR-клеток к антиген-представляющим клеткам примерно от 10:1 до примерно 1:10; примерно от 3:1 до примерно 1:5; или примерно от 1:1 до примерно 1:3. Например, совместная культура клеток CAR и антигенпредставляющих клеток может находиться в соотношении примерно 1:1, примерно 1:2 или примерно 1:3.

[0022] В некоторых аспектах клетки CAR культуры, такие как AaPC или aAPC, сконструированы для экспрессии специфического полипептида для усиления роста CAR клеток. Например, клетки могут содержать (i) антиген против CAR (то есть выраженный на трансгенных клетках CAR); (ii) CD64; (ii) CD86; (iii) CD137L; и/или (v) мембранно-связанный IL-15, экспрессируемый на поверхности aAPC. В некоторых аспектах AaPC или aAPCs содержат CAR-связывающее антитело или его фрагмент, экспрессируемый на поверхности AaPC или aAPC. Предпочтительно, AaPC или aAPC для использования в мгновенных методах испытывают и проверяют на отсутствие инфекционного материала и/или испытывают и подтверждают, что он инактивирован и не пролиферируется.

[0023] Хотя рост AaPC или aAPC может увеличить количество или концентрацию клеток CAR в культуре, эта процедура является трудоемкой и дорогостоящей. Более того, в некоторых аспектах пациенту, нуждающемуся в терапии, следует повторно вводить трансгенные клетки CAR как можно скорее. Таким образом, в некоторых аспектах *ex vivo* культивирование трансгенных клеток CAR составляет не более 14 дней, не более 7 дней или не более 3 дней. Например, культура *ex vivo* (например, культура в присутствии AaPC или aAPC) может быть выполнена для менее чем одного удвоения трансгенных клеток CAR. В других аспектах трансгенные клетки не культивируют *ex vivo* в присутствии AaPC или aAPC.

[0024] В еще одном аспекте реализации изобретения способ включает этап обогащения популяции клеток для пролиферации CAR-экспрессирующих Т-клеток после трансфекции клеток или после *ex-vivo* роста клеток. Например, стадия обогащения может включать сортировку клеток (например, с помощью FACS), либо например, с использованием антигена, связанного CAR или CAR-связывающего антитела. В еще нескольких аспектах стадия обогащения включает обеднение не-Т-клеток или истощение клеток, которые

не экспрессируют CAR. Например, клетки CD56+могут быть истощены в популяции культуры. В еще одном аспекте образец клеток CAR сохраняется (или поддерживается в культуре), когда клетки вводятся пациенту. Например, образец может быть заморожен для последующего этапа роста культуры или анализа.

5 [0025] В некоторых аспектах трансгенные клетки CAR инактивируются для экспрессии эндогенного рецептора Т-клеток и/или эндогенного HLA. Например, Т-клетки могут быть сконструированы для устранения экспрессии эндогенного альфа/бета-Т-клеточного рецептора (TCR). В конкретных вариантах реализации CAR+Т-клетки генетически
10 модифицированы для устранения экспрессии TCR. В некоторых аспектах происходит разрушение рецептора α/β Т-клеток в CAR-экспрессирующих Т-клетках благодаря нуклеазам с цинковыми пальцами (ZFNs). В некоторых аспектах $\alpha\beta$ -цепь рецептора Т-клеток в Т-клетках, экспрессирующих CAR, нокаутируется, например, с использованием нуклеаз с цинковыми пальцами.

[0026] Как подробно описано в данном документе, CAR-клетки могут быть
15 использованы для лечения широкого спектра заболеваний и синдромов. По существу любое заболевание, которое включает специфическую или усиленную экспрессию конкретного антигена, можно лечить путем таргетирования клеток CAR на антиген. Например, аутоиммунные заболевания, инфекции и раковые заболевания можно лечить способами и/или их композициями, описанными в данном документе. К ним относятся
20 раковые заболевания, такие как первичные, метастатические, рецидивирующие, чувствительные к терапии, рефрактерные раковые заболевания (например, химио-рефрактерный рак). Указанные типы рака могут быть таких видов: крови, легких, головного мозга, толстой кишки, предстательной железы, молочной железы, печени, почек, желудка, шейки матки, яичника, яичек, гипофиза, пищевода, селезенки, кожи,
25 кости и т. д. (например, лимфомы В-клеток или меланомы). В случае лечения рака клетки CAR обычно нацелены на антиген раковых клеток (также известный как ассоциированный с опухолью антиген (ТАО)).

[0027] В других аспектах реализации изобретения трансгенные клетки CAR могут быть использованы для лечения пациента, имеющего минимальное остаточное
30 заболевание (например, пациента, имеющего очень низкие количества присутствующего CAR-антигена), таких как раковые больные, которые находятся в стадии ремиссии. Используя новые высокочувствительные методы диагностики, связанные с раком антигены (или раковые клетки) могут быть обнаружены у пациентов, которые не проявляют явных симптомов рака. Такие пациенты могут быть вылечены с помощью
35 мгновенных методов для устранения остаточного заболевания с использованием антигенных клеток CAR. В некоторых вариантах реализации трансгенные клетки CAR, таргетируемые на остаточное заболевание, дополнительно включают экспрессию связанного с мембраной пролиферативного цитокина, так как эти клетки сохраняют способность роста *in vivo*, несмотря на низкое количество целевого антигена.

40 [0028] Процессы реализации изобретения могут быть использованы для изготовления (например, для клинических испытаний) CAR⁺ Т-клеток со способностью специфически связывать различные опухолевые антигены (например, CD19, ROR1, CD56, EGFR, CD33, CD123, c-met, GD2). CAR⁺ Т-клетки, полученные с использованием этой технологии,
45 могут использоваться для лечения пациентов с лейкемией (например, AML, ALL, CML), инфекций и/или твердых опухолей. Например, способы реализации изобретения могут быть использованы для лечения клеточных пролиферативных заболеваний, грибковых, вирусных, бактериальных или паразитарных инфекций. Патогены, которые могут быть таргетированы, включают, но не ограничены ими, Plasmodium, трипаному, Aspergillus,

Candida, HSV, RSV, EBV, CMV, JC-вирус, вирус ВК или патогены Ebola. Другие примеры антигенов, которые могут быть таргетированы клетками CAR в вариантах осуществления, включают, но не ограничиваются ими, CD19, CD20, карциноэмбриональный антиген, альфафтопротеин, CA-125, 5T4, MUC-1, эпителиальный опухолевый антиген, ассоциированный с меланомой антиген, мутированный p53, мутантный ras, HER2/Neu, ERBB2, белок связывания фолата, гликопротеин оболочки HIV-1 gp120, гликопротеин оболочки HIV-1 gp41, GD2, CD123, CD23, CD30, CD56, c-Met, meothelin, GD3, HERV-K, IL-11Ralpha, цепь каппа, цепь лямбда, CSPG4, ERBB2, EGFRvIII или VEGFR2. В некоторых аспектах реализации изобретения способ относится к таргетированию на CD19 или HERV-K-экспрессирующие клетки. Например, CAR-клетка таргетированная на HERV-K, может содержать CAR, включающую scFv-последовательность моноклонального антитела 6H5. В еще одном аспекте реализации изобретения CAR может быть конъюгирован или слит с цитокином, таким как IL-2, IL-7, IL-15, IL-21 или их комбинациями.

[0029] В некоторых вариантах реализации предлагаются способы лечения индивидуума с медицинским состоянием, включающим стадию обеспечения эффективного количества клеток из популяции клеток, описанных здесь, в том числе более чем один раз в некоторых аспектах, таких как, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и более дней друг от друга. В конкретных аспектах рак - это рак мочевого пузыря, крови, кости, костного мозга, мозга, молочной железы, толстой кишки, пищевода, желудочно-кишечного тракта, десен, головы, почек, печени, легких, носоглотки, шеи, яичника, предстательной железы, кожи, желудка, яичка, языка или матки. В некоторых аспектах рак представляет собой лимфому, лейкемию, неходжкинскую лимфому, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз или связанные с В-клетками аутоиммунные заболевания.

[0030] В контексте данного документа термины в единственном числе могут означать один или более. Как используется в данном документе в описании и формуле изобретения, при использовании в сочетании со словом «содержащий» слова в единственном числе могут означать один или несколько. Как используется в данном документе, в описании и формуле изобретения «другое» или «дополнительное» может означать, по меньшей мере, два или более.

[0031] Как используется в данном документе в описании и формуле изобретения, термин «около» используется для обозначения того, что значение включает в себя присущее изменение ошибки для устройства, способа, используемый для определения значения, или вариацию, существующую среди предметов исследования.

[0032] Другие цели, признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего подробного описания. Следует, однако, понимать, что подробное описание и конкретные примеры с указанием некоторых вариантов реализации изобретения приведены только для иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации в рамках сущности и объема изобретения станут очевидными для тех из этого подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0033] Приведенные ниже чертежи являются частью настоящего описания и включены для дополнительной иллюстрации некоторых аспектов данного изобретения. Изобретение может быть лучше понято посредством ссылки на один или несколько из этих чертежей в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов реализации, представленных в данном документе.

[0034] На фиг. 1: Иллюстративная стратегия для проектирования клеток на основе

транспозаз. В этом примере создаются сконструированные Т-клетки, которые экспрессируют CAR. Т-клетки ко-трансфецируют конструкцией ДНК транспозонов, кодирующей CAR, фланкированную повторами транспозонов, вместе с мРНК, кодирующей транспозазу. В этом случае для трансфекции используется система

5 электропорации 4D-NUCLEOFECTOR™ (Lonza Group Ltd., Швейцария). После введения в клетки транспозаза временно экспрессируется и опосредует интеграцию конструкции CAR в геномную ДНК. мРНК, кодирующая транспозазу, деградирует внутри клеток, не гарантируя долговременной экспрессии транспозазы в клетках.

