



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 15/10 (2020.08); C12N 15/867 (2020.08); C07K 14/705 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2018136607, 19.03.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.03.2017

Дата регистрации:
13.09.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

19.03.2016 US 62/390,093;

08.07.2016 US 62/360,041;

03.03.2017 US 62/467,039

(43) Дата публикации заявки: 20.04.2020 Бюл. № 11

(45) Опубликовано: 13.09.2021 Бюл. № 26

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 19.10.2018

(86) Заявка РСТ:

US 2017/023112 (19.03.2017)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2017/165245 (28.09.2017)

Адрес для переписки:

119019, Москва, ул. Гоголевский бульвар, 11

(72) Автор(ы):

ФРОСТ Грегори Ян (US),

ОНУФФЕР Джеймс Джозеф (US),

ГУЙБИНГА Гьябе Х. (US),

КУНДУ Анирбан (KY)

(73) Патентообладатель(и):

ЭКСУМА БИОТЕК КОРП. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2016033331 A1, 03.03.2016. WO
2014186169 A1, 20.11.2014. EA 5573 B1,
28.04.2005.

(54) СПОСОБЫ И СОСТАВЫ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЛИМФОЦИТОВ И ИХ РЕГУЛИРУЕМОГО
УВЕЛИЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Описан способ генной модификации Т-клетки, включающий: взаимодействие Т-клетки ex vivo с некомпетентным репликативным рекомбинантным ретровирусом для образования реакционной смеси для трансдукции, причем некомпетентный репликативный рекомбинантный ретровирус содержит: а) один или несколько псевдотипирующих элементов на поверхности некомпетентного репликативного рекомбинантного ретровируса, причем один или

несколько псевдотипирующих элементов облегчают связывание с Т-клеткой и слияние с ней некомпетентного репликативного рекомбинантного ретровируса; и б) полинуклеотид, содержащий одну или несколько единиц транскрипции, причем каждая из одной или нескольких единиц транскрипции функционально связана с промотором, активным в Т-клетках, причем одна или несколько единиц транскрипции кодируют первый сконструированный сигнальный полипептид,

включающий первый рецептор химерного антигена, содержащий антигенспецифическую область для нацеливания; трансмембранный домен; и внутриклеточный активирующий домен, и с) элемент активации на поверхности некомпетентного репликативного рекомбинантного ретровируса, причем указанный элемент активации представляет собой мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD3 на поверхности покоящейся Т-клетки и активировать покоящуюся Т-клетку, и не кодируется полинуклеотидом в некомпетентном репликативном рекомбинантном

ретровирусе, причем Т-клетка взаимодействует *ex vivo* с некомпетентным репликативным рекомбинантным ретровирусом в интервале от 15 минут до 14 часов, причем способ осуществляется без предварительной стимуляции *ex vivo*, и при этом указанное взаимодействие облегчает мембранное слияние Т-клетки с некомпетентным репликативным рекомбинантным ретровирусом для получения генетически модифицированной Т-клетки. Кроме того, представлен рекомбинантный ретровирус. 2 н. и 21 з.п. ф-лы, 21 ил., 3 табл., 13 пр.

R U 2 7 5 5 0 5 9 C 2

R U 2 7 5 5 0 5 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12N 15/10 (2006.01)*C12N 15/867* (2006.01)*C07K 14/725* (2006.01)*C07K 14/705* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 15/10 (2020.08); C12N 15/867 (2020.08); C07K 14/705 (2020.08)(21)(22) Application: **2018136607, 19.03.2017**(24) Effective date for property rights:
19.03.2017Registration date:
13.09.2021

Priority:

(30) Convention priority:
19.03.2016 US 62/390,093;
08.07.2016 US 62/360,041;
03.03.2017 US 62/467,039(43) Application published: **20.04.2020 Bull. № 11**(45) Date of publication: **13.09.2021 Bull. № 26**(85) Commencement of national phase: **19.10.2018**(86) PCT application:
US 2017/023112 (19.03.2017)(87) PCT publication:
WO 2017/165245 (28.09.2017)Mail address:
119019, Moskva, ul. Gogolevskij bulvar, 11

(72) Inventor(s):

FROST Gregori Yan (US),
ONUFFER Dzhejms Dzhozef (US),
GUJBINGA Gyabe KH. (US),
KUNDU Anirban (KY)

(73) Proprietor(s):

EXUMA BIOTECH CORP. (US)**(54) METHODS AND FORMULATIONS FOR PRODUCING LYMPHOCYTES AND FOR CONTROLLED INCREASE THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology. Disclosed is a method for the T cell genetic modification including: the interaction of an ex vivo T cell with a replication-incompetent recombinant retrovirus to form a reaction mixture for transduction, with the replication-incompetent recombinant retrovirus comprising: a) one or more pseudotyped elements on the surface of a replication-incompetent recombinant retrovirus, with one or more pseudotyped elements facilitating the binding to and fusion with the T cell of a replication-incompetent recombinant retrovirus; and b) a

polynucleotide containing one or more transcription units, with each of which being functionally linked to a promoter active in T cells, with one or more transcription units encoding the first constructed signal polypeptide including the first chimeric antigen receptor containing an antigenic target area; a transmembrane domain; and an intracellular activation domain, and c) an activation element on the surface of a replication-incompetent recombinant retrovirus, with said activation element being a membranous polypeptide capable of binding to CD3 on the surface of the resting T cell and of activating the resting T cell and is not encoded by a

polynucleotide in a replication-incompetent recombinant retrovirus, with the T cell interacting ex vivo with a replication-incompetent recombinant retrovirus within an interval of 15 minutes to 14 hours. Furthermore, the method is carried out without pre-stimulation ex vivo with said interaction facilitating the membrane fusion

of the T cell with a replication-incompetent recombinant retrovirus for the production of a genetically modified T cell. Along with disclosed is a recombinant retrovirus.
EFFECT: invention enables T cell genetic modification.
23 cl, 21 dwg, 3 tbl, 13 ex

R U 2 7 5 5 0 5 9 C 2

R U 2 7 5 5 0 5 9 C 2

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США №62/390093, поданной 19 марта 2016 года; предварительной заявке на патент США №62/360041, поданной 8 июля 2016 года; и предварительной заявке на патент США №62/467039, поданной 3 марта 2017 года. Содержание этих заявок полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка включена посредством ссылки на материал электронного Перечня последовательностей, поданного одновременно вместе с ней. Материалы в электронном Перечне последовательностей представлены в виде текстового (.txt) файла под названием «F1_001_Sequence_listing.txt», составленного 16 марта 2017 года, размер файла - 230 КБ, и содержание которого полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области иммунологии или, более конкретно, к генетической модификации Т-лимфоцитов или других иммунных клеток, а также к способам получения ретровирусов и контролю экспрессии генов.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Лимфоциты, выделенные у испытуемого (например, пациента), могут быть активированы *in vitro* и генетически модифицированы для целей экспрессии синтетических белков, которые позволяют изменить способ взаимодействия с другими клетками и средами на основе введенных генетических программ. Примером такого синтетического белка является химерный антигенный рецептор (CAR). Один CAR, используемый в настоящее время, представляет собой слияние внеклеточного домена распознавания (например, антиген-связывающего домена), трансмембранного домена и одного или нескольких внутриклеточных сигнальных доменов, закодированных некомпетентным репликативным ретровирусом.

Несмотря на то, что ретровирусы показали свою эффективность в инфицировании неделящихся клеток, покоящиеся лимфоциты CD4 и CD8 невосприимчивы к генетической трансдукции, выполняемой по этим векторам. Для преодоления этой трудности, такие клетки обычно активируют *in vitro* с использованием реагентов стимуляции до того, как сформируется генетическая модификация с вектором гена CAR. После выполнения стимуляции и трансдукции, генетически модифицированные клетки увеличивают *in vitro*, а затем повторно вводят пациенту с уменьшенным числом лимфоцитов. При взаимодействии антигена *in vivo* внутриклеточная сигнальная часть CAR может инициировать связанный с активацией ответ в иммунной клетке и высвобождение цитолитических молекул, что приводит к гибели опухолевых клеток.

Такие современные методы требуют обширной манипуляции и производства пролиферирующих Т-клеток вне организма перед их повторным введением пациенту, а также проведение противолимфомной химиотерапии для освобождения цитокинов и истощения конкурирующих рецепторов, которые облегчают процесс приживания Т-клеток. Подобная CAR-терапия CAR в дальнейшем не может контролироваться в отношении скорости распространения *in vivo* после введения в организм и безопасно направлена на мишени, которые также экспрессируются вне опухоли. В результате CAR-терапии сегодня обычно вводят из увеличенных *ex vivo* клеток с 12 до 28-ой день с использованием доз от 1×10^5 до 1×10^8 клеток/кг и направлены на клетки-мишени, например опухолевые клетки-мишени, для которых обычно приемлема внеопухолевая избирательная токсичность. Такой относительно продолжительный период увеличения *ex vivo* приводит к проблемам жизнеспособности и стерильности клеток, а также

идентификации образца в дополнение к задачам масштабирования. Таким образом, существуют значительные потребности в более безопасной, более эффективной масштабируемой терапии Т-клеток или НК-клеток.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 В одном аспекте, представленный в настоящем документе способ представляет собой способ генной модификации и увеличения лимфоцитов у испытуемого, включающий: взаимодействие покоящихся Т-клеток и/или НК-клеток пациента *ex vivo*, без необходимости предварительной стимуляции *ex vivo* с рекомбинантными ретровирусами, включающими:

10 псевдотипирующий элемент на ее поверхности, который способен связываться с Т-клеткой и/или НК-клеткой и облегчает мембранное слияние с ним рекомбинантного ретровируса; и

полинуклеотид, содержащий одну или несколько единиц транскрипции, функционально связанных с промотором, активным в Т-клетках и/или НК-клетках, 15 причем одна или несколько единиц транскрипции кодируют первый сконструированный сигнальный полипептид, регулируемый контрольным элементом *in vivo*, причем указанный первый сконструированный сигнальный полипептид включает лимфопролиферативный элемент,

при этом указанное взаимодействие облегчает трансдукцию по меньшей мере 20 некоторых из покоящихся Т-клеток и/или НК-клеток посредством рекомбинантных ретровирусов, в результате чего получают генно-модифицированные Т-клетки и/или НК-клетки;

введение генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток пациенту; и 25 соединение генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток *in vivo*, которое связывает контрольный элемент *in vivo*, что позволяет повлиять на и/или вызвать экспрессию первого сконструированного сигнального полипептида и способствовать увеличению, приживлению и/или жизнестойкости лимфоцитов *in vivo*, тем самым генетически модифицируя и увеличивая лимфоциты у пациента. В иллюстративных вариантах осуществления трансдукция проводится без стимуляции *ex vivo*.