10 [0035] На фиг. 2: Гистограммы показывают данные проточной цитометрии Т-клеток человека, трансфецированных CAR, как показано на фиг. 1. Результаты сравнивали между двумя рекомбинантными транспозазами hSB110 и hSB81 и по сравнению с SB100x. Верхние панели показывают количество клеток, положительных по CAR (по оси Y), по сравнению с клетками, которые оказались нежизнеспособными, по оценке 7AAD (7-аминоактиномицин D) окрашивания (по оси x), через 8 дней после трансфекции. 15 Нижние панели показывают количество клеток, положительное по CAR (ось y) и которые экспрессируют CD3 (ось x), 15 дней после трансфекции. Результаты исследований показывают, что рекомбинантные транспозазы значительно эффективнее в трансгенных клетках, чем SB100x. Через 8 дней после трансфекции более 22% клеток, электропорированных hSB110 и hSB81, кодирующих мРНК, экспрессируют CAR по 20 сравнению с только 15% клеток, возникающих в результате использования SB100x. Аналогично, к 15-му дню более 80% популяции клеток, электропорированных hSB110 и hSB81, совместно экспрессировали CAR и CD3 по сравнению с только 73,4% клеток, полученных в результате трансфекции SB100x.

25 ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ РЕАЛИЗАЦИИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Генетическая инженерия

30 [0036] Генетическая инженерия клеток стала мощным методом обеспечения стабильной экспрессии желаемых генов в широком диапазоне клеток. В последнее время такая технология даже применяется к клеткам, используемым для терапевтического вмешательства в ряде заболеваний. Например, генетически инженеруемые Т-клетки, которые экспрессируют рецепторы, таргетированные на ассоциированный с болезнью антиген, в настоящее время находятся в клинических испытаниях в качестве противораковой терапии. Системы транспозазы являются 35 интересными системами для использования в лечении, особенно в случае клеток, используемых в качестве терапевтических средств, поскольку они не вводят гетерологичные генетические элементы, которые содержатся в клетках, что является общей чертой инженерных систем на основе вирусов. Однако требуется высокая эффективность, чтобы обеспечить достаточное количество трансгенных Т-клеток, которые необходимы для терапевтического вмешательства.

40 [0037] Исследования в данном документе демонстрируют новые рекомбинантные ферменты транспозазы, называемые hSB110 и hSB81, которые демонстрируют значительно улучшенную эффективность в разработке человеческих клеток. Например, при использовании для интеграции экспрессионных конструкций CAR в первичные человеческие Т-клетки новые транспозазы могли продуцировать популяции клеток, 45 где более 20% клеток проявляли экспрессию CAR через 8 дней после трансфекции (фиг.2). Более того, на 15-й день более 80% клеток в трансфецированной популяции были положительными по экспрессии CAR (фиг.2). Такая высокоэффективная генная инженерия человеческих клеток представляет собой значительное улучшение по

сравнению с предыдущими инженерными системами на основе транспозазы.

[0038] Транспозазовые кодирующие последовательности могут быть использованы для высокоэффективной генной инженерии клеток млекопитающих. Например, транспозазы могут быть использованы для быстрого получения популяций CAR-экспрессирующих Т-клеток. В одном варианте реализации мРНК, кодирующая транспозазу, ко-трансфектируется в Т-клетки (или предшественники Т-клеток) вместе с вектором ДНК, кодирующим желаемую последовательность CAR, фланкированную повторами транспозонов. Т-клетки, экспрессирующие CAR, затем могут быть очищены и/или селективно размножены. В случае Т-клеток, используемых для терапии, желательно, чтобы было как можно меньше роста, чтобы сократить время и стоимость подготовки клеток. Важно отметить, что предложенные в данном документе транспозазы значительно улучшают такую техническую процедуру, увеличивая долю клеток, которые проявляют устойчивую экспрессию CAR и, следовательно, доступны для дальнейшего размножения.

15 II. Полипептиды транспозазы и кодирующие последовательности

[0039] Как описано в предыдущей сводке, некоторые аспекты реализации изобретения касаются рекомбинантных полипептидов транспозазы и нуклеиновых кислот, кодирующих их. В некоторых аспектах реализации изобретения транспозазы представляют собой полипептид, содержащий или имеющий последовательности могут быть по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, или 100% идентичны относительно фрагментов последовательности SEQ ID NO: 1. или SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах варианты реализации транспозазы могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, делеций или вставок относительно последовательностей SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3. Например, полипептиды транспозазы могут быть дополнительно модифицированы одной или несколькими аминокислотными заменами при сохранении их ферментативной активности. В некоторых случаях аминокислота может быть заменена аминокислотой в соответствующем положении другой последовательности транспозазы. Например, последовательность дополнительных транспозаз представлена в патентах США № 6,489,458; 7148203; 8227432; в патенте США № 2011/0117072; Mates et al., 2009 и Ivics et al., 1997, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте.

[0040] В некоторых аспектах аминокислотные замены могут быть сделаны в одном или нескольких положениях, где замена представляет собой аминокислоту, имеющую сходную гидрофильность. Важность индекса гидропатической аминокислоты при предоставлении интерактивной биологической функции на белке обычно понимается в данной области (Kyte and Doolittle, 1982). Принято считать, что относительный гидропатический характер аминокислоты способствует вторичной структуре полученного белка, который, в свою очередь, определяет взаимодействие белка с другими молекулами, например с ферментами, субстратами, рецепторами, ДНК, антителами, антигеном, и тому подобными. Таким образом, такая консервативная замена может быть сделана в транспозазе и, вероятно, будет лишь незначительно влиять на ее активность. Как указано в патенте США 4554101, для аминокислотных остатков были присвоены следующие значения гидрофильности: аргинин (+3,0); лизин (+3,0); аспарат (+3,0 ± 1); глутамат (+3,0 ± 1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2);

глицин (0); треонин (-0,4); пролин (-0,5 ± 1); аланин (0,5); гистидин (-0,5); цистеин (-1,0); метионин (-1,3); валин (-1,5); лейцин (-1,8); изолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенилаланин (-2,5); триптофан (-3,4). Эти значения могут быть использованы в качестве руководства и, таким образом, для замещения аминокислот, значения гидрофильности которых находятся в пределах ± 2, те, которые находятся в пределах ± 1, а в пределах ± 0,5. Таким образом, любой из описанных здесь полипептидов транспозазы может быть модифицирован заменой аминокислоты на другую, но гомологичную аминокислоту с аналогичным значением гидрофильности. Аминокислоты с гидрофильностью в пределах +/- 1,0 или +/- 0,5 считаются гомологичными.

[0041] В других аспектах реализации изобретения полипептид транспозазы слит с гетерологичной полипептидной последовательностью, такой как тег очистки (например, тег T7, поли-His или GST), репортер или CPP. Например, полипептид может быть слит (или конъюгирован) с репортером, таким как агент для визуализации. Понятно, что в некоторых случаях гибридный белок может содержать дополнительные аминокислоты, расположенные между транспозазой и гетерологичным полипептидом. В общем, эти последовательности взаимозаменяемо называются «линкерными последовательностями» или «линкерными областями». Специалист в данной области техники поймет, что линкерные области могут быть одной или несколькими аминокислотами и часто содержат один или несколько остатков глицина, которые придают гибкость линкеру. Такие линкерные последовательности могут быть повторены 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более раз или объединены с одним или несколькими различными линкерами для формирования матрицы линкерных последовательностей. Например, в некоторых приложениях линкерная область может содержать сайт расщепления для протеазы (например, для удаления тега очистки или CPP).

[0042] Используемые в данном документе термины CPP и мембранный транслокационный пептид (МТР) используются как взаимозаменяемые для обозначения пептидных последовательностей, которые повышают способность полипептида интернализироваться клеткой. Примеры CPP включают в себя, но не ограничиваются ими, сегменты пептида, полученные из ВИЧ Tat, вируса герпеса VP22, геномного продукта гена голокоза *Drosophila Antennapedia*, протегрина I, T1 CPP, T2 CPP или INF7 CPP (см. например, в патенте США № 20140140976, включенном здесь в качестве ссылки).

III. Клеточная инженерия

[0043] Аспекты реализации изобретения относятся к генной инженерии клеток млекопитающих с использованием транспозаз. Как правило, такие способы включают введение в клетки (i) первого вектора, кодирующего транспозазу (или полипептида транспозазы), и (ii) второго вектора, кодирующего желаемый генетический элемент, который фланкирован повторами транспозонов. Любой тип клетки млекопитающего может быть генетически модифицирован таким способом. Однако в определенных аспектах клетка (клеточная популяция) представляет собой стволовую клетку, iPSC-клетку, иммунную клетку или предшественники этих клеток. Методы, описанные ниже, относятся к конкретному примеру инженерии Т-клеток (или других иммунных клеток) для экспрессии CAR. Однако квалифицированный специалист признает, что методологии могут быть одинаково применимы к любому заданному типу клетки или инженерной конструкции.

[0044] Таким образом, в некоторых вариантах реализации предлагаются способы получения и/или расширения антигенспецифических Т-клеток, которые включают трансфекцию Т-клеток вектором экспрессии, содержащим конструкцию ДНК,

кодирующую CAR. Необязательно, такие клетки стимулируются антиген-положительными клетками, рекомбинантным антигеном или антителом рецептора, чтобы вызвать пролиферацию клеток.