30 В вышеуказанном аспекте и любом из аспектов способа генетической модификации и увеличения лимфоцитов или осуществления клеточной терапии, представленной в настоящем изобретении, если не указано в самом широком аспекте, в определенных вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно содержит единицу транскрипции, которая кодирует второй сконструированный сигнальный полипептид, 35 содержащий первый рецептор химерного антигена, обладающего антигенспецифической областью для нацеливания (ASTR), трансмембранный домен и внутриклеточный активирующий домен.

В другом аспекте, представленный в настоящем документе способ представляет собой способ осуществления адоптивной клеточной терапии пациента, включающий:

40 забор крови у пациента;

взаимодействие покоящихся Т-клеток и/или НК-клеток из крови пациента *ex vivo* с рекомбинантными ретровирусами, при котором рекомбинантные ретровирусы содержат: псевдотипирующий элемент на их поверхности, который способен связываться с Т-клеткой и/или НК-клеткой и облегчает мембранное слияние с ним рекомбинантных 45 ретровирусов; и

полинуклеотид, содержащий одну или несколько единиц транскрипции, функционально связанных с промотором, активным в Т-клетках и/или НК-клетках, причем одна или несколько единиц транскрипции кодируют первый сконструированный

сигнальный полипептид, включающий лимфопролиферативный элемент, экспрессия которого регулируется контрольным элементом *in vivo*, и второй сконструированный сигнальный полипептид, включающий рецептор химерного антигена, содержащий антигенспецифическую область для нацеливания (ASTR), трансмембранный домен и

внутриклеточный активирующий домен, причем указанное взаимодействие приводит к тому, что по меньшей мере некоторые из покоящихся Т-клеток и/или НК-клеток становятся генно-модифицированными; и повторное введение генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток пациенту, при этом экспрессия, приживание и/или жизнестойкость генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток происходит *in vivo* в организме пациента, причем способ, осуществляемый между сбором крови и повторным введением генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток, проводят не позднее чем через 24 часа, тем самым обеспечивая адоптивную клеточную терапию пациента.

В другом аспекте, представленный в настоящем документе способ представляет собой способ осуществления адоптивной клеточной терапии пациента, включающий:

забор крови у любого пациента;

выделение моноклеарных клеток периферической крови (РВМС), содержащих покоящиеся Т-клетки и/или покоящиеся НК-клетки;

взаимодействие покоящихся Т-клеток и/или покоящихся НК-клеток пациента *ex vivo* с рекомбинантными ретровирусами, причем рекомбинантные ретровирусы содержат псевдотипирующий элемент на своей поверхности, который способен связывать покоящуюся Т-клетку и/или НК-клетку и облегчает слияние мембран рекомбинантного ретровируса, при этом указанное взаимодействие облегчает трансдукцию покоящихся Т-клеток и/или НК-клеток посредством рекомбинантных ретровирусов, тем самым производя генно-модифицированные Т-клетки и/или НК-клетки; и

повторное введение генно-модифицированных клеток пациенту в течение 24 часов после сбора крови у пациента, тем самым выполняя ему адоптивную клеточную терапию.

В другом аспекте, представленный в настоящем документе способ представляет собой способ трансдукции покоящихся лимфоцитов пациента, включающий взаимодействие покоящихся Т-клеток и/или покоящихся НК-клеток пациента *ex vivo* с рекомбинантными ретровирусами, причем рекомбинантные ретровирусы содержат псевдотипирующий элемент на своей поверхности, который способен связывать покоящуюся Т-клетку и/или НК-клетку и облегчает слияние мембран рекомбинантного ретровируса, при этом указанное взаимодействие облегчает трансдукцию покоящихся Т-клеток и/или НК-клеток посредством рекомбинантных ретровирусов, тем самым производя генно-модифицированные Т-клетки и/или НК-клетки; В иллюстративном представлении данного аспекта по меньшей мере 10, 20 или 25% покоящихся Т-клеток и/или НК-клеток или 10-70% или 20-50% Т-клеток и/или НК-клеток трансдуцируются в результате этого процесса.

В другом аспекте, представленный в настоящем документе способ представляет собой способ трансдукции покоящихся Т-клеток и/или покоящихся НК-клеток из выделенной крови, включающий:

забор крови у любого пациента;

выделение моноклеарных клеток периферической крови (РВМС), содержащих покоящиеся Т-клетки и/или покоящиеся НК-клетки;

взаимодействие покоящихся Т-клеток и/или покоящихся НК-клеток пациента *ex vivo* с рекомбинантными ретровирусами, причем рекомбинантные ретровирусы содержат псевдотипирующий элемент на своей поверхности, который способен связывать

покоящуюся Т-клетку и/или покоящуюся НК-клетку и облегчает слияние мембран рекомбинантного ретровируса, при этом указанное взаимодействие облегчает трансдукцию по меньшей мере 5% покоящихся Т-клеток и/или покоящихся НК-клеток посредством рекомбинантных ретровирусов, трансдуцируя тем самым покоящиеся Т-клетки и/или НК-клетки.

В одном аспекте, представленном здесь, описан рекомбинантный ретровирус, содержащий:

один или несколько элементов псевдотипирования на своей поверхности, который способен связываться с Т-клеткой и/или НК-клеткой и облегчает мембранное слияние с ним рекомбинантного ретровируса; и

полинуклеотид, содержащий одну или несколько транскрипционных единиц, функционально связанных с промотором, активным в Т-клетках и/или НК-клетках, причем одна или несколько транскрипционных единиц кодируют первый сконструированный сигнальный полипептид, содержащий химерный рецептор антигена, включающий антигенспецифическую область для нацеливания, трансмембранный домен, а также внутриклеточный активирующий домен и первый сконструированный сигнальный полипептид, содержащий лимфопролиферативный элемент; при этом экспрессия первого сконструированного сигнального полипептида и/или второго сконструированного сигнального полипептида регулируется контрольным элементом *in vivo*; и

элемент активации на его поверхности, причем элемент активации способен связываться с Т-клеткой и/или НК-клеткой и не кодируется полинуклеотидом в рекомбинантном ретровирусе.

В другом аспекте, представленном здесь, описан рекомбинантный ретровирус, содержащий:

элемент псевдотипирования на ее поверхности, который способен связываться с Т-клеткой и/или НК-клеткой и облегчает мембранное слияние с ним рекомбинантного ретровируса. при этом псевдотипирующий элемент содержит варианты делеции цитоплазматической области полипептида вируса кори F и/или полипептида вируса кори H.

полинуклеотид, содержащий одну или несколько транскрипционных единиц, функционально связанных с промотором, активным в Т-клетках и/или НК-клетках, причем одна или несколько транскрипционных единиц кодируют первый сконструированный сигнальный полипептид, содержащий химерный антигенный рецептор, включающий антигенспецифическую область нацеливания, трансмембранный домен и внутриклеточный активирующий домен, а также второй сконструированный сигнальный полипептид, содержащий конститутивно активный мутаген рецептора IL-7; при этом экспрессия мутагена рецептора IL-7 регулируется рибопереключателем, который связывает аналог нуклеозида противовирусного препарата; и

полипептид, способный связываться с CD3, и полипептид, способный связываться с CD28, причем указанные полипептиды наблюдаются на поверхности рекомбинантного ретровируса и способны связываться с Т-клеткой и/или НК-клеткой, и указанные полипептиды не кодируются полинуклеотидом в рекомбинантном ретровирусе. В иллюстративных вариантах осуществления этого аспекта связывание аналога нуклеозида противовирусного препарата с рибопереключателем увеличивает экспрессию мутагена рецептора IL-7.

В любом из предложенных здесь способов или аспектах состава, если они еще не перечислены в самом широком аспекте, рекомбинантный ретровирус или ретровирусы

содержат или дополнительно содержат элемент активации на своей поверхности, который способен активировать покоящуюся Т-клетку и/или покоящуюся НК-клетку.

В любом из перечисленных здесь способов или составов, описывающих Т-клетку и/или НК-клетку, или покоящуюся Т-клетку/НК-клетку, в некоторых иллюстративных вариантах осуществления, такая клетка представляет собой Т-клетку.

Как правило, рекомбинантный ретровирус в любом из предложенных здесь способах и составах является дефектной репликацией. То есть вирус не может реплицироваться. В иллюстративных вариантах осуществления ретровирусом является лентивирус, такой как ВИЧ-лентивирус с дефективной репликацией.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из аспектов способа генетической модификации и увеличения лимфоцитов или осуществления адаптивной клеточной терапии, описанного в настоящем документе, или аналогичных способов 10-75%, 10-70%, 10-60% 10-50%, 10-25%, 20-75%, или 20-50%, или по меньшей мере 10%, 20% или 25% покоящихся Т-клеток, и 0-75% НК-клеток трансдуцируются. В других вариантах осуществления 5-80%, 10-80%, 10-70%, 10-60%, 10-50%, 10-25%, 10-20% или 20-50% покоящихся НК-клеток трансдуцируются.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из аспектов способа генетической модификации и увеличения лимфоцитов или осуществления адаптивной клеточной терапии, описанного в настоящем документе, или аналогичных способов и любых составов, указанных здесь, если явно не указано другое в самом широком аспекте, экспрессия указанного второго спроектированного сигнального полипептида регулируется с помощью контрольного элемента управления *in vivo*.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из аспектов способа генетической модификации и увеличения лимфоцитов или осуществления адаптивной клеточной терапии, описанного в настоящем документе, или аналогичных способов, если явно не указано другое в самом широком аспекте данного способа, взаимодействие может осуществляться в течение 15, 30 или 45 минут / 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 часов на нижней границе диапазона, а также в течение 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36, 48 и 72 часов на верхней границе диапазона. Например, в иллюстративных вариантах осуществления взаимодействие осуществляют в течение 2-24 часов, 4-12 часов или 4-8 часов.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из аспектов способа генетической модификации и увеличения лимфоцитов или осуществления адаптивной клеточной терапии, описанного в настоящем документе, или аналогичных способов, если явно не указано другое в самом широком аспекте, данный способ может дополнительно включать соединение генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток *in vivo* с составом, которое связывает контрольный элемент *in vivo* что позволяет повлиять на экспрессию первого сконструированного сигнального полипептида и, в некоторых случаях, второго сконструированного сигнального полипептида, и способствует увеличению, приживлению и/или жизнестойкости лимфоцитов *in vivo*.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из аспектов способа генетической модификации и увеличения лимфоцитов или осуществления адаптивной клеточной терапии, описанного в настоящем документе, или аналогичных способов, если явно не указано другое в самом широком аспекте, генно-модифицированные Т-клетки и/или НК-клетки подвергаются 8, 7, 6, 5, 4, 3 или менее клеточным делениям *ex vivo* до их введения или повторного введения пациенту.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из аспектов способа генетической модификации и увеличения лимфоцитов или осуществления клеточной терапии, описанного в настоящем документе, или аналогичных способов, если явно не