[0045] В другом аспекте предложен способ стабильной трансфекции и редирекции Т-клеток. Такая трансфекция может представлять собой различные методы трансфекции, которые хорошо известны в данной области. В некоторых аспектах нуклеиновые кислоты могут быть введены в клетки с использованием вирусных векторов или вирусных частиц. Действительно, большинство исследователей использовали вирусные векторы для переноса гетерологичных генов в Т-клетки. Однако в некоторых аспектах реализации изобретения трансфекция не связана с использованием вирусного вектора. Например, трансфекция может быть электропорацией, использованием заряженных или незаряженных липидов, катионных полимеров или полипептидов, осаждением соли или другим переносом невирусных нуклеиновых кислот (такими как, но не ограничиваясь, сонопорацией). В некоторых аспектах трансфекция использует голую ДНК (или РНК или белок, в случае транспозазы). При использовании голы ДНК время, необходимое для производства перенаправленных Т-клеток, может быть уменьшено. Под «голой ДНК» подразумевают, что ДНК, кодирующая CAR, содержится в экспрессирующей кассете или векторе в правильной ориентации для экспрессии. С помощью способа электропорации получают стабильные трансфектанты, которые экспрессируют и несут на поверхности CAR.

[0046] В некоторых аспектах реализации изобретения CAR может быть далее определен как химерный TCR, который экспрессируется Т-клетками и который включает внутриклеточные сигнальные, трансмембранные и внеклеточные домены, где внеклеточный домен способен специфически связываться с МНС антигенами, который обычно не связан с рецептором Т-клеток таким образом. Стимуляция Т-клеток антигеном в надлежащих условиях приводит к пролиферации (росту) клеток и/или продуцированию IL-2. Этот метод применим для трансфекции химерными TCR, которые являются специфическими для любых заданных антигенов, таких как химерные TCR, которые являются специфичными для HER2/Neu (Stancovski et al., 1993), ERBB2 (Moritz et al., 1994), фолатный связывающий белок (Hwu et al., 1995), карцинома почек (Weitjens et al., 1996), и гликопротеины оболочки ВИЧ-1 gp120 и gp41 (Roberts et al., 1994). Другие целевые антигены клеточной мембраны включают, но не ограничиваются ими, CD20, карциноэмбриональный антиген, мезотелин, ROR1, c-Met, CD56, GD2, GD3, альфафтопротеин, CD23, CD30, CD123, IL-11Ralpha, каппа-цепь, лямбда-цепь, CD70, CA-125, MUC-1, EGFR и варианты, эпителиальный опухолевый антиген и так далее.

[0047] В некоторых аспектах Т-клетки представляют собой первичные человеческие Т-клетки, такие как Т-клетки, полученные из мононуклеарных клеток периферической крови человека (РВМС), РВМС, собранные после стимуляции G-CSF, костного мозга или пуповинной крови. Условия включают использование мРНК и ДНК и электропорацию. После трансфекции клетки могут быть немедленно введены или могут быть сохранены. В некоторых аспектах, после трансфекции, клетки могут размножаться в течение дней, недель или месяцев *ex vivo* в качестве объемной популяции в течение примерно 1, 2, 3, 4, 5 дней или более после переноса гена в клетки. В следующем аспекте, после трансфекции, трансфектанты клонируют и клон, демонстрирующий наличие единственной интегрированной или эпизодически поддерживаемой экспрессирующей кассеты или плазмиды, и экспрессию химерного рецептора расширяют *ex vivo*. Клон, выбранный для пропагации, демонстрирует способность специфически распознавать и лизировать клетки, экспрессирующие антиген. Рекомбинантные Т-клетки могут быть

пропагированы путем стимуляции IL-2 или другими цитокинами (например, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 и другими). Рекомбинантные Т-клетки могут быть пропагированы путем стимуляции искусственными антигенпредставляющими клетками. Рекомбинантные Т-клетки могут быть пропагированы клеткой, представляющей искусственный антиген, или с антителом, таким как ОКТ3, который пересекает CD3 на поверхности Т-клеток. Подмножества рекомбинантных Т-клеток могут быть удалены клеткой, представляющей искусственный антиген, или с антителом, таким как алемтузумаб, который связывает CD52 на поверхности Т-клеток. В следующем аспекте генетически модифицированные клетки могут быть заморожены.

10 [0048] Пропагацию Т-клеток (выживаемость) после инфузии можно оценить: (i) с помощью q-PCR и/или цифровой ПЦР (например, Droplet Digital™ PCR (Bio-Rad, Hercules, California) с использованием праймеров, специфичных для транспозона и/или CAR; (ii) с помощью проточной цитометрии с использованием антитела, специфичного для CAR, и/или (iii) проточной цитометрии с использованием растворимого ТАА.

15 [0049] В некоторых вариантах реализации изобретения клетки CAR вводятся индивидууму, нуждающемуся в этом, например индивидууму, у которого есть рак или инфекция. Затем клетки усиливают иммунную систему человека, чтобы атаковать соответствующие раковые или патогенные клетки. В некоторых случаях индивидууму предоставляется одна или несколько доз антигенспецифических Т-клеток CAR. В 20 случаях, когда индивидууму предоставляется две или более дозы антигенспецифических CAR Т-клеток, продолжительность между введениями должна быть достаточной, чтобы обеспечить время для их распространения у индивидуума, а в конкретных вариантах реализации продолжительность между дозами составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более дней.

25 [0050] Источник аллогенных или аутологичных Т-клеток, которые модифицированы так, чтобы включать химерный антигенный рецептор (и в некоторых случаях, у которых отсутствует функциональный TCR), может быть любого вида, но в конкретных вариантах реализации клетки получают из банка пуповины крови, периферической крови, эмбриональных стволовых клеток человека или индуцированных 30 плюрипотентных стволовых клеток, например. Подходящие дозы для терапевтического эффекта будут составлять по меньшей мере 10^5 или от примерно 10^5 до примерно 10^{10} клеток на дозу, например, предпочтительно в серии циклов дозирования. Примерный режим дозирования состоит из четырех недельных циклов дозирования повышающихся доз, начиная, по меньшей мере, около 10^5 клеток в день 0, например, увеличивая 35 постепенно до целевой дозы около 10^{10} клеток в течение нескольких недель после начала повышающихся доз. Подходящие способы введения включают внутривенное, подкожное, внутриполостное (например, устройство для доступа к резервуару), внутрибрюшинное и прямое введение в опухолевую массу.

40 [0051] Фармацевтическая композиция настоящего изобретения может использоваться отдельно или в комбинации с другими хорошо известными агентами, полезными для лечения рака. Если поставляться отдельно или в комбинации с другими агентами, фармацевтическая композиция данного изобретения может быть доставлена различными путями и в различные места в организме млекопитающих, особенно человека, для достижения определенного эффекта. Специалист в данной области поймет, что, хотя 45 для введения может использоваться более одного способа, конкретный способ может обеспечить более непосредственную и эффективную реакцию, чем другой способ. Например, внутрикожная доставка может быть преимущественно использована по сравнению с ингаляцией для лечения меланомы. Локальная или системная доставка

может быть выполнена путем введения, включающего применение или инстилляцию препарата в полости тела, ингаляцию или инсуффляцию аэрозоля или парентеральное введение, включающее внутримышечное, внутривенное, внутривенное, внутривенное, внутривенное, перитонеальное, подкожное или внутрикожное введение.

5 [0052] Композиция может быть предоставлена в стандартной дозированной форме, в которой каждая дозированная единица, например инъекция, содержит заранее определенное количество композиции отдельно или в соответствующей комбинации с другими активными агентами. В данном контексте термин "единичная лекарственная форма" относится к физически дискретным единицам, пригодным для применения в
10 качестве однократных доз для человеческих и животных субъектов, при этом каждая единица содержит заданное количество композиций по настоящему изобретению, рассчитанное в количестве, достаточном для получения желаемого эффекта в сочетании с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или наполнителем. Спецификации для стандартных лекарственных форм данного изобретения зависят от
15 конкретной фармакодинамики, связанной с фармацевтической композицией у конкретного субъекта.

[0053] Желательно, чтобы эффективное количество или достаточное количество изолированных трансформированных Т-клеток присутствовало в композиции и вводилось субъекту, так чтобы были установлены долгосрочные специфические
20 противоопухолевые ответы для уменьшения размера опухоли или устранения роста опухоли или в противном случае приводит к отсутствию такого лечения. Желательно, чтобы количество трансдуцированных Т-клеток повторно вводилось пациенту, вызывающее около 10% или, по меньшей мере, около 20% или, по меньшей мере, около 30% или, по меньшей мере, около 40% или, по крайней мере, около 50% или, по меньшей
25 мере, около 60%, примерно или, по меньшей мере, около 70%, примерно или, по меньшей мере, около 80%, примерно или, по меньшей мере, около 90%, примерно или, по меньшей мере, около 95%, примерно или, по меньшей мере, около 98%, или примерно на 100% уменьшение размера опухоли по сравнению с исходным или начальным (например, «день лечения 0») размером опухоли.

30 [0054] Соответственно, количество трансдуцированных Т-клеток, вводимых, должно учитывать путь введения и должно быть таким, чтобы достаточное количество трансдуцированных Т-клеток было введено для достижения желаемого терапевтического ответа. Кроме того, количество каждого активного агента, включенного в композиции, описанные в данном документе (например, количество на каждую клетку, которое
35 должно быть контактировано, или количество на определенный вес тела), может варьироваться в разных применениях. В общем, желательно, чтобы концентрация трансдуцированных Т-клеток была достаточной, чтобы обеспечить у субъекта лечение, по меньшей мере, от примерно 1×10^6 до примерно 1×10^9 трансдуцированных Т-клеток,
40 еще более желательно, от примерно 1×10^7 до примерно 5×10^8 трансдуцированных Т-клеток, но любое подходящее количество может быть использовано либо больше, например, более 5×10^8 клеток, либо меньше, например, менее 1×10^7 клеток. Расписание дозирования может быть основано на хорошо зарекомендовавших себя методах на основе клеток (см., например, Topalian и Rosenberg; 1987 год, патент США № 4690915)
45 или альтернативная стратегия непрерывной инфузии может быть использована.

[0055] Эти значения обеспечивают общее руководство по диапазону трансдуцированных Т-клеток, которые будут использоваться практиком при оптимизации способа настоящего изобретения для практики изобретения. Повторное

цитирование в данном документе таких диапазонов ни в коем случае не исключает использования большего или меньшего количества компонента, что может быть оправдано в конкретном применении. Например, фактическая доза и график могут варьироваться в зависимости от того, вводятся ли композиции в комбинации с другими фармацевтическими композициями или в зависимости от межличностных различий в фармакокинетике, назначении лекарственного средства и метаболизме. Специалист в данной области легко может внести любые необходимые корректировки в соответствии с требованиями конкретной ситуации.

IV. Инжинируемые конструкции

[0056] В некоторых конкретных аспектах реализации изобретения система транспозаз используется для получения клетки с конструкцией экспрессии, заканчивающей выбранный генетический элемент. В таких аспектах реализации изобретения выбранный генетический элемент фланкируется транспозоновыми повторами, которые являются функциональными с транспозазой, такими как последовательности IR/DR. Выбранный генетический элемент может содержать любую последовательность, которую хотят трансфектировать в клетку, но в определенных аспектах элемент кодирует последовательность кодирования полипептида и соответствующие последовательности контроля экспрессии для экспрессии млекопитающих. В некоторых конкретных аспектах выбранный генетический элемент кодирует антигенсвязывающий фрагмент, такой как антитело, Т-клеточный рецептор или рецептор химерного антигена (CAR). Используемый здесь термин «антиген» представляет собой молекулу, способную связываться антителом или рецептором Т-клеток или CAR.

[0057] Таким образом, варианты реализации изобретения включают нуклеиновые кислоты, включая нуклеиновые кислоты, кодирующие антигенспецифический полипептид CAR, включая CAR, который был гуманизирован для снижения иммуногенности (hCAR), включающий внутриклеточный сигнальный домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен содержащий один или несколько сигнальных мотивов. В некоторых вариантах реализации CAR может распознавать эпитоп, состоящий из общего пространства между одним или несколькими антигенами. Рецепторы распознавания паттернов, такие как Dectin-1, могут быть использованы для получения специфичности для углеводного антигена. В некоторых вариантах реализации область связывания может содержать комплементарные определяющие области моноклонального антитела, переменные области моноклонального антитела и/или их антигенсвязывающие фрагменты. В другом варианте реализации эта специфичность получена за счет пептида (например, цитокина), который связывается с рецептором. Область определения комплементарности (CDR) представляет собой короткую аминокислотную последовательность, обнаруженную в переменных доменах рецепторов антигенного рецептора (например, иммуноглобулина и Т-клеточного рецептора), который дополняет антиген и, следовательно, обеспечивает рецептор своей специфичностью для этого конкретного антигена. Каждая полипептидная цепь рецептора антигена содержит три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3). Поскольку рецепторы антигена обычно состоят из двух полипептидных цепей, для каждого антигенного рецептора имеется шесть CDR, которые могут вступать в контакт с антигеном - каждая тяжелая и легкая цепь содержит три CDR. Поскольку большинство вариаций последовательности, связанных с иммуноглобулинами и Т-клеточными рецепторами, обнаруживаются в CDR, эти области иногда называют гиперпеременными доменами. Среди них CDR3 показывает наибольшую изменчивость, поскольку он кодируется рекомбинацией VJ (VDJ в случае цепей тяжелой цепи и цепи TCR $\alpha\beta$).

[0058] Предполагается, что человеческие нуклеиновые кислоты CAR являются человеческими генами для усиления клеточной иммунотерапии для пациентов. В конкретном варианте осуществления изобретение включает в себя полноразмерную кДНК CAR или ее кодирующую область. Области или домены, связывающие антиген, могут содержать фрагмент цепей VH и VL одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), полученного из конкретного человеческого моноклонального антитела, такого как те, которые описаны в патенте США 7109304, включенном здесь в качестве ссылки, или он может включать любой другой антигенсвязывающий фрагмент. Фрагмент может также представлять собой любое количество различных антигенсвязывающих доменов человеческого антигенспецифического антитела. В более конкретном варианте реализации фрагмент представляет собой антигенспецифический scFv, кодируемый последовательностью, которая оптимизирована для использования кодонов человека для экспрессии в клетках человека.

[0059] Расположение может быть мультимерным, например двойным или мультимерным. Мультимеры, скорее всего, образованы перекрестным соединением варибельной части легкой и тяжелой цепей в то, что упоминалось Винтерсом как диабод. Шарнирная часть конструкции может иметь множество альтернатив от полного удаления до того, чтобы поддерживать только первый цистеин, до пролина, а не сериновой замены, до усечения первого цистеина. Часть Fc может быть удалена. Любой белок, который является стабильным и/или димеризованным, может служить этой цели. Можно использовать только один из доменов Fc, например, либо CH2, либо CH3-домен из иммуноглобулина человека. Можно также использовать шарнирную область CH2 и CH3 иммуноглобулина человека, которая была модифицирована для улучшения димеризации. Можно также использовать только шарнирную часть иммуноглобулина. Можно также использовать части CD8alpha.

[0060] Внутриклеточный сигнальный домен химерного антигенного рецептора отвечает за активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки, в которую помещен химерный рецептор. Термин «эффекторная функция» относится к специализированной функции дифференцированной клетки. Эффекторной функцией Т-клетки, например, может быть цитолитическая активность или вспомогательная активность, включая секрецию цитокинов. Эффекторная функция в наивной Т-клетке, Т-клетке памяти или Т-клетке типа памяти включает антиген-зависимую пролиферацию. Таким образом, термин «внутриклеточная сигнальная область» относится к части белка, которая трансформирует сигнал эффекторной функции и направляет клетку к выполнению специализированной функции. Хотя обычно используется весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать весь внутриклеточный полипептид. В той степени, в которой может быть использована усеченная часть внутриклеточного сигнального домена, такая усеченная часть может использоваться вместо цельной цепи, если она все еще трансдуцирует сигнал эффекторной функции. Таким образом, термин внутриклеточная сигнальная область включает в себя любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для трансляции сигнала эффекторной функции. Примеры включают дзета-цепь рецептора Т-клеток или любой из его гомологов (например, эта, дельта, гамма или эpsilon), цепь MB1, B29, Fc RIII, Fc RI и комбинации сигнальных молекул, таких как CD3ζ и CD28, CD27, 4-1BB, DAP-10, OX40 и их комбинации, а также другие подобные молекулы и фрагменты. Могут использоваться внутриклеточные сигнальные участки других членов семейств активирующих белков, таких как FcγRIII и FcεRI. См. Gross et al. (1992), Stancovski et al.

(1993), Moritz et al. (1994), Hwu et al. (1995), Weijtens et al. (1996), и Hekele et al. (1996) для описания химерных рецепторов Т-клеток, использующих эти альтернативные трансмембранные и внутриклеточные домены. В некоторых вариантах реализации человеческого CD3 ζ внутриклеточный домен используется для активации.

5 [0061] Антигенспецифический внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен могут быть связаны трансмембранным доменом, таким как шарнир IgG4Fc человека и Fc. Альтернативы включают трансмембранный домен CD4 человека, трансмембранный домен CD28 человека, трансмембранный домен человека CD3 ζ или домен с CD3 ζ с мутантным цистеином или другие трансмембранные домены от других трансмембранных сигнальных белков человека, таких как CD16 и CD8 и рецептор эритропоэтина. Дополнительные модификации могут быть добавлены к трансмембранным аминокислотным последовательностям.

10 [0062] В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота CAR содержит последовательность, кодирующую другие костимуляторные рецепторы, такие как трансмембранный домен и модифицированный внутриклеточный сигнальный домен CD28. Другие костимуляторные рецепторы включают, но не ограничиваются ими, один или несколько CD28, CD27, OX-40 (CD134), DAP10 и 4-1BB (CD137). В дополнение к первичному сигналу, инициированному CD3 ζ , дополнительный сигнал, обеспечиваемый человеческим костимуляторным рецептором, вставленным в человеческий CAR, важен для полной активации Т-клеток и может помочь улучшить выживаемость *in vivo* и терапевтический успех адаптивной иммунотерапии.

20 [0063] В конкретных вариантах реализации изобретение относится к выделенным сегментам нуклеиновой кислоты и экспрессионным кассетам, содержащим последовательности ДНК, которые кодируют CAR. Векторы настоящего изобретения сконструированы, прежде всего, для доставки желаемых генов в иммунные клетки, предпочтительно Т-клетки под контролем регулируемых эукариотических промоторов, например промотора MNDU3, промотора CMV, промотора EF1alpha или промотора убиквитина. Кроме того, векторы могут содержать селективный маркер, если не по какой-либо другой причине, для облегчения манипулирования *in vitro*. В других вариантах реализации CAR может быть экспрессирован из мРНК *in vitro*, транскрибируемой на матрице ДНК.

25 [0064] Молекулы рецепторов химерного антигена являются рекомбинантными и отличаются своей способностью связывать антиген и трансдуцировать сигналы активации с помощью мотивов активации иммунорецепторов (ИТАМ), присутствующих в их цитоплазматических хвостах. Рецепторные конструкции, использующие антигенсвязывающий фрагмент (например, генерируемый из одноцепочечных антител (scFv)), дают дополнительное преимущество быть «универсальным» в том смысле, что они связывают нативный антиген на поверхности клетки-мишени независимо от HLA. Например, несколько лабораторий сообщили о scFv-конструкциях, слитых с последовательностями, кодирующими внутриклеточную часть дзета-цепи комплекса CD3 (ζ), гамма-цепи Fc-рецептора и скай тирозинкиназы (Eshhar et al., 1993; Fitzer-Attas et al., 1998). Перенаправленные эффекторные механизмы Т-клеток, включая распознавание опухоли и лизиса с помощью CTL, были задокументированы в нескольких системах антигена-scFv: ζ человека и мыши (Eshhar, 1997; Altenschmidt et al., 1997; Brocker et al., 1998).