указано другое в самом широком аспекте, увеличение, приживление и/или жизнестойкость генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток *in vivo* зависит либо от наличия, либо отсутствия соединения, которое связывает контрольный элемент *in vivo*, а в других иллюстративных вариантах осуществления зависит только от наличия соединения, которое связывает контрольный элемент *in vivo*.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из аспектов способа генетической модификации и увеличения лимфоцитов или осуществления адоптивной клеточной терапии, описанного в настоящем документе, или аналогичных способов, если явно не указано другое в самом широком аспекте, пациент не принимает противолимфомное средство на протяжении 7, 14 или 21 дней выполнения взаимодействия, во время взаимодействия и/или на протяжении 7, 14 или 21 дней после того, как модифицированные Т-клетки и/или НК-клетки были введены пациенту. В других вариантах осуществления пациент не принимает противолимфомное средство во время выполнения взаимодействия.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из аспектов способа генетической модификации и увеличения лимфоцитов или осуществления адоптивной клеточной терапии, описанного в настоящем документе, или аналогичных способов, если явно не указано другое в самом широком аспекте, покоящиеся Т-клетки и/или покоящиеся НК-клетки взаимодействуют с рекомбинантными ретровирусами в интервале от 15 минут до 12 часов.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из аспектов способа генетической модификации и увеличения лимфоцитов или осуществления адоптивной клеточной терапии, описанного в настоящем документе, или аналогичных способов, если явно не указано другое в самом широком аспекте, способ дополнительно включает этап отделения рекомбинантных ретровирусов от Т-клеток и/или НК-клеток после взаимодействия, но перед введением. В иллюстративных вариантах осуществления любого из аспектов способа генетической модификации и увеличения лимфоцитов или осуществления адоптивной клеточной терапии, описанного в настоящем документе, или аналогичных способов, если явно не указано другое в самом широком аспекте, упомянутый этап воздействия включает введение дозы соединения пациенту до или во время взаимодействия и/или после введения генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток пациенту.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из аспектов способа генетической модификации и увеличения лимфоцитов или осуществления адоптивной клеточной терапии, описанного в настоящем документе, или аналогичных способов, если явно не указано другое в самом широком аспекте, способ включает забор крови, содержащей Т-клетки и/или НК-клетки, у пациента перед взаимодействием Т-клеток и/или НК-клеток *ex vivo* с рекомбинантными ретровирусами и при котором введение выполняется повторно. Например, у пациента отбирают 20-250 мл крови.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из аспектов способа генетической модификации и увеличения лимфоцитов или осуществления адоптивной клеточной терапии, описанного в настоящем документе, или аналогичных способов, если явно не указано другое в самом широком аспекте, период времени между забором крови у пациента и повторным введением ему модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток равен максимум 8, 12, 24 или 48 часам.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из аспектов способа генетической модификации и увеличения лимфоцитов или осуществления адоптивной клеточной терапии, описанного в настоящем документе, или аналогичных способов,

если явно не указано другое в самом широком аспекте, период времени между забором крови у пациента и повторным введением ему модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток равен 4-8 часам на нижней границе диапазона и 12, 24, 36 или 48 часам на верхней границе диапазона.

5 В иллюстративных вариантах осуществления любого из аспектов способа генетической модификации и увеличения лимфоцитов или осуществления адоптивной клеточной терапии, описанного в настоящем документе, или аналогичных способов, если явно не указано другое в самом широком аспекте, все этапы после сбора крови и до повторного введения крови выполняются в закрытой системе, в которой человек
10 управляет закрытой системой на протяжении всего процесса обработки. В другом варианте осуществления все стадии после забора крови и до повторного введения крови осуществляются в закрытой системе, которая остается в одном помещении с пациентом.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из предложенных здесь способов и составов, которые включают один или несколько сконструированных сигнальных
15 полипептидов, если явно не указано другое в самом широком аспекте, один из сконструированных сигнальных полипептидов дополнительно содержит антигенспецифическую область для нацеливания (ASTR) и трансмембранный домен, связывающий ASTR с лимфопролиферативным элементом. ASTR данного сконструированного сигнального полипептида способна связываться с первым
20 опухолевым антигеном, а ASTR второго сконструированного сигнального полипептида, при ее наличии, способна связываться со вторым опухолевым антигеном. В иллюстративных вариантах осуществления первый сконструированный сигнальный полипептид и/или второй сконструированный сигнальный полипептид дополнительно содержит костимулирующий домен. Кроме того, первый сконструированный сигнальный
25 полипептид и/или второй сконструированный сигнальный полипептид дополнительно содержит стебель. Также первый сконструированный сигнальный полипептид дополнительно содержит внутриклеточный активирующий домен. Внутриклеточный активирующий домен на первом сконструированном сигнальном полипептиде и/или втором сконструированном сигнальном полипептиде можно получить из дзета-цепи
30 CD3.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из предложенных здесь способов и составов, которые включают лимфопролиферативный элемент, лимфопролиферативный элемент содержит мотив выживаемости Т-клеток. Мотив выживаемости Т-клеток может включать весь или функциональный фрагмент рецептора
35 IL-7, рецептор IL-15 или CD28. В других вариантах осуществления лимфопролиферативный элемент содержит полипептид цитокина/рецептора цитокина или его фрагмент, содержащий сигнальный домен. Например, лимфопролиферативный элемент содержит полипептид интерлейкина, ковалентно связанный с родственным ему полипептидом интерлейкина через линкер. В альтернативном варианте
40 осуществления лимфопролиферативный элемент может представлять собой сигнальный внутриклеточный сигнальный домен рецептора IL-7, внутриклеточный сигнальный домен рецептора IL-12, внутриклеточный сигнальный домен IL-23, внутриклеточный сигнальный домен IL-27, внутриклеточный сигнальный домен рецептора IL-15, внутриклеточный сигнальный домен рецептора IL-21 или внутриклеточный сигнальный
45 домен рецептора-ловушки трансформирующего фактора роста β (TGF β). В других иллюстративных вариантах осуществления лимфопролиферативный элемент является конститутивно активным. Кроме того, лимфопролиферативный элемент может включать конститутивно активный мутированный рецептор IL-7 или его конститутивно активный

фрагмент, который может дополнительно включать конститутивно активный мутированный рецептор IL-7 или его конститутивно активный фрагмент.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из предложенных здесь способов и составов, которые включают рекомбинантный ретровирус или ретровирусы, если явно не указано другое в самом широком аспекте, рекомбинантные ретровирусы содержат на своей поверхности элемент активации, включающий:

мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD3; и/или

мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD28.

Кроме того, мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD3, может представлять собой полипептид, способный связываться с CD3, который слился с гетерологичной последовательностью присоединения ГФИ-якоря, а мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD28, может представлять собой полипептид, способный связываться с CD28, который слился с гетерологичной последовательностью присоединения ГФИ-якоря. В некоторых вариантах осуществления мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD28, представляет собой CD80, CD86 или его функциональный фрагмент, способный индуцировать CD28-зависимую активацию Akt, например, внеклеточного домена CD80.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из предложенных здесь способов и составов, которые включают рекомбинантный ретровирус, мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD3, может представлять собой анти-CD3 scFv, связанный с последовательностью присоединения ГФИ-якоря CD14, а мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD28, может представлять собой CD80 или его внеклеточный домен, способный связываться с последовательностью присоединения ГФИ-якоря CD16B. В иллюстративных вариантах осуществления любого из предложенных здесь способов и составов, которые включают рекомбинантный ретровирус, рекомбинантные ретровирусы могут содержать на своей поверхности анти-CD3 scFv, связанный с последовательностью присоединения ГФИ-якоря CD14, CD80 или его внеклеточным доменом, связанным с последовательностью присоединения ГФИ-якоря CD16B, и слитый полипептид IL-7 или его активный фрагмент, а также DAF-фактор, содержащий последовательность присоединения ГФИ-якоря. В иллюстративных вариантах осуществления любого из предложенных здесь способов и составов, которые включают рекомбинантный ретровирус, IL-7 или его активный фрагмент, а также слияние DAF, анти-CD3 scFV и CD80 или его внеклеточный фрагмент, каждый содержит сигнальную последовательность DAF-фактора.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из предложенных здесь способов и составов, которые включают рекомбинантный ретровирус или ретровирусы, если явно не указано другое в самом широком аспекте, рекомбинантные ретровирусы могут содержать на своей поверхности мембраносвязанный цитокин. Мембраносвязанный цитокином может выступать IL-7, IL-15 или его активный фрагмент. В других вариантах осуществления мембраносвязанный цитокином является слитый полипептид IL-7 или его активный фрагмент и DAF-фактор. Например, слитый полипептид может содержать сигнальную последовательность DAF-фактора (нуклеотиды 1-31 SEQ ID NO: 107), IL-7 без его сигнальной последовательности (нуклеотиды 32-187 SEQ ID NO: 107) и фрагмент DAF-фактора, который включает последовательность присоединения его ГФИ-якоря (нуклеотиды 188-527 ПОСЛ №: 107).

В иллюстративных вариантах осуществления любого из аспектов предложенных здесь способов и составов элемент псевдотипирования содержит один или несколько гетерологичных оболочечных белков. В других примерах псевдотипирующий элемент

может включать один или несколько вирусных полипептидов, распознаваемых Т-клетками. Один или несколько псевдотипирующих элементов могут содержать полипептид вируса кори F, полипептид вируса кори H и/или его фрагмент. Один или несколько псевдотипирующих элементов могут представлять собой варианты делеции цитоплазматического домена полипептида вируса кори F и/или полипептида вируса кори H.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из предложенных здесь способов и составов, которые включают контрольный элемент *in vivo*, контрольным элементом *in vivo* является лимфопролиферативный элемент, в котором лимфопролифератив неактивен или менее активен при стимулировании пролиферации Т-клеток и/или НК-клеток в отсутствие соединения, и при этом соединение является молекулярным "наставником", который связывает лимфопролиферативный элемент и индуцирует его активность.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из предложенных здесь способов и составов, которые включают контрольный элемент *in vivo*, контрольным элементом *in vivo* может выступать полинуклеотид, включающий рибопереключател.

Рибопереключател может быть способен связывать нуклеозидный аналог, а соединение, связывающее контрольный элемент *in vivo*, представляет собой нуклеозидный аналог. Нуклеозидным аналогом может выступать противовирусное вещество.

Противовирусным веществом может выступать ацикловир или пенцикловир.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из предложенных здесь способов и составов, которые содержат сконструированный сигнальный полипептид, включающий ASTR, ASTR одного или обоих спроектированных сигнальных полипептидов может связываться с опухолассоциированным антигеном. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления антигенспецифическая область для нацеливания второго сконструированного полипептида представляет собой ограниченную антигенспецифическую область нацеливания на микроокружение.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из предложенных здесь способов и составов, которые включают рекомбинантный ретровирус или ретровирусы, если явно не указано другое в самом широком аспекте, рекомбинантные ретровирусы могут кодировать домен распознавания утвержденного биопрепарата моноклонального антитела. В некоторых вариантах осуществления домен распознавания выражается в том же транскрипте, что и рецептор химерного антигена, а домен распознавания отделен от рецептора химерного антигена посредством пропускания рибосом и/или сигнала расщепления. Процессом пропускания рибосом и/или сигнала расщепления может выступать 2A-1. Домен распознавания может включать полипептид, распознаваемый антителом, которое определяет РЭФР или его эпитоп. Доменом распознавания может быть мутаген РЭФР, который распознается антителом к РЭФР и экспрессируется на поверхности трансдуцированных Т-клеток и/или НК-клеток в качестве другого механизма управления, представленного в настоящем документе. В сходных вариантах осуществления домен распознавания может включать полипептид, распознаваемый антителом, которое определяет РЭФР или его эпитоп.

В любом из предложенных здесь способов и составов, которые содержат лимфопролиферативный элемент, лимфопролиферативным элементом может быть miPHK или shPHK, который стимулирует путь STAT5 или ингибирует путь SOCS. Например, указанная miPHK или shPHK представляет собой miPHK, которая связывается с нуклеиновой кислотой, кодирующей белок, выбранный из группы, состоящей из: ABCG1, SOCS, TGFbR2, SMAD2, cBCL и PD1. В иллюстративных вариантах

осуществления любого из рекомбинантных ретровирусов или трансдуцированных клеток, представленных здесь, или способов, включающих в себя то же самое, такие рекомбинантные ретровирусы или трансдуцированные клетки могут кодировать miРНК или shРНК, например, внутри интрона; в некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3 или 4 вариант осуществления описывают связь нуклеиновых кислот, кодирующих один или несколько из следующих целевых эндогенных Т-клеточных экспрессированных генов: PD-1; CTLA4; TCR альфа; TCR бета; CD3 дзета; SOCS; SMAD2; miR-155; ИФН гамма; cCBL; TRAIL2; PP2A; или ABCG1. Например, в одном варианте осуществления комбинация следующих miРНК может быть включена в геном рекомбинантного ретровируса или трансдуцированной клетки: TCR альфа, CD3 дзета, ИФН гамма и PD-1; а в другом варианте осуществления - SOCS 1, ИФН гамма, TCR альфа и CD3 дзета.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из предложенных здесь способов и составов рекомбинантные ретровирусы, клетки млекопитающих и/или упаковывающие клетки могут содержать полипептид гена V_{рх}. Полипептидом гена V_{рх} может быть, например, слитый полипептид, а в некоторых примерах, особенно в упаковывающих клетках, мембраносвязанный полипептид гена V_{рх}.

В любом из предложенных здесь способов или составах один или несколько элементов псевдотипирования могут включать оболочечный белок вируса везикулярного стоматита (VSV-G), оболочечный белок эндогенного вируса кошки (RD114), оболочечный онкоретровирусный амфотропный белок или оболочечный онкоретровирусный экотропный белок или их функциональные фрагменты.

Приведенное здесь в другом аспекте описание представляет генно-модифицированную Т-клетку и/или NK-клетку, содержащую:

первый сконструированный сигнальный полипептид, содержащий

лимфопролиферативный элемент; и

второй сконструированный сигнальный полипептид, включающий химерный антигенный рецептор, содержащий антигенспецифическую область нацеливания (ASTR), трансмембранный домен и внутриклеточный активирующий домен.

В любом из способов, представленных здесь, которые включают упаковывающую клетку млекопитающего, в том числе систему упаковки ретровирусных препаратов и аспекта способа получения рекомбинантного ретровируса, представленного здесь, упакованный геном РНК кодируется полинуклеотидом, функционально связанным с промотором, при этом указанный промотор либо конститутивно активный, либо индуцируемый первым трансаактиватором или вторым трансаактиватором. Упакованный геном РНК может кодироваться полинуклеотидом, функционально связанным с промотором, при этом указанный промотор индуцируемый вторым трансаактиватором. Промотор, используемый здесь для стимулирования экспрессии первого и/или второго сконструированного сигнального полипептида, обычно активен в клетках-мишенях, например лимфоцитах, ЛПК, Т-клетках и/или NK-клетках, но в иллюстративных вариантах осуществления он не активен в упаковывающей клеточной линии. Второй трансаактиватор способен регулировать экспрессию элемента активации, способного связываться с и активировать клетку-мишень. В любом из способов, представленных здесь, которые включают упаковывающую клетку млекопитающего, в том числе систему упаковки ретровирусных препаратов и аспекта способа получения рекомбинантного ретровируса, упакованный геном РНК в некоторых вариантах осуществления, экспрессия упакованного генома РНК может регулироваться вторым трансаактиватором.

Кроме того, упакованный геном РНК дополнительно может содержать 5'-3' элементы: 5' длинный концевой повтор или его активный фрагмент;

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент упаковки ретровирусной РНК, действующей в цис-положении;

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый целевой полипептид; промотор, активный в клетке-мишени; и

5 3' длинный концевой повтор или его активный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первый целевой полипептид, находится в обратном направлении от РНК, кодирующей ретровирусные компоненты для целей упаковки и сборки.

В любом из способов, представленных здесь, которые включают упаковывающую 10 клетку млекопитающего, в том числе систему упаковки ретровирусных препаратов и аспекта способа получения рекомбинантного ретровируса, например, первый целевой полипептид содержит первый сконструированный сигнальный полипептид, при этом указанный первый сконструированный сигнальный полипептид содержит лимфопролиферативный элемент. Упакованный геном РНК дополнительно может 15 дополнительно содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй целевой полипептид. Второй целевой полипептид может содержать второй сконструированный сигнальный полипептид, включающий химерный антигенный рецептор, содержащий:

первую антигенспецифическую область нацеливания;

20 первый трансмембранный домен; и

первый внутриклеточный активирующий домен.

В любом из способов, представленных здесь, которые включают упаковывающую клетку млекопитающего, в том числе систему упаковки ретровирусных препаратов и аспекта способа получения рекомбинантного ретровируса, например, клетки

25 млекопитающего, упаковывающая клетка может включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ген *V_{pr}*, например, на второй или в некоторых случаях третьей транскрипционной единице, или на дополнительной транскрипционной единице, которая функционально связана с первым индуцируемым промотором. Клеткой млекопитающих, которая может быть упаковывающей клеткой, является клетка 293.

30 В любом из способов, представленных здесь, которые включают упаковывающую клетку млекопитающего, в том числе систему упаковки ретровирусных препаратов и аспекта способа получения рекомбинантного ретровируса, первый лиганд может быть рапамицином, а второй лиганд может быть тетрациклином или доксорубицином, или первым лигандом может быть тетрациклин или доксорубицин, а второй лиганд может 35 быть рапамицином.

В некоторых аспектах, представленных здесь, описывается клетка, которая была трансдуцирована любым из рекомбинантных ретровирусов, представленными здесь. Клеткой может быть, например, лимфоцит, такой как Т-клетка или НК-клетка. Клетка в иллюстративных вариантах осуществления изобретения представляет собой клетку 40 человека.

В одном аспекте, представленном здесь, способ представляет собой способ увеличения модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток у пациента, причем указанный способ включает:

а.) взаимодействие изолированных покоящихся Т-клеток и/или покоящихся НК-клеток, полученных у указанного пациента, с рекомбинантным ретровирусом любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем изобретении;

б.) введение генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток пациенту; и

с.) обеспечение эффективного количества ацикловира, пролекарства ацикловира,

пенцикловира или пролекарства пенцикловира у указанного пациента, при этом указанные модифицированные Т-клетки и/или НК-клетки размножаются у указанного субъекта при введении ацикловира, пролекарства ацикловира, пенцикловира или пролекарства пенцикловира, тем самым увеличивая модифицированные Т-клетки и/или НК-клетки у пациента.

В другом аспекте, представленном здесь, способ представляет собой способ увеличения, приживления и/или жизнестойкости модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток у пациента, причем указанный способ включает:

а.) взаимодействие изолированных покоящихся Т-клеток и/или покоящихся НК-клеток, полученных у указанного пациента, с рекомбинантным ретровирусом любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем изобретении;

б.) введение генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток пациенту; и

с.) введение эффективного количества ацикловира, пролекарства ацикловира, пенцикловира или пролекарства пенцикловира у указанного пациента для увеличения модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток у пациента, при этом указанные модифицированные Т-клетки и/или НК-клетки размножаются у указанного субъекта при введении ацикловира, пролекарства ацикловира, пенцикловира или пролекарства пенцикловира, тем самым увеличивая модифицированные ЛПК у пациента; и

д.) прекращение введения ацикловира, пролекарства ацикловира, пенцикловира или пролекарства пенцикловира, при этом указанные модифицированные Т-клетки и/или НК-клетки прекращают размножаться у указанного субъекта при прекращении введения ацикловира, пролекарства ацикловира, пенцикловира или пролекарства пенцикловира, тем самым контролируя увеличение, приживление и/или постоянство модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток у пациента.