45 [0065] На сегодняшний день области связывания антигена, не относящиеся к человеку, обычно используются при конструировании рецептора химерного антигена. Потенциальной проблемой с использованием областей связывания антигена человека,

таких как мышинные моноклональные антитела, является отсутствие эффекторной функции человека и невозможность проникновения в массу опухоли. Другими словами, такие антитела могут быть неспособны опосредовать комплемент-зависимый лизис или лизировать клетки-мишени человека с помощью антителозависимой клеточной токсичности или опосредуемый Fc-рецептором фагоцитоз для уничтожения клеток, экспрессирующих CAR. Кроме того, нечеловеческие моноклональные антитела могут быть распознаны хозяином человека как чужеродный белок, и поэтому повторные инъекции таких инородных антител могут приводить к индукции иммунных реакций, приводящих к опасным реакциям гиперчувствительности. Для моноклональных антител на основе мыши это часто называют ответом антитела человека против мыши (НАМА). Поэтому использование человеческих антител является более предпочтительным, поскольку они не вызывают столь сильного ответа НАМА, как мышинные антитела. Аналогичным образом, благодаря использованию человеческих последовательностей в CAR можно избежать опосредованного иммунитетом распознавания и, следовательно, элиминации эндогенными Т-клетками, которые находятся у реципиента и распознают обработанный антиген в контексте HLA.

[0066] В некоторых вариантах реализации изобретения химерный антиген-рецептор включает: а) внутриклеточный сигнальный домен, б) трансмембранный домен и в) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающую область.

[0067] В конкретных вариантах реализации изобретения домены сигнализации внутриклеточного рецептора в CAR включают комплексы рецепторов Т-клеточного антигена, такие как дзета-цепь CD3, также Fc γ RIII костимулирующие сигнальные домены, CD28, CD27, DAP10, CD137, OX40, CD2, самостоятельно или в серии с CD3zeta, например. В конкретных вариантах реализации изобретения внутриклеточный домен (который может упоминаться как цитоплазматический домен) содержит часть или все одну или более из zeta-цепи TCR, CD28, CD27, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, Fc ϵ RI γ , ICOS/CD278, IL-2Rbeta/CD122, IL-2Ralpha/CD132, DAP10, DAP12 и CD40. В некоторых вариантах реализации используется любая часть эндогенного рецептора Т-клеток во внутриклеточном домене. Один или несколько цитоплазматических доменов могут быть использованы, так как так называемые CAR третьего поколения имеют, по меньшей мере, два или три сигнальных домена, слитые вместе для аддитивного или синергетического эффекта.

[0068] В некоторых вариантах реализации антигенспецифическая часть химерного рецептора (которую можно назвать внеклеточным доменом, содержащим антигенсвязывающую область) включает в себя опухоль-ассоциированный антиген или специфический к патогену антигенсвязывающий домен, включающий признанный углевод-антиген рецепторами распознавания образцов, такими как Dectin-1. Опухоль-ассоциированный антиген может иметь любой вид, если он экспрессируется на клеточной поверхности опухолевых клеток. Типичные варианты противоопухолевых антигенов включают CD19, CD20, карциноэмбриональный антиген, альфафтопротеин, CA-125, MUC-1, CD56, EGFR, c-Met, AKT, Her2, Her3, эпителиальный опухолевый антиген, ассоциированный с меланомой антиген, мутированный p53, мутировал gas и т. д. В некоторых вариантах реализации CAR может коэкспрессироваться с связанным с мембраной цитокином для улучшения стойкости, когда имеется небольшое количество ассоциированного с опухолью антигена. Например, CAR может быть коэкспрессироваться с мембранным IL-15.

[0069] В определенных вариантах реализации изобретения могут быть таргетированы внутриклеточные опухолевые ассоциированные антигены, такие как HA-1, сурвивин,

WT1 и р53. Это может быть достигнуто с помощью CAR, экспрессированным на универсальной Т-клетке, которая распознает обработанный пептид, описанный из внутриклеточного опухолевого ассоциированного антигена в контексте HLA. Кроме того, универсальная Т-клетка может быть генетически модифицирована для экспрессии парного рецептора Т-клеток, который распознает внутриклеточный опухолевый антиген в контексте HLA.

[0070] Патоген может быть любого вида, но в конкретных вариантах реализации изобретения патоген представляет собой грибок, бактерии или вирус, например. Примеры вирусных патогенов включают в себя семейства семейств Adenoviridae, вируса Эпштейна-Барра (EBV), цитомегаловируса (CMV), респираторного синцитиального вируса (RSV), вируса JC, вируса BK, вирусов HSV, HHV, Picornaviridae, Herpesviridae, Hepadnaviridae, Flaviviridae, Retroviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Papovaviridae, Polyomavirus, Rhabdoviridae и Togaviridae. Примеры патогенных вирусов вызывают оспу, грипп, эпидемический паротит, корь, ветряную оспу, эболу и краснуху. Примерами патогенных грибов являются *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Pneumocystis* и *Stachybotrys*. Примеры патогенных бактерий включают стрептококк, псевдомонад, шигелла, кампилобактер, стафилококк, хеликобактер, кишечную палочку, риккетсию, бацилл, борделла, хламидиоз, спирохеты и сальмонеллы. В одном варианте реализации рецептор Dectin-1 можно использовать для генерирования CAR, который распознает углеводную структуру на клеточной стенке грибов. Т-клетки, генетически модифицированные для экспрессии CAR, основанные на специфичности Dectin-1, могут распознавать рост *Aspergillus* и ее таргетировать. В другом варианте реализации CAR могут быть сделаны на основе антитела, распознающего вирусные детерминанты (например, гликопротеины CMV и Ebola), чтобы прервать вирусные инфекции и патологию.

[0071] В некоторых вариантах реализации патогенный антиген представляет собой углеводный антиген *Aspergillus*, для которого внеклеточный домен CAR распознает образцы углеводов стенки грибковых клеток, например, Dectin-1.

[0072] Химерный иммунорецептор в соответствии с данным изобретением может быть получен любым способом, известным в данной области, хотя предпочтительно его получают с использованием методов рекомбинантной ДНК. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую несколько областей химерного рецептора, может быть получена и собрана в полную кодирующую последовательность стандартными методами молекулярного клонирования (скрининг геномной библиотеки, ПЦР, лигирование с использованием праймеров, scFv-библиотеки от дрожжей и бактерий, ориентированные на сайты мутагенез и т. д.). Полученную кодирующую область можно вставить в вектор экспрессии и использовать для трансформации подходящей аллогенной линии Т-клеток экспрессии.

[0073] Как используется в данном документе, конструкция нуклеиновой кислоты или последовательность нуклеиновой кислоты или полинуклеотид предназначены для обозначения молекулы ДНК, которая может быть трансформирована или введена в Т-клетку, которая может быть трансформирована, и транслирована для получения продукта (например, химерного антигенного рецептора).

[0074] В иллюстративной конструкции нуклеиновой кислоты (полинуклеотид), используемой в данных вариантах реализации, промотор функционально связан с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный рецептор, то есть они расположены так, чтобы способствовать транскрипции матричной РНК из ДНК, кодирующей химерный рецептор. Промотор может иметь геномным или генерироваться синтетически. Разнообразие промоторов для использования в Т-клетках хорошо

известно в данной области (например, промотор CD4 описанны в Marodon et al. (2003)). Промотор может быть конститутивным или индуцибельным, где, например, индукция связана с конкретным типом клетки или конкретным уровнем созревания.

Альтернативно, ряд известных вирусных промоторов также подходит. Промоторы, представляющие интерес, включают промотор β -актина, ранние и поздние промоторы SV40, промотор иммуноглобулина, промотор цитомегаловируса человека, промотор ретровируса и промотор вируса фолликуляции Френда. Промоторы могут или могут не быть связаны с энхансерами, причем энхансеры могут быть естественным образом связаны с конкретным промотором или связаны с другим промотором.

[0075] Последовательность открытой рамки считывания, кодирующей химерный рецептор, может быть получена из геномной ДНК, кДНК или может быть синтезирована (например, посредством ПЦР) или их комбинаций. В зависимости от размера геномной ДНК и количества интронов может быть необходимо использовать кДНК или их комбинацию, поскольку установлено, что интроны стабилизируют мРНК или обеспечивают экспрессию Т-клеток (Barthel and Goldfeld, 2003). Кроме того, может быть выгодным использование эндогенных или экзогенных некодирующих областей для стабилизации мРНК.

[0076] Для экспрессии рецептора химерного антигена область инициации природной или эндогенной транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей N-концевые компоненты химерного рецептора, может быть использована для генерирования химерного рецептора в целевом хозяине. Альтернативно, может быть использована область инициации экзогенной транскрипции, которая допускает конститутивную или индуцируемую экспрессию, причем экспрессию можно контролировать в зависимости от целевого хозяина, желаемого уровня экспрессии, природы целевого хозяина и тому подобного.

[0077] Аналогично, сигнальная последовательность, направляющая химерный рецептор к поверхностной мембране, может быть эндогенной сигнальной последовательностью N-концевого компонента химерного рецептора. Необязательно, в некоторых случаях может быть желателен обмен этой последовательности на другую сигнальную последовательность. Однако выбранная сигнальная последовательность должна быть совместима с секреторным путем Т-клеток, чтобы химерный рецептор был представлен на поверхности Т-клетки.

[0078] Точно так же область терминации может быть обеспечена естественной или эндогенной границей терминации транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей C-концевой компонент химерного рецептора. Альтернативно, область терминации может быть получена из другого источника. По большей части источник области терминации обычно не считается критическим для экспрессии рекомбинантного белка, и может быть использовано большое разнообразие областей терминации без отрицательного влияния на экспрессию.

[0079] Химерные конструкции, описанные в данном изобретении, находят применение у субъектов, имеющих или подозреваемых в наличии рака, путем уменьшения размера опухоли или предотвращения роста или повторного роста опухоли у этих субъектов. Соответственно, настоящее изобретение также относится к способу снижения роста или предотвращению образования опухоли у субъекта путем введения химерной конструкции в изолированную Т-клетку субъекта и повторного введения субъекту трансформированной Т-клетки, тем самым, - реакции на уменьшение или устранение опухолей у субъекта. Подходящие Т-клетки, которые могут использоваться, включают цитотоксические лимфоциты (CTL) или любую клетку, имеющую рецептор Т-клеток.

Как хорошо известно специалисту в данной области техники, для изоляции этих клеток от субъекта легко доступны различные способы. Например, используя экспрессию маркера клеточной поверхности или используя коммерчески доступные наборы (например, ISOCELL™ от Pierce, Rockford, Ill.).

5 [0080] Предполагается, что химерную конструкцию можно вводить в собственные Т-клетки субъекта в виде голый ДНК в сочетании с другими реагентами (включая, но не ограничиваясь ими, липиды, катионные полимеры, ПЭГ-комплексы, белковые комплексы) или в подходящем векторе. Способы стабильной трансфекции Т-клеток путем электропорации с использованием голый ДНК известны в данной области. См.,
10 например, патент США. № 6,410,319, включенной здесь в качестве ссылки. Голая ДНК обычно относится к ДНК, кодирующей химерный рецептор, содержащийся в векторе экспрессии плазмиды в правильной ориентации для экспрессии. Преимущественно использование голый ДНК уменьшает время, необходимое для получения Т-клеток, экспрессирующих химерный рецептор.

15 [0081] Как только установлено, что трансфицированная или трансформированная Т-клетка способна экспрессировать химерный рецептор в виде белка поверхностной мембраны с требуемой регуляцией и на желаемом уровне, можно определить, является ли химерный рецептор функциональным в клетке-хозяине, чтобы обеспечить желаемую
20 индукцию сигнала. Впоследствии трансдуцированные Т-клетки повторно вводят субъекту для активации противоопухолевых ответов у субъекта. Для облегчения введения трансдуцированные Т-клетки в соответствии с изобретением могут быть превращены в фармацевтическую композицию или изготовлены в виде имплантата, подходящего для введения *in vivo*, с соответствующими носителями или разбавителями, которые дополнительно могут быть фармацевтически приемлемыми. Способы
25 изготовления такого состава или имплантата были описаны в данной области техники (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mack, ed. (1980)). При необходимости трансдуцированные Т-клетки могут быть приготовлены в виде полутвердой или жидкой формы, такой как капсула, раствор, инъекция, ингалятор или аэрозоль обычными способами для их соответствующего способа введения. Средства,
30 известные в данной области, могут быть использованы для предотвращения или сведения к минимуму высвобождения и абсорбции композиции до тех пор, пока она не достигнет ткани или органа-мишени, или для обеспечения своевременного высвобождения композиции. Желательно, однако, использовать фармацевтически приемлемую форму, которая не влияет на клетки, экспрессирующие химерный рецептор. Таким образом,
35 желательно, чтобы трансдуцированные Т-клетки могли быть превращены в фармацевтическую композицию, содержащую сбалансированный солевой раствор, предпочтительно сбалансированный солевой раствор Хэнкса или нормальный физиологический раствор.

V. Наборы реализации изобретения

40 [0082] Любая из описанных здесь композиций может быть включена в комплект. В некоторых аспектах полипептид транспозазы или нуклеиновая кислота, кодирующая их, предоставляется в наборе. Такой набор может включать в себя множество дополнительных элементов, таких как вектор ДНК, кодирующий повторы транспозонов, трансфекционные реагенты, клетки, экспрессионную конструкцию CAR, среду, aAPC,
45 факторы роста, антитела (например, для сортировки или характеристики Т-клеток CAR) и/или плазмиды, кодирующие CAR или транспозазу.

[0083] В неограничивающем примере набор содержит полипептид транспозазы или нуклеиновую кислоту, кодирующую транспозазу, один или несколько реагентов для

генерирования экспрессирующей конструкции CAR (с фланкирующими повторами транспозонов), клетки для трансфекции экспрессирующей конструкции, и/или один или несколько инструментов для получения клеток для трансфекции экспрессирующей конструкции (таким инструментом может быть шприц, пипетка, щипцы и/или любое такое медицинское устройство). В еще одном аспекте включено устройство для трансфекции, такое как устройство электропорации.

[0084] В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессионная конструкция для устранения эндогенной экспрессии TCR α/β , один или несколько реагентов для получения конструкции и/или CAR+ T-клетки представлены в наборе. В некоторых вариантах реализации включают в себя экспрессирующие конструкции, которые кодируют нуклеазу.

[0085] Наборы могут содержать одну или несколько подходящих аликвотных композиций или реагентов для получения композиций данного изобретения. Компоненты наборов могут быть представлены либо в водной среде, либо в лиофилизированной форме. Контейнерные наборы могут включать по меньшей мере один флакон, пробирку, колбу, бутылку, шприц или другие контейнерные средства, в которые может быть размещен компонент, и предпочтительно подходящим образом аликвоты. Если в наборе содержится более одного компонента, комплект также будет содержать второй, третий или другой дополнительный контейнер, в который могут быть добавлены дополнительные компоненты. Однако различные комбинации компонентов могут содержаться во флаконе. Наборы данного изобретения также обычно включают средство для содержания конструкции химерного рецептора и любых других реагентных контейнеров в закрытом виде для коммерческой продажи. Такие контейнеры могут включать в себя инъекционные или выдувные формованные пластиковые контейнеры, в которые, например, сохраняются необходимые флаконы.

VI. Примеры

[0086] Следующие примеры включены для демонстрации определенных вариантов реализации изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что методы, раскрытые в следующих ниже примерах, представляют собой методы, обнаруженные изобретателями, которые хорошо функционируют при практической реализации изобретения, и поэтому могут рассматриваться как предпочтительные способы для его практической реализации. Однако, в контексте данного изобретения, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что в конкретных раскрытых вариантах реализации изобретения могут быть сделаны многие изменения, однако при этом будет получен схожий или аналогичный результат, без отступления от концепции, сущности и объема изобретения.

Пример 1 - Рекомбинантные транспозазы с высокой активностью в клетках человека

[0087] Последовательности ДНК, кодирующие транспозазы, первоначально полученные из *Salmo salar* (атлантический лосось), были спроектированы и гуманизированы с целью получения ферментов с повышенной эффективностью в клетках человека. Последовательности двух полученных транспозаз (и их кодирующих последовательностей нуклеиновой кислоты) показаны ниже и названы hSB110 и hSB81.

hSB110 (SEQ ID NO: 1):

```

1 mgkskeisdq lrkrivdlhk sgsslgaisk rlavprssvq tivrkykhhg ttqpsyrsg
45 61 rrvlsprder tlrvkqinp rttakdlvkm leetgtkvti stvkrvlyrh nlkghsarkk
121 pllqnrhkka rlrfarahgd kdrtfwrnvl wsdetkielf ghndhryvwr kkgeackpkn
181 tiptvkhggg simlwgcfaa ggtgalhkid gimdavqyv d ilkqhlktsv rklklgrkwv
241 fqhdndpkht skhvrkwkld nkvvkvwlews qspdlnpnen lwaelkkvr arrrptnlql

```

301 hqlcqeewak ihpnycgklv egypkrltqv kqfkgnatky

hSB110 (SEQ ID NO: 2):

1 АТГГГЦААГА ГЦАААГАГАТ ЦАГЦЦАГГАЦ ЦТГЦГГААГЦ ГГАТЦГТГГА
ЦЦТГЦАЦААГ

5 61 АГЦГГЦТЦТА ГЦЦТГГГЦГЦ ЦАТЦАГЦААГ АГАЦТГГЦЦГ ТГЦЦТАГААГ
ЦАГЦГТГЦАГ

121 АЦЦАТЦГТГЦ ГГААГТАЦАА ГЦАЦЦАЦГГЦ АЦЦАЦЦАГЦ
ЦЦАГЦТАЦАГ АТЦТГГААГГ

10 181 ЦГГАГАГТГЦ ТГАГЦЦЦАГ ГГАЦГАГАГА АЦАЦТЦГТГЦ ГЦААГТГЦА
ГАТЦААЦЦЦ

241 ЦГГАЦЦАЦЦГ ЦЦААГГАЦЦТ ЦГТГААГАТГ ЦТГГААГАГА
ЦАГГЦАЦЦАА ГТГТЦЦАТЦ

301 АГЦАЦЦГТГА АГЦГГГТГЦТ ГТАЦЦГГЦАЦ ААЦЦТГААГГ ГЦЦАЦАГЦГЦ
ЦАГАААГААГ

15 361 ЦЦЦТГЦТГЦ АГААЦАГАЦА ЦААГААГГЦЦ ЦГГЦТГАГАТ
ТЦГЦЦАГАГЦ ЦЦАЦГГЦГАЦ

421 ААГГАЦАГАА ЦЦТТЦТГГЦГ ГААЦГТГЦТГ ТГГАГЦГАЦГ АГАЦАААГАТ
ЦГАГЦТГТТЦ

20 481 ГГЦЦАЦААЦГ АЦЦАЦАГАТА ЦГТГТГГЦГГ ААГААГГЦГ АГГЦЦТГЦАА
ГЦЦЦААГААЦ

541 АЦЦАТЦЦЦА ЦАГТГААГЦА ЦГГЦГГАГГЦ АГЦАТЦАТГЦ ТГТГГГЦТГ
ТТТГЦЦГЦТ

601 ГГЦГГЦАЦАГ ГЦГЦЦТГЦА ЦААААТЦГАЦ ГГЦАТЦАТГГ АЦГЦЦГТГЦА
ГТАЦГТГГАЦ

25 661 АТЦЦТГААГЦ АГЦАЦЦТГАА ААЦЦТЦТГТГ ЦГГААГЦТГА АГЦТГГГЦЦГ
ГАААТГГГТГ

721 ТТЦЦАГЦАЦГ АЦААЦГАЦЦЦ ЦААГЦАЦАЦЦ АГЦААГЦАЦГ
ТГЦГГАААТГ ГЦТГААГГАЦ

30 781 ААЦАААГТГА ААГТГЦТГГА АТГГЦЦЦАГЦ ЦАГТЦЦЦЦЦГ
АЦЦТГААЦЦЦ ЦАТЦГААААЦ

841 ЦТГТГГГЦЦГ АГЦТГААГАА ААГАГТГЦГГ ГЦЦАГАЦГГЦ ЦЦАЦЦААЦЦТ
ГАЦАЦАГЦТГ

901 ЦАЦЦАГЦТГТ ГЦЦАГГААГА ГТГГГЦЦААГ АТЦЦАЦЦЦЦА
АЦТАЦТГЦГГ ЦААГЦТГГТГ

35 961 ГААГГЦТАЦЦ ЦЦААГАГГЦТ ГАЦЦЦААГТГ АААЦАГТТЦА
АГГГЦААЦГЦ ЦАЦЦААГТАЦ

1021 ТГА

hSB81 (SEQ ID NO: 3):