В одном аспекте, представленном здесь, способ представляет собой метод лечения рака у пациента, причем указанный способ включает:

взаимодействие изолированных покоящихся Т-клеток и/или покоящихся НК-клеток, полученных у указанного пациента, с рекомбинантным вектором в соответствии с любым из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем изобретении;

введение генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток пациенту; и

введение эффективного количества ацикловира, пролекарства ацикловира, пенцикловира или пролекарства пенцикловира у указанного пациента для увеличения модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток у пациента, при этом указанные модифицированные Т-клетки и/или НК-клетки размножаются у указанного субъекта при введении ацикловира, пролекарства ацикловира, пенцикловира или пролекарства пенцикловира, и при этом химерный антиген-рецептор в указанной модифицированной Т-клетке и/или НК-клетках связывает раковые клетки у указанного пациента, тем самым излечивая рак у пациента.

В другом аспекте, представленном здесь, описана трансдуцированная Т-клетка и/или НК-клетка, содержащая рекомбинантный полинуклеотид, включая одну или несколько транскрипционных единиц, функционально связанных с промотором, активным в Т-клетках и/или НК-клетках, причем одна или несколько транскрипционных единиц кодируют первый сконструированный сигнальный полипептид, регулируемый с помощью контрольного элемента *in vivo*, причем указанный первый сконструированный сигнальный полипептид содержит конститутивно активный мутант рецептора IL-7, а также контрольный элемент *in vivo* способен связывать и/или конструировать и/или сконфигурировать рецептор для связывания с соединением *in vivo*.

В другом аспекте, представленном здесь, описана система упаковки ретровирусных препаратов, содержащая:

клетку млекопитающего, содержащую:

первый трансаактиватор, экспрессируемый из конститутивного промотора и способный связывать первый лиганд и первый индуцируемый промотор для воздействия на экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, функционально связанной с ней, в присутствии по сравнению с отсутствием первого лиганда;

второй трансаактиватор, способный связывать второй лиганд и второй индуцируемый промотор и влияющий на экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, функционально связанной с ней, в присутствии по сравнению с отсутствием второго лиганда; и

упакованный геном РНК ретровирусной частицы,

при этом первый трансаактиватор регулирует экспрессию второго трансаактиватора и ретровирусного REV-белка, а второй трансаактиватор регулирует экспрессию gag-полипептида, pol-полипептида и одного или нескольких элементов псевдотипирования, способных связываться с клеткой-мишенью и облегчать их слияние с мембраной, а также при этом ретровирусные белки получают из ретровируса. Варианты осуществления этого аспекта могут включать любой из вариантов осуществления, представленных здесь для указанных элементов в других аспектах.

В другом аспекте, представленный в настоящем документе способ представляет собой способ получения рекомбинантного ретровируса, включающий:

культивирование популяции упаковывающих клеток для накопления первого трансаактиватора, при этом упаковывающие клетки содержат первый трансаактиватор, экспрессированный из первого конститутивного промотора, причем первый трансаактиватор способен связывать первый лиганд и первый индуцируемый промотор для воздействия на экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, функционально связанной с ним в присутствии по сравнению с отсутствием первого лиганда, а экспрессия второго трансаактиватора и ретровирусного REV-белка регулируется первым трансаактиватором;

инкубирование популяции упаковывающих клеток, содержащей накопленный первый трансаактиватор, в присутствии первого лиганда для накопления второго трансаактиватора и ретровирусного REV-белка, при этом второй трансаактиватор способен связывать второй лиганд и второй индуцируемый промотор для воздействия на экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, функционально связанной с ним в присутствии по сравнению с отсутствием второго лиганда; и

инкубирование популяции упаковывающих клеток, содержащей накопленный второй трансаактиватор и ретровирусный REV-белок в присутствии второго лиганда, тем самым индуцируя экспрессию gag-полипептида, pol-полипептида и одного или нескольких элементов псевдотипирования, в результате чего получают рекомбинантный ретровирус;

при этом упакованный геном РНК кодируется полинуклеотидом, функционально связанным с третьим промотором, причем указанный третий промотор либо конститутивно активный, либо индуцируемый первым трансаактиватором или вторым трансаактиватором, а один или несколько элементов псевдотипирования способны связываться с клеткой-мишенью и/или облегчить слияние с ней мембраны рекомбинантного ретровируса.

В некоторых вариантах осуществления системы упаковки ретровирусных препаратов и аспекта способа получения рекомбинантного ретровируса, представленного здесь, клетка млекопитающего дополнительно содержит элемент активации, способный

связывать и активировать клетку-мишень, а первый трансактиватор регулирует экспрессию элемента активации. Элемент активации находится на поверхности ретровируса, и при этом элемент активации может включать: мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD3; и/или мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD28. Мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD3, может представлять собой полипептид, способный связываться с CD3, который слился с гетерологичной последовательностью присоединения ГФИ-якоря, а мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD28, представляет собой полипептид, способный связываться с CD28, который слился с гетерологичной последовательностью присоединения ГФИ-якоря. В некоторых вариантах осуществления мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD28, содержит CD80, CD86 или его функциональный фрагмент, способный индуцировать CD28-зависимую активацию Akt, например, внеклеточного домена CD80. В других вариантах осуществления мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD3, представляет собой анти-CD3 scFv, связанный последовательностью присоединения ГФИ-якоря CD14, а мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD28, представляет собой CD80 или его внеклеточный фрагмент, способный связываться с последовательностью присоединения ГФИ-якоря CD16B.

В некоторых вариантах осуществления системы упаковки ретровирусных препаратов и аспекта способа получения рекомбинантного ретровируса, представленного здесь, клетка млекопитающего дополнительно содержит мембраносвязанный цитокин, а первый трансактиватор регулирует экспрессию мембраносвязанного цитокина. Мембраносвязанным цитокином может выступать, например, IL-7, IL-15 или его активный фрагмент. Мембраносвязанным цитокином в различных вариантах осуществления может выступать слитый полипептид IL-7/его активного фрагмента и DAF-фактор. Например, слитый полипептид может содержать сигнальную последовательность DAF и IL-7 без сигнальной последовательности, за которой следуют остатки 36-525 DAF-фактора.

В некоторых вариантах осуществления системы упаковки ретровирусных препаратов и аспекта способа получения рекомбинантного ретровируса, представленного здесь, клетка млекопитающего содержит связанную с ней мембрану, элемент активации, содержащий анти-CD3 scFv, связанный с последовательностью присоединения ГФИ-якоря CD14 и CD80/его внеклеточный домен, связанный с последовательностью присоединения ГФИ-якоря CD16B; и мембраносвязанный цитокин, содержащий слитый полипептид IL-7 или его активный фрагмент, и DAF, содержащий последовательность присоединения ГФИ-якоря, и при этом первый трансактиватор регулирует экспрессию каждого из элемента активации и мембраносвязанного цитокина. В некоторых вариантах осуществления IL-7 или его активный фрагмент, а также слияние DAF, анти-CD3 scFV и CD80 или его внеклеточный фрагмент, каждый содержит сигнальную последовательность DAF-фактора.

В некоторых вариантах осуществления системы упаковки ретровирусных препаратов и аспекта способа получения рекомбинантного ретровируса, представленного здесь, клетка млекопитающего дополнительно содержит полипептид гена Vprx. В этих или других вариантах осуществления один или несколько элементов псевдотипирования содержат один или несколько вирусных полипептидов, распознаваемых Т-клетками. Один или несколько псевдотипирующих элементов могут содержать полипептид вируса кори F, полипептид вируса кори H и/или его фрагмент. В определенных иллюстративных вариантах осуществления один или несколько элементов псевдотипирования

представляют собой варианты делеции цитоплазматической области полипептида вируса кори F и/или полипептида вируса кори H.

В некоторых вариантах осуществления системы упаковки ретровирусных препаратов и аспекта способа получения рекомбинантного ретровируса, представленного здесь, 5 упакованный геном РНК кодируется полинуклеотидом, функционально связанным с третьим промотором, при этом указанный третий промотор либо конститутивно активный, либо индуцируемый первым трансаактиватором или вторым трансаактиватором. В иллюстративных вариантах осуществления упакованный геном РНК кодируется полинуклеотидом, функционально связанным с третьим промотором, 10 при этом указанный третий промотор индуцируемый вторым трансаактиватором.

В некоторых вариантах осуществления системы упаковки ретровирусных препаратов и аспекта способа получения рекомбинантного ретровируса, представленного здесь, упакованный геном РНК дополнительно содержит 5'-3' элементы:

5' длинный концевой повтор или его активный фрагмент;
15 последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент упаковки ретровирусной РНК, действующей в цис-положении;
последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый целевой полипептид и, в некоторых случаях, второй целевой полипептид;
четвертый промотор, функционально связанный с первым целевым полипептидом 20 и, в некоторых случаях, со вторым полипептидом, при этом указанный четвертый промотор активен в клетке-мишени, но не активен в пакующей клеточной линии; и
3' длинный концевой повтор или его активный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления системы упаковки ретровирусных препаратов и аспекта способа получения рекомбинантного ретровируса, представленного здесь, 25 включая указанный непосредственно выше, третий промотор способствует транскрипции или экспрессии в противоположном направлении от транскрипции или экспрессии, которой способствовал четвертый промотор.

В некоторых вариантах осуществления системы упаковки ретровирусных препаратов и аспекта способа получения рекомбинантного ретровируса, представленного здесь, 30 упакованный геном РНК кодирует рекомбинантный ретровирус по любому из вариантов осуществления, раскрытого в этом изобретении, при этом первый целевой полипептид и второй целевой полипептид представляют собой первый сконструированный сигнальный полипептид и второй сконструированный сигнальный полипептид, соответственно. В некоторых вариантах осуществления упакованный геном РНК 35 дополнительно содержит контрольный элемент *in vivo*, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей первый сконструированный сигнальный полипептид или второй сконструированный сигнальный полипептид. Контрольный элемент *in vivo* в иллюстративных вариантах осуществления представляет собой рибопереключател. Рибовыключатель в иллюстративных вариантах осуществления способен связывать 40 соединение, а соединение, которое связывает контрольный элемент *in vivo*, представляет собой аналог нуклеозида, а аналогом нуклеозида может быть противовирусный препарат, например ацикловир или пенцикловир.

В некоторых вариантах осуществления системы упаковки ретровирусных препаратов и аспекта способа получения рекомбинантного ретровируса, представленного здесь, 45 упакованный геном РНК дополнительно содержит интрон, содержащий полинуклеотид, кодирующий miРНК или shРНК. Интрон может быть смежным и располагаться ниже по потоку от четвертого промотора.

В некоторых вариантах осуществления системы упаковки ретровирусных препаратов

и аспектах способа получения рекомбинантного ретровируса, представленных здесь, клеткой-мишенью может быть Т-клеткой и/или НК-клеткой.

В некоторых вариантах осуществления системы упаковки ретровирусных препаратов и аспектах способа получения рекомбинантного ретровируса, представленных здесь, один или несколько элементов псевдотипирования содержат оболочечный белок вируса везикулярного стоматита (VSV-G), оболочечный белок эндогенного вируса кошки (RD114), оболочечный онкоретровирусный амфотропный белок или оболочечный онкоретровирусный экотропный белок или их функциональные фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления системы упаковки ретровирусных препаратов и аспекта способа получения рекомбинантного ретровируса, представленного здесь, размер упакованного гена РНК равен 11000 КБ или меньше/10000 КБ или меньше. В некоторых вариантах осуществления системы упаковки ретровирусных препаратов и аспекта способа получения рекомбинантного ретровируса, представленного здесь, первый целевой полипептид содержит первый сконструированный сигнальный полипептид, при этом указанный первый сконструированный сигнальный полипептид содержит лимфопролиферативный элемент, а и второй целевой полипептид содержит второй сконструированный сигнальный полипептид, включающий CAR.

В одном аспекте, представленном здесь, описан выделенный полинуклеотид для регулирования экспрессии целевого полинуклеотида, содержащий:

полинуклеотид, кодирующий целевой полинуклеотид, функционально связанный с промотором и рибопереключателем, в котором рибопереключитель содержит:

а) домен аптамера, способный связывать нуклеозидный аналог противовирусного препарата и имеющей восстановленную связь с гуанином или 2'-дезоксигуанозином относительно нуклеозидного аналога противовирусного препарата; и

б) домен функционального переключателя, способный регулировать экспрессию целевого полинуклеотида, при котором связывание нуклеозидного аналога аптамерным доменом индуцирует или подавляет регуляторную активность экспрессии домена функционального переключателя, тем самым регулируя экспрессию целевого полинуклеотида.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из предложенных здесь способов и составов, которые включают контрольный элемент *in vivo*, которым может выступать полинуклеотид, включающий рибопереключитель. Рибопереключитель может быть способен связывать нуклеозидный аналог, а соединение, связывающее контрольный элемент *in vivo*, представляет собой нуклеозидный аналог. Нуклеозидным аналогом может выступать противовирусное вещество. Противовирусным веществом может выступать ацикловир или пенцикловир. Рибопереключитель может преимущественно связывать ацикловир над пенцикловиром или преимущественно связывать пенцикловир над ацикловиром. Рибопереключитель может иметь уменьшенное связывание с аналогами нуклеозида противовирусного препарата при температурах выше 37°C, 37,5°C, 38°C, 38,5°C или 39°C, например, выше 39°C. На нижней границе диапазона рибопереключитель может находиться между нуклеотидами длиной 35, 40, 45 и 50 единиц и на нижней границе диапазона - между нуклеотидами длиной 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 и 100 единиц, например, между нуклеотидами длиной 45-80 единиц. В иллюстративных вариантах осуществления любого из предложенных здесь способов и составов, которые включают рибопереключитель, целевой полинуклеотид, который регулируется рибопереключателем, может включать область, кодирующую *mi*РНК, *sh*РНК и/или полипептид. Целевой полинуклеотид может кодировать лимфопролиферативный элемент. Целевой полинуклеотид может быть функционально

связан с промотором. Целевой полинуклеотид может включать область, кодирующую полипептид, а полипептид может содержать химерный антигенный рецептор, включающий антигенспецифическую область для нацеливания, трансмембранный домен и внутриклеточный активирующий домен. В иллюстративных вариантах осуществления любого из предложенных здесь способов и составов, которые включают рибопереклюатель, домен функционального переключателя может регулировать внутренний сайт посадки рибосомы, доступность донора до мРНК-сплайсинга в конструкции вирусного гена, трансляцию, прекращение транскрипции, снижение транскрипции, экспрессию miРНК или экспрессию shРНК, тем самым регулируя экспрессию целевого полинуклеотида. Рибопереклюатель может включать рибозим. В иллюстративных вариантах осуществления любого из предложенных здесь способов и составов, которые включают рибопереклюатель, выделенный полинуклеотид может быть вектором молекулярного клонирования или вектором экспрессии. В иллюстративных вариантах осуществления любого из предложенных здесь способов и составов, которые включают рибопереклюатель, выделенный полинуклеотид может быть интегрирован в ретровирусный геном, хромосому млекопитающего или ее фрагмент.

В другом аспекте, представленный в настоящем документе способ представляет собой способ генной модификации и увеличения лимфоцитов у испытуемого, включающий:

А. забор крови у пациента;

В. взаимодействие Т-клеток и/или НК-клеток из крови пациента *ex vivo* с рекомбинантными ретровирусами, содержащими:

i. элемент псевдотипирования на ее поверхности, который способен связываться с Т-клеткой и/или НК-клеткой и облегчает мембранное слияние с ним рекомбинантного ретровируса. при этом псевдотипирующий элемент содержит варианты делеции цитоплазматической области полипептида вируса кори F и/или полипептида вируса кори H.

ii. полипептид, способный связываться с CD3, и полипептид, способный связываться с CD28, причем указанные полипептиды наблюдаются на поверхности рекомбинантного ретровируса и способны связываться с Т-клеткой и/или НК-клеткой, а далее указанные полипептиды не кодируются полинуклеотидом в рекомбинантном ретровирусе; и

iii. полинуклеотид, включающий одну или несколько транскрипционных единиц, функционально связанных с промотором, активным в Т-клетках и/или НК-клетках;

при этом один или несколько транскрипционных единиц кодируют первый сконструированный сигнальный полипептид, содержащий конститутивно активный мутаген рецептора IL-7, и второй сконструированный сигнальный полипептид, содержащий химерный антигенный рецептор, содержащий антигенспецифическую область нацеливания (ASTR), трансмембранный домен и внутриклеточный активирующий домен,

а также экспрессия мутагена рецептора IL-7 регулируется с помощью рибосома, который связывает аналог нуклеозида противовирусного препарата, при этом связывание аналога нуклеозида противовирусного препарата с рибосоматом увеличивает экспрессию мутагена рецептора IL-7; и

причем указанное взаимодействие приводит к тому, что по меньшей мере некоторые из покоящихся Т-клеток и/или НК-клеток становятся генно-модифицированными;

С. повторное введение генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток пациенту;

и

D. соединение генно-модифицированных Т-клеток и/или NK-клеток *in vivo*, которое связывает аналог нуклеозида противовирусного препарата для содействия увеличению Т-клеток и/или NK-клеток, при этом способ, осуществляемый между сбором кровью и повторным введением генно-модифицированных Т-клеток и/или NK-клеток, проводят не позднее чем через 24 часа и/или без необходимости предварительной стимуляции *ex vivo*, тем самым обеспечивая генетическую модификацию и увеличение лимфоцитов пациента.

В иллюстративных вариантах осуществления аспекта данного способа ретровирусом является лентивирус. В другом иллюстративном варианте осуществления рекомбинантный ретровирус генетически модифицирует Т-клетку. В другом иллюстративном варианте осуществления полипептид, способный связываться с CD3, и полипептид, способный связываться с CD28, каждый слит с гетерологичной последовательностью присоединения ГФИ-якоря. В некоторых случаях полипептидом, способным связываться с CD3, может выступать анти-CD3 scFvFc или анти-CD3 scFv, а полипептидом, способным связываться с CD28, может выступать CD80. анти-CD3 scFvFc или анти-CD3 scFv и CD80 могут быть слиты с сигнальной последовательностью DAF каждый. В другом иллюстративном варианте осуществления рекомбинантные ретровирусы дополнительно содержат на своей поверхности слитый полипептид, содержащий цитокин, ковалентно присоединенный к DAF. В некоторых случаях цитокином может выступать IL-7, IL-15, а слитый полипептид может содержать сигнальную последовательность DAF, IL-7 без его сигнальной последовательности и фрагмент DAF, содержащий последовательность присоединения ГФИ-якоря.

В другом иллюстративном варианте осуществления в аспекте данного способа, указанного непосредственно выше, рибопереключател дополнительно контролирует экспрессию химерного антигенного рецептора путем регулировки связывания рибопереключател с аналогом нуклеозида противовирусного препарата, которым в некоторых случаях является ацикловир и/или пенцикловир. В другом иллюстративном варианте осуществления конститутивно активный IL-7 может быть заменен miPHK или shPHK. В некоторых случаях miPHK или shRNA может быть закодирован с помощью нуклеиновых кислот внутри интрона.

В другом аспекте, представленном здесь, описан рекомбинантный ретровирус, содержащий:

A. элемент псевдотипирования на ее поверхности, который способен связываться с Т-клеткой и/или NK-клеткой и облегчает мембранное слияние с ним рекомбинантного ретровируса. при этом псевдотипирующий элемент содержит варианты делеции цитоплазматической области полипептида вируса кори F и/или полипептида вируса кори H.

B. полинуклеотид, содержащий одну или несколько транскрипционных единиц, функционально связанных с промотором, активным в Т-клетках и/или NK-клетках, причем одна или несколько транскрипционных единиц кодируют первый сконструированный сигнальный полипептид, содержащий химерный антигенный рецептор, включающий антигенспецифическую область нацеливания, трансмембранный домен и внутриклеточный активирующий домен, а также второй сконструированный сигнальный полипептид, содержащий конститутивно активный мутаген рецептора IL-7; при этом экспрессия мутагена рецептора IL-7 регулируется рибопереключателем, который связывает аналог нуклеозида противовирусного препарата, а связывание аналога нуклеозида противовирусного препарата с рибопереключателем увеличивает экспрессию мутагена рецептора IL-7; и

С. полипептид, способный связываться с CD3, и полипептид, способный связываться с CD28, причем указанные полипептиды наблюдаются на поверхности рекомбинантного ретровируса и способны связываться с Т-клеткой и/или НК-клеткой, и указанные полипептиды не кодируются полинуклеотидом в рекомбинантном ретровирусе.

5 В иллюстративных вариантах осуществления аспекта способа получения рекомбинантного ретровируса, представленного здесь, ретровирусом является лентивирус. В другом иллюстративном варианте осуществления данного способа полипептид, способный связываться с CD3, и полипептид, способный связываться с CD28, каждый слит с гетерологичной последовательностью присоединения ГФИ-якоря.
 10 В некоторых случаях полипептидом, способным связываться с CD3, может выступать анти-CD3 scFvFc или анти-CD3 scFv, а полипептидом, способным связываться с CD28, может выступать CD80. анти-CD3 scFvFc или анти-CD3 scFv и CD80 могут быть слиты с сигнальной последовательностью DAF каждый. В другом иллюстративном варианте осуществления рекомбинантные ретровирусы дополнительно содержат на своей
 15 поверхности слитый полипептид, содержащий цитокин, ковалентно присоединенный к DAF. В некоторых случаях цитокином может выступать IL-7, IL-15, а слитый полипептид может содержать сигнальную последовательность DAF, IL-7 без его сигнальной последовательности и фрагмент DAF, содержащий последовательность присоединения ГФИ-якоря.

20 В другом иллюстративном варианте осуществления в аспекте способа получения рекомбинантного ретровируса, указанного непосредственно выше, рибопереключитель дополнительно контролирует экспрессию химерного антигенного рецептора путем регуляции связывания рибопереключителя с аналогом нуклеозида противовирусного препарата, которым в некоторых случаях является ацикловир и/или пенцикловир. В
 25 другом иллюстративном варианте осуществления конститутивно активный IL-7 может быть заменен miРНК или shРНК. miРНК или shRNA может быть закодирован с помощью нуклеиновых кислот внутри интрона.

В другом аспекте, представленный в настоящем документе способ представляет собой способ получения рекомбинантного ретровируса, включающий:

30 А. культивирование популяции упаковывающих клеток для накопления первого трансаактиватора, при этом упаковывающие клетки содержат первый трансаактиватор, экспрессированный из первого конститутивного промотора, причем первый трансаактиватор способен связывать первый лиганд и первый индуцируемый промотор для воздействия на экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты,
 35 функционально связанной с ним в присутствии по сравнению с отсутствием первого лиганда, а экспрессия второго трансаактиватора и ретровирусного REV-белка регулируется первым трансаактиватором;

В. инкубирование популяции упаковывающих клеток, содержащей накопленный первый трансаактиватор, в присутствии первого лиганда для накопления второго трансаактиватора и ретровирусного REV-белка, при этом второй трансаактиватор способен связывать второй лиганд и второй индуцируемый промотор для воздействия на экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, функционально связанной с ним в присутствии по сравнению с отсутствием второго лиганда; и

С. инкубирование популяции упаковывающих клеток, содержащей накопленный второй трансаактиватор и ретровирусный REV-белок в присутствии второго лиганда, тем самым индуцируя экспрессию gag-полипептида, pol-полипептида и элемента псевдотипирования, способного связываться с Т-клеткой и/или НК-клеткой, а также облегчает слияние мембраны рекомбинантного ретровируса с ней, причем указанный

элемент псевдотипирования включает варианты делеции цитоплазматического домена полипептида вируса кори F и/или полипептида вируса кори H,

при этом упакованный геном РНК кодируется полинуклеотидом, функционально связанным с третьим промотором, а указанный третий промотор индуцируем вторым трансаактиватором;

при этом упакованный геном РНК содержит 5'-3' элементы:

i. 5'-длинный концевой повтор или его активный фрагмент;

ii. последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент упаковки ретровирусной РНК, действующей в cis-положении;

iii. последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый сконструированный сигнальный полипептид, содержащий химерный антигенный рецептор, а также второй сконструированный сигнальный полипептид, содержащий конститутивно активный мутагена рецептора IL-7, разделенный сигналом расщепления;

iv. четвертый промотор, который активен в Т-клетке и/или НК-клетке; и

v. 3'-длинный концевой повтор или его активный фрагмент; и при этом упакованный геном РНК дополнительно содержит рибопереключател, который связывает аналог нуклеозида противовирусного препарата, а связывание аналога нуклеозида противовирусного препарата с рибопереключателем увеличивает экспрессию мутагена рецептора IL-7,

тем самым образуя рекомбинантный ретровирус.

В иллюстративном варианте осуществления данного способа рибопереключател дополнительно контролирует экспрессию химерного антигенного рецептора путем регулировки связывания рибопереключател с аналогом нуклеозида противовирусного препарата. В другом иллюстративном варианте осуществления нуклеозидным аналогом

противовирусного препарата является ацикловир и/или пенцикловир. В еще одном иллюстративном варианте осуществления упакованный геном РНК может

дополнительно содержать последовательность нуклеиновой кислоты, когда домен распознавания содержит полипептид, распознаваемый антителом, которое определяет РЭФР или его эпитоп. В другом иллюстративном варианте первым лигандом является

рапамицин, а вторым лигандом является тетрациклин или доксорубицин, или первым лигандом является тетрациклин или доксорубицин, а вторым лигандом является рапамицин. В другом иллюстративном варианте упаковывающая клетка может

дополнительно включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ген V_{рх} на второй или в некоторых случаях третьей транскрипционной единице, или на

дополнительной транскрипционной единице, которая функционально связана с первым индуцируемым промотором. В другом иллюстративном варианте осуществления

полипептид, способный связываться с CD3, и полипептид, способный связываться с CD28, каждый слит с гетерологичной последовательностью присоединения ГФИ-якоря.

В некоторых случаях полипептидом, способным связываться с CD3, может выступать анти-CD3 scFvFc или анти-CD3 scFv, а полипептидом, способным связываться с CD28,

может выступать CD80. анти-CD3 scFvFc или анти-CD3 scFv и CD80 могут быть слиты с сигнальной последовательностью DAF каждый. В другом иллюстративном варианте

осуществления также индуцируется экспрессия слитого полипептида, содержащего цитокин, ковалентно присоединенный к DAF. В некоторых случаях цитокином может

выступать IL-7, IL-15, а слитый полипептид может содержать сигнальную

последовательность DAF, IL-7 без его сигнальной последовательности и фрагмент DAF, содержащий последовательность присоединения ГФИ-якоря. В другом иллюстративном

варианте осуществления рибопереключател дополнительно контролирует экспрессию

химерного антигенного рецептора путем регулировки связывания рибопереклювателя с аналогом нуклеозида противовирусного препарата, которым в некоторых случаях является ацикловир и/или пенцикловир. В другом иллюстративном варианте осуществления конститутивно активный IL-7 может быть заменен miРНК или shРНК. miРНК или shRNA может быть закодирован с помощью нуклеиновых кислот внутри интрона. В иллюстративном варианте осуществления полученным ретровирусом является лентивирус.

Приведенное здесь в другом аспекте описание представляет генно-модифицированный лимфоцит, содержащий:

А. первый сконструированный сигнальный полипептид, включающий конститутивно активный мутаген рецептора IL-7; и

В. второй сконструированный сигнальный полипептид, включающий химерный антигенный рецептор, содержащий антигенспецифическую область нацеливания (ASTR), трансмембранный домен и внутриклеточный активирующий домен.

В иллюстративных вариантах осуществления аспекта генно-модифицированного лимфоцита, представленного выше, генно-модифицированным лимфоцитом является Т-клетка и/или NK-клетка. В определенных вариантах осуществления лимфоцитом является Т-клетка. В другом иллюстративном варианте осуществления экспрессия указанного первого сконструированного сигнального полипептида и/или указанного второго сконструированного сигнального полипептида регулируется рибопереклювателем, который связывает аналог нуклеозида противовирусного препарата, причем связывание аналога нуклеозида противовирусного препарата с рибопереклювателем увеличивает экспрессию мутагена рецептора IL-7. В другом варианте осуществления конститутивно активный IL-7 может быть заменен miРНК или shРНК. miРНК или shRNA может быть дополнительно закодирован с помощью нуклеиновых кислот внутри интрона.

Приведенное здесь в другом аспекте описание представляет генно-модифицированную Т-клетку и/или NK-клетку, содержащую:

первый сконструированный сигнальный полипептид, содержащий лимфопротиперативный элемент; и

второй сконструированный сигнальный полипептид, включающий химерный антигенный рецептор, содержащий антигенспецифическую область нацеливания (ASTR), трансмембранный домен и внутриклеточный активирующий домен.

В иллюстративных вариантах осуществления аспекта генно-модифицированной Т-клетки и/или NK-клетки лимфопротиперативный элемент является конститутивно активным, а в некоторых случаях представляет собой конститутивно активный мутированный рецептор IL-7 или его фрагмент. В другом иллюстративном варианте осуществления экспрессия первого сконструированного сигнального полипептида и/или второго сконструированного сигнального полипептида регулируется контрольным элементом *in vivo*. В некоторых случаях контрольным элементом *in vivo* является полинуклеотид, содержащий рибопереклюватель. В некоторых случаях рибовыключатель способен связывать аналог нуклеозида, и в присутствии аналога нуклеозида увеличивается первый сконструированный сигнальный полипептид и/или второй сконструированный полипептид. В других иллюстративных вариантах осуществления генно-модифицированная Т-клетка и/или NK-клетка имеет на своей поверхности элемент активации, элемент псевдотипирования и/или мембраносвязанный цитокин. В некоторых случаях элемент активации содержит мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD3; и/или мембраносвязанный полипептид,

способный связываться с CD28. В определенном варианте осуществления элемент активации содержит анти-CD3 scFv, слитый с гетерологичной последовательностью присоединения ГФИ-якоря, и/или CD80, слитый с гетерологичной последовательностью присоединения ГФИ-якоря. В иллюстративном варианте осуществления элемент псевдотипирования содержит полипептид вируса кори F, полипептид вируса кори H и/или варианты делеции цитоплазматического домена полипептида вируса кори F и/или полипептида вируса кори H. В других вариантах осуществления мембраносвязанный цитокин представляет собой слитый полипептид, содержащий IL-7 или его фрагмент, слитый с DAF, или его фрагмент, содержащий последовательность присоединения ГФИ-якоря.

В одном аспекте, представленный в настоящем документе способ представляет собой способ генной модификации и увеличения лимфоцитов у испытуемого, включающий:

А. взаимодействие покоящихся Т-клеток и/или НК-клеток пациента *ex vivo*, как правило, без необходимости предварительной стимуляции *ex vivo* с рекомбинантными ретровирусами, включающими:

псевдотипирующий элемент на ее поверхности, который способен связываться с Т-клеткой и/или НК-клеткой и облегчает мембранное слияние с ним рекомбинантного ретровируса; и

полинуклеотид, содержащий одну или несколько единиц транскрипции, функционально связанных с промотором, активным в Т-клетках и/или НК-клетках, причем одна или несколько единиц транскрипции кодируют первый сконструированный сигнальный полипептид, регулируемый контрольным элементом *in vivo*, причем указанный первый сконструированный сигнальный полипептид включает лимфопролиферативный элемент, и в некоторых случаях кодируют второй сконструированный сигнальный полипептид, необязательно регулируемый контрольным элементом *in vivo*, причем второй сконструированный сигнальный полипептид содержит внутриклеточный активирующий домен и, в некоторых случаях, другие компоненты CAR.

при этом указанное взаимодействие облегчает трансдукцию по меньшей мере некоторых из покоящихся Т-клеток и/или НК-клеток посредством рекомбинантных ретровирусов, в результате чего получают генно-модифицированные Т-клетки и/или НК-клетки;

введение генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток пациенту; и

соединение генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток *in vivo*, которое выступает в качестве контрольного элемента *in vivo*, что позволяет повлиять на экспрессию первого сконструированного сигнального полипептида и способствовать увеличению, приживлению и/или жизнестойкости лимфоцитов *in vivo*, тем самым генетически модифицируя и увеличивая лимфоциты пациента.

В иллюстративных вариантах осуществления трансдукция проводится без стимуляции *ex vivo*. В иллюстративных вариантах осуществления соединение представляет собой молекулярный шаперон, такой как малый молекулярный шаперон. В иллюстративных вариантах осуществления связывание молекулярного шаперона с лимфопролиферативным элементом увеличивает пролиферативную активность лимфопролиферативного элемента. Молекулярный шаперон может быть введен пациенту до сбора крови, во время взаимодействия и/или после того, как Т-клетки и/или НК-клетки будут введены пациенту. В этом аспекте будет понятно, что соединение представляет собой контрольный элемент *in vivo*, что такое соединение обычно способно связываться с лимфопролиферативным элементом и/или компонентом CAR и

действительно связывается с таким лимфопротеративным элементом или компонентом CAR во время осуществления данного способа. Другие варианты осуществления и учения, относящиеся к способам, приведенным в настоящем изобретении, которые включают трансфекцию Т-клетки и/или НК-клетки

5 рекомбинантный ретровирусом, применимы к этому аспекту, также включая вариант осуществления молекулярного шаперона.

В другом аспекте, представленный в настоящем документе способ представляет собой способ выделения ограниченной антигенспецифической области нацеливания с микроокружением, включающий пэннинг библиотеки идентификации полипептидов

10 посредством:
а. проведения анализа полипептидов из библиотеки идентификации полипептидов на связывание в нормальном физиологическом состоянии и анализу на связывание в аберрантном состоянии; и

15 б. выбора полипептида, проявляющего увеличение активности связывания в аберрантном состоянии по сравнению с физиологическим состоянием, тем самым выбирая ограниченную антигенспецифическую область нацеливания на микроокружение.

В другом аспекте, представленный в настоящем документе способ представляет собой способ выделения ограниченной антигенспецифической области нацеливания на микроокружение, включающий:

20 пэннинг библиотеки полипептидов посредством:

взаимодействия библиотеки полипептидов в аберрантных условиях с целевым антигеном, связанным с твердым носителем, при этом клоны, экспрессирующие полипептиды, связывающие антиген клетки-мишени, остаются связанными с твердым носителем через антиген клетки-мишени;

25 инкубирования твердых носителей со связанными полипептидами в физиологических условиях; и

сбора клонов, которые элюируются из твердого носителя в физиологических условиях, тем самым выделяя ограниченную антигенспецифическую область нацеливания на микроокружение.

30 В другом аспекте, представленный в настоящем документе присутствует химерный антигенный рецептор для связывания антигена клетки-мишени, содержащий:

а) по меньшей мере одну ограниченную антигенспецифическую область нацеливания с микроокружением, выбранную путем пэннинга библиотеки полипептидов и обладающую увеличенной активностью в ходе анализа на связывание в аберрантном

35 состоянии по сравнению с нормальным физиологическим состоянием;

б) трансмембранный домен; и

с) внутриклеточный активирующий домен.

В другом аспекте, представленный в настоящем документе присутствует химерный антигенный рецептор для связывания антигена клетки-мишени, содержащий:

40 а) ограниченную антигенспецифическую область нацеливания с микроокружением, которая демонстрирует увеличение связывания с антигеном клетки-мишени в аберрантном состоянии по сравнению с нормальной физиологической средой, в которой антигенспецифическая область нацеливания связывается с клеткой-мишенью;

б) трансмембранный домен; и

45 с) внутриклеточный активирующий домен.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из предложенных здесь способов и составов, которые включают ограниченную антигенспецифическую область нацеливания с микроокружением (ASTR), ASTR может иметь по меньшей мере 5%, 10%,

15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%-ное увеличение сродства к связыванию с целевым антигеном при проведении анализа в аберрантном состоянии по сравнению с нормальным состоянием.. Аберрантными условиями могут быть гипоксия, кислотный pH, более высокая концентрация молочной кислоты, более высокая концентрация гиалуроновой кислоты, более высокая концентрация альбумина, более высокая концентрация аденозина, более высокая концентрация R-2-гидроксиглутарата, более высокая концентрация PAD-ферментов, более высокое давление, более высокая степень окисления и более низкая доступность питательных веществ. Ограниченная ASTR с микроокружением может демонстрировать увеличение связывания антигена при pH 6,7 по сравнению с pH 7,4. Ограниченная ASTR с микроокружением может демонстрировать увеличение связывания антигена в среде опухоли и/или в условиях *in vitro* суррогатного анализа опухоли по отношению к соответствующему физиологическому состоянию. Клеткой-мишенью может выступать 4-1BB, ST4, антиген аденокарциномы, альфа-фетопроtein, AXL, BAFF, клетка В-лимфомы, антиген C242, CA-125, карбоангидраза 9 (CA-IX), C-MET, CCR4, CD 152, CD 19, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23 (рецептор IgE), CD28, CD30 (TNFRSF8), CD33, CD4, CD40, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CEA, CNT0888, CTLA-4, DRS, EGFR, EpCAM, CD3, FAP, дополнительный домен-В фибронектина, рецептор фолата 1, GD2, GG3 ганглиозид, гликопротеин 75, GPNMB, HER2/neu, HGF, рецепторная киназа фактора рассеяния человека, ИФР-1-рецептор, ИФР-I, IgG1, L1- CAM, IL-13, IL-6, рецептор инсулиноподобного фактора роста I, интегрин nSP1, интегрин nvP3, MORAb-009, MS4A1, MUC1, CanAg муцин, N-гликолилнейраминаовая кислота, NPC-1C, PDGF-R a, PDL192, фосфатидилсерин, клетки карциномы предстательной железы, RANKL, RON, ROR1, ROR2 SCH 900105, SDC1, SLAMF7, TAG-72, тенаascin C, фактор ТФР-бета 2, актор ТФР-Р, TRAIL-R1, TRAIL-R2, опухолевый антиген CTAA16.88, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR2 и виментина. В качестве ASTR может выступать антитело, антиген, лиганд, рецепторсвязывающий домен лиганда, рецептор, лигандсвязывающий домен рецептора или аффитело. ASTR может представлять собой полноразмерное антитело, одноцепочечное антитело, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, Fab')₂-фрагмент, Fv-фрагмент и двухвалентное одноцепочечное антитело или диатело. ASTR может включать тяжелую и легкую цепь из антитела. Антителом может быть одноцепочечный вариабельный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления тяжелая и легкая цепи могут быть разделены линкером, при этом линкер имеет длину от 6 до 100 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь может быть расположена в N-концевой позиции по отношению к легкой цепи на химерном антигенном рецепторе, а в некоторых вариантах осуществления легкая цепь может быть расположена в N-концевой позиции по отношению к тяжелой цепи на химерном антигенном рецепторе.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из способов, которые включают библиотеку идентификации полипептидов, библиотека идентификации полипептидов может представлять собой библиотеку идентификации фагов или библиотеку идентификации дрожжей. Библиотекой идентификации полипептидов может выступать библиотека идентификации антител. Библиотекой идентификации антител может выступать библиотека идентификации антител человека или гуманизированных антител. Библиотекой идентификации антител может выступать наивная библиотека. Способы могут включать инфицирование бактериальных клеток собранным бактериофагом для получения усовершенствованной библиотеки идентификации полипептидов, а также повторение взаимодействия, инкубации и сбора образцов на протяжении 1-1000 циклов с использованием усовершенствованной библиотеки идентификации бактериофагов,

сгенерированной из данных предыдущего цикла.

В иллюстративных вариантах осуществления любого из предложенных здесь способов и составов, которые включают выделение или выбор ограниченной ASTR с микроокружением, способ может включать определение нуклеотидной последовательности полинуклеотида, кодирующего ограниченную антигенспецифическую область нацеливания с микроокружением, тем самым определяя полипептидную последовательность ограниченной ASTR с микроокружением.. Способ может включать создание ограниченного биологического химерного антигенного рецептора путем генерирования полинуклеотида, который кодирует полипептид, содержащий ограниченную ASTR с микроокружением, трансмембранный домен и внутриклеточный активирующий домен. Библиотекой может выступать библиотека одноцепочечных антител.

Способы выделения ограниченной ASTR с микроокружением могут включать пэннинг, повторяемый 1-1000 раз. Способы выделения ограниченной ASTR с микроокружением могут осуществляться без мутации полинуклеотидов, кодирующих ограниченную антигенспецифическую область нацеливания с микроокружением среди раундов пэннинга. Способы выделения ограниченной ASTR с микроокружением могут осуществляться посредством культивирования, амплификации с высокой точностью и/или разбавления полинуклеотидов, кодирующих антигенспецифические области нацеливания, или организмы-хозяева, в том числе между раундами пэннинга. Перед повтором способы могут включать мутагенез выбранной и/или выделенной ограниченной антигенспецифической области нацеливания с микроокружением. Способы могут включать определение выбранной и/или изолированной выделенной ограниченной антигенспецифической области нацеливания с микроокружением, и/или полинуклеотида, кодирующего ее, после одного или нескольких раундов пэннинга посредством продолжительного считывания последовательности ДНК. Способы могут включать определение последовательности до и после увеличения выделенной ограниченной ASTR с микроокружением. Способы выделения выделенной ограниченной ASTR с микроокружением могут выполняться без повторного пэннинга. Способы выделения выделенной ограниченной ASTR с микроокружением могут выполняться без осуществления мутации полинуклеотида, кодирующего выделенную ограниченную ASTR