1 mgkskeisqd lrkrivdlhk sgsslgaisk rlavprssvq tivrkykhhg ttqpsyrsg

40 61 rrvlsprder tlvrvqinp rttakdlvkm leetgkvti stvkrvlyrh nlkghsarkk

121 pllqnrhkka rlrfarahgd kdrtfwrnvl wsdetkielf ghndhryvwr kkgeackpkn

181 tiptvkhggg simlwgcfaa ggtgalhkid gimdavqyv d ilqhlktsv rklklgrkww

241 fqhdndpkht skhvrkwkld nkvvlewps qspdlmpien lwaelkkrvr arrptnlql

301 hqlcqeewak ihptycgklv egypkrltqv kqfkgnatky

45 hSB81 (SEQ ID NO: 4):

1 АТГГГЦААГА ГЦАААГАГАТ ЦАГЦЦАГГАЦ ЦТГЦГГААГЦ ГГАТЦГТГГА
ЦЦТГЦАЦААГ

61 АГЦГГЦТЦТА ГЦЦТГГГЦГЦ ЦАТЦАГЦААГ АГАЦТГГЦЦГ ТГЦЦТАГААГ

ЦАГЦГТГЦАГ

121 АЦЦАТЦГТГЦ ГГААГТАЦАА ГЦАЦЦАЦГГЦ АЦЦАЦЦАГЦ
ЦЦАГЦТАЦАГ АТЦТГГААГГ

181 ЦГГАГАГТГЦ ТГАГЦЦЦАГ ГГАЦГАГАГА АЦАЦТЦГТГЦ ГЦААГТГЦА
5 ГАТЦААЦЦЦ

241 ЦГГАЦЦАЦГ ЦЦААГГАЦТ ЦГТГААГАТГ ЦТГГААГАГА
ЦАГГЦАЦЦАА ГТГТЦЦАТЦ

301 АГЦАЦГТГА АГЦГГТГЦТ ГТАЦЦГГЦАА АЦЦТГААГГ ГЦЦАЦАГЦГЦ
ЦАГАААГААГ

361 ЦЦЦТГЦТГЦ АГААЦАГАЦА ЦААГААГГЦ ЦГГЦТГАГАТ
10 ТЦГЦАГАГЦ ЦЦАЦГГЦАЦ

421 ААГГАЦАГАА ЦЦТТЦТГГЦГ ГААЦГТГЦТГ ТГГАГЦГАЦГ АГАЦАААГАТ
ЦГАГЦТГТЦ

481 ГГЦЦАЦААЦГ АЦЦАЦАГАТА ЦГТГТГГЦГГ ААГААГГЦГ АГГЦЦТГЦАА
15 ГЦЦЦААГААЦ

541 АЦЦАТЦЦЦА ЦАГТГААГЦА ЦГГЦГГАГГЦ АГЦАТЦАТГЦ ТГТГГГЦТГ
ТТТГЦЦГЦТ

601 ГГЦГЦАЦАГ ГЦГЦЦТГЦА ЦААААТЦГАЦ ГГЦАТЦАТГГ АЦГЦЦГТГЦА
ГТАЦГТГГАЦ

661 АТЦЦТГААГЦ АГЦАЦЦТГАА ААЦЦТЦТГТГ ЦГГААГЦТГА АГЦТГГГЦЦГ
20 ГАААТГГТГ

721 ТТЦАГЦАЦГ АЦААЦГАЦЦ ЦААГЦАЦАЦ АГЦААГЦАЦГ
ТГЦГГАААТГ ГЦТГААГГАЦ

781 ААЦАААГТГА ААГТГЦТГГА АТГГЦЦАГЦ ЦАГТЦЦЦЦГ
25 АЦЦТГААЦЦ ЦАТЦГААААЦ

841 ЦГТГГГЦЦГ АГЦТГААГАА ААГАГТГЦГГ ГЦЦАГАЦГГЦ ЦЦАЦЦААЦЦТ
ГАЦАЦАГЦТГ

901 ЦАЦАГЦТГТ ГЦЦАГГААГА ГТГГЦЦААГ АТЦЦАЦЦЦА
ЦЦТАЦТГЦГГ ЦААГЦТГТГ

961 ГААГГЦТАЦ ЦЦААГАГГЦТ ГАЦЦЦААГТГ АААЦАГТТЦА
30 АГГГЦААЦГ ЦАЦЦААГТАЦ

1021 ТГА

[0088] Транспозазы hSB110 и hSB81, а также контрольная транспозаза, затем
тестировались на их способность производить сконструированные человеческие Т-
35 клетки с генетически интегрированной CAR. Протокол для этих исследований показан
на фиг. 1. Т-клетки человека были совместно трансфицированы конструкцией ДНК
транспозонов, кодирующей CAR, фланкированную повторами транспозонов, вместе
с мРНК, кодирующей полипептиды транспозаз. Для трансфекций использовалась
40 электропорационная система 4D-NUCLEOFECTOR™ (Lonza). После электропорации
клетки культивировали и оценивали экспрессию CAR посредством проточной
цитометрии.

[0089] Результаты этих исследований показаны на фиг. 2. Гистограммы верхних
панелей показывают количество клеток, положительных по CAR (по оси Y), по
сравнению с клетками, которые оказались нежизнеспособными, оценивали с помощью
45 7AAD-окрашивания (по оси X), через 8 дней после трансфекции. Нижние панели
показывают количество клеток, положительное по CAR (ось Y) и которые экспрессируют
CD3 (ось X), 15 дней после трансфекции. Эти результаты наглядно демонстрируют, что
транспозазы hSB110 и hSB81 значительно эффективнее в трансгенных клетках, чем

SB100х. Через 8 дней после трансфекции более 22% клеток, трансфицированных hSB110 и hSB81, экспрессируют CAR. Только 15% клеток, трансфицированных SB100х, экспрессировали CAR в этот момент времени. Не было обнаружено существенной разницы в количестве нежизнеспособных клеток с любой из тестовых конструкций (по оценке 7AAD). Более того, к 15-му дню более 80% популяций клеток, трансфицированных hSB110 и hSB81, экспрессировали CAR и CD3.

[0090] Все композиции и способы, описанные и заявленные в настоящем документе, могут быть проведены и осуществлены без излишних экспериментов в свете настоящего описания. Хотя композиции и способы данного изобретения были описаны в отношении предпочтительных вариантов реализации изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что вариации могут быть применены для композиций и/или способов, и для этапов или последовательности этапов способа, описанного в данном изобретении, без отклонения от концепции, сущности и объема изобретения. Более конкретно, будет очевидно, что некоторые агенты, которые как химически, так и физиологически родственные, могут быть заменены на агенты, которые описаны в данном изобретении, при этом будут достигнуты такие же или сходные результаты. Все подобные аналогичные замены и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, считаются находящимися в пределах сущности, объема и концепции изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения.

ЛИТЕРАТУРНЫЕ ИСТОЧНИКИ

Следующие ссылки, в той степени, в которой они предоставляют примерные процедурные или другие детали, дополняющие приведенные здесь, специально включены сюда путем ссылки.

- U.S. Patent 4,554,101
- 25 U.S. Patent 4,690,915
- U.S. Patent 6,410,319
- U.S. Patent 6,489,458
- U.S. Patent 7,148,203
- U.S. Patent 8,227,432
- 30 U.S. Publn. 2011/0117072
- U.S. Publn. 2014/0140976
- Altenschmidt et al., Adoptive transfer of in vitro-targeted, activated T lymphocytes results in total tumor regression, *J Immunol.* 1997 Dec 1; 159(11):5509-15.
- Barthel and Goldfeld, *J. Immunol.*, 171:3612-3619, 2003
- 35 Brocker et al., *Adv. Immunol.*, 68:257, 1998
- Eshhar et al., Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;90(2):720-4, 1993.
- Eshhar, Tumor-specific T-bodies: towards clinical application. *Cancer Immunol Immunother.*
- 40 1997 Nov-Dec;45(3-4):131-6. 1997
- Fitzer-Attas et al., Harnessing Syk family tyrosine kinases as signaling domains for chimeric single chain of the variable domain receptors: optimal design for T cell activation. *J Immunol.* 1998 Jan 1;160(1):145-54. 1998
- Gross et al., Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional
- 45 receptors with antibody-type specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:10024-10028, 1989.
- Gross et al. (1992) Endowing T cells with antibody specificity using chimeric T cell receptors. *FASEB J.* 1992 Dec;6(15):3370-8.
- Hekele et al. Growth retardation of tumors by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes

reprogrammed by CD44v6-specific scFv:zeta-chimera. *Int J Cancer*. 1996 Oct 9;68(2):232-8, 1996.

Hwu et al. (1995) In vivo antitumor activity of T cells redirected with chimeric antibody/T-cell receptor genes. *Cancer Res*. 1995 Aug 1;55(15):3369-73.

5 Ivics et al., Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells., *Cell*, 91(4):501-510, 1997.

Kyte and Doolittle, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-32, 1982.

10 Mates et al., Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat. Genetics*. 41(6):753-61, 2009.

Marodon et al., *Blood*, 101:3416-3423, 2003

Moritz et al. (1994) Cytotoxic T lymphocytes with a grafted recognition specificity for ERBB2-expressing tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 May 10;91(10):4318-22.

Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mack, ed., 1980

15 Roberts et al., *Blood*, 84:2878, 1994

Stancovski et al., *J. Immunol.*, 151:6577, 1993

Topalian and Rosenberg, 1987

20 Weijtens et al. (1996) Single chain Ig/gamma gene-redirceted human T lymphocytes produce cytokines, specifically lyse tumor cells, and recycle lytic capacity. *J Immunol*. 1996 Jul 15;157(2):836-43.

(57) Формула изобретения

1. Рекомбинантный полипептид, имеющий активность транспозазы, содержащий последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1, причем
25 полипептид содержит Арг в положении, соответствующем позиции 14; Ала в положении, соответствующем позиции 33; Гис в положении, соответствующем позиции 115; Асп в положении, соответствующем позиции 214; Ала в положении, соответствующем позиции 215; Вал в положении, соответствующем позиции 216; Глн в положении, соответствующем позиции 217; Гис в положении, соответствующем позиции 243; Арг
30 в положении, соответствующем положению 136; Гис в положении, соответствующем положению 253, и/или Арг в положении, соответствующем положению 255.

2. Полипептид по п. 1, причем полипептид содержит Арг в положении, соответствующем позиции 14; Ала в положении, соответствующем позиции 33; Гис в положении, соответствующем позиции 115; Асп в положении, соответствующем позиции 214; Ала в положении, соответствующем позиции 215; Вал в положении,
35 соответствующем позиции 216; Глн в положении, соответствующем позиции 217; Гис в положении, соответствующем позиции 243; Арг в положении, соответствующем положению 136; Гис в положении, соответствующем положению 253, и Арг, в положении, соответствующем положению 255.

40 3. Полипептид по п. 1, содержащий Асн в положении, соответствующем позиции 314.

4. Полипептид по п. 3, отличающийся тем, что полипептид по меньшей мере на 95% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1.

5. Полипептид по п. 3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1.

45 6. Полипептид по п. 1, содержащий Тре в положении, соответствующем позиции 314.

7. Полипептид по п. 6, отличающийся тем, что полипептид по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичен последовательности SEQ ID NO: 3.

8. Полипептид по п. 7, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3.

9. Полипептид по п. 6, где полипептид содержит последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:3.

10. Полинуклеотидная молекула, содержащая последовательность, кодирующую полипептид по любому из пп. 1-9.

5 11. Полинуклеотидная молекула по п. 10, причем молекулой является ДНК.

12. Полинуклеотидная молекула по п. 11, причем ДНК содержит промотор для экспрессии полипептида.

13. Полинуклеотидная молекула по п. 11, причем ДНК содержит промотор для экспрессии полипептида в клетках млекопитающих.

10 14. Полинуклеотидная молекула по п. 10, причем молекулой является мРНК.

15. Полинуклеотидная молекула по п. 14, содержащая 5'-кэп, IRES мотив и/или поли(А) последовательность.

16. Полинуклеотидная молекула по п. 15, содержащая поли(А) последовательность от 20 до 300 нуклеотидов.

15 17. Полинуклеотидная молекула по п. 10, причем молекула содержит последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 2.

18. Полинуклеотидная молекула по п. 10, причем молекула содержит последовательность SEQ ID NO: 2.

20 19. Способ получения полипептида по п. 1, включающий трансфекцию клетки полинуклеотидом, кодирующим полипептид по п. 1, и экспрессию полипептида из полинуклеотида.

20. Клетка хозяина для продуцирования транспозазы, содержащая рекомбинантный полипептид, имеющий активность транспозазы, по п. 1 или полинуклеотидную молекулу по п. 10.

25 21. Клетка по п. 20, отличающаяся тем, что клеткой является клетка человека.

22. Клетка по п. 20, причем клеткой является стволовая клетка или индуцибельная плюрипотентная клетка (iPS).

23. Клетка по п. 20, причем клеткой является клетка иммунной системы.

30 24. Клетка по п. 23, причем клеткой является клетка естественный киллер (NK), Т-клетка или предшественник NK клетки или Т-клетки.

25. Клетка по п. 20, причем клетка содержит полипептид по п. 1.

26. Клетка по п. 20, причем клетка содержит мРНК, кодирующую полипептид по п. 1.

27. Способ генетического конструирования клетки, включающий:

35 (а) трансфекцию клетки с помощью (i) нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид по п. 1; и (ii) ДНК, кодирующей выбранный генетический элемент, фланкированный повторами транспозонов; а также

40 (б) инкубацию клетки в условиях, подходящих для временной или стабильной активности транспозазы, тем самым интегрируя выбранный генетический элемент в геном клетки и создавая сконструированную клетку.

28. Способ по п. 27, дополнительно включающий: изолирование трансгенной клетки.

29. Способ по п. 27, причем выбранный генетический элемент является скринируемым или селектируемым маркером.

45 30. Способ по п. 27, причем выбранный генетический элемент кодирует терапевтический полипептид или ингибирующую нуклеиновую кислоту.

31. Способ по п. 27, причем выбранный генетический элемент кодирует антитело, рецептор Т-клетки (TCR) и химерный антигенный рецептор (CAR).

32. Способ по п. 31, причем выбранный генетический элемент кодирует CAR.

33. Способ по п. 27, причем клеткой является клетка человека.

34. Способ по п. 27, причем клеткой является стволовая клетка или индуцибельная плюрипотентная клетка (iPS).

5 35. Способ по п. 27, причем клеткой является клетка иммунной системы или ее предшественник.

36. Способ по п. 35, причем клеткой является клетка естественный киллер (NK), Т-клетка или предшественник NK клетки или Т-клетки.

10 37. Способ по п. 27, причем трансфицирование клетки включает использование полимера, полипептида или трансфекционного реактива на липидной основе.

38. Способ по п. 27, причем трансфицирование клетки включает электропорацию клетки.

39. Способ по п. 27, дополнительно включающий:

15 инкубацию клетки в условиях, подходящих для временной или стабильной активности транспозазы, тем самым интегрируя выбранный генетический элемент в геном клетки и создавая трансгенную клетку.

40. Способ обеспечения ответа Т-клеток у человека, включающий:

20 (а) трансфекцию клетки нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид по п. 1, и ДНК, кодирующей выбранный генетический элемент, фланкированный повторами транспозонов; и

(б) инкубацию клетки в условиях, подходящих для временной или стабильной активности транспозазы, тем самым интегрируя выбранный генетический элемент в геном клетки и создавая трансгенную клетку.

25 41. Способ по п. 40, причем выбранный генетический элемент кодирует антитело, рецептор Т-клетки (TCR) и химерный антигенный рецептор (CAR).

42. Способ по п. 40, причем клеткой является клетка естественный киллер (NK), Т-клетка или предшественник NK клетки или Т-клетки.

43. Полинуклеотидная молекула по п. 10, причем молекула содержит последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2.

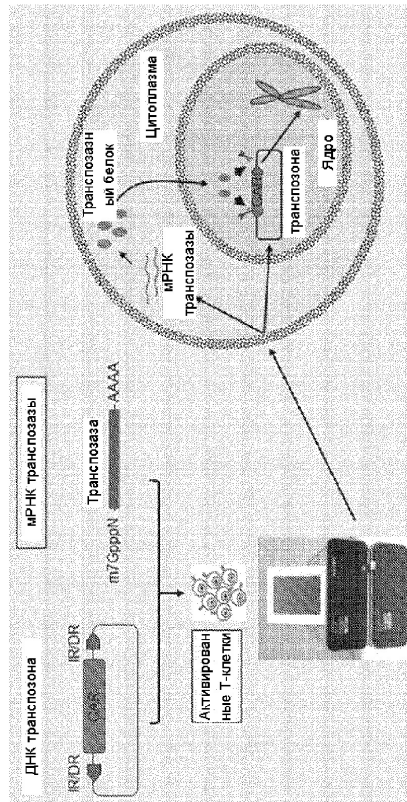
30 44. Полинуклеотидная молекула по п. 10, причем молекула содержит последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 4.

45. Полинуклеотидная молекула по п. 10, причем молекула содержит последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 4.

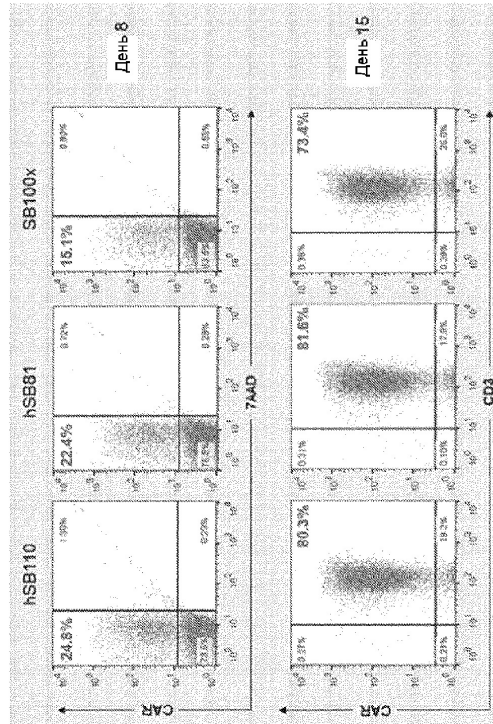
35 46. Полинуклеотидная молекула по п. 10, причем молекула содержит последовательность SEQ ID NO: 4.

40

45



Фиг. 1



Фиг. 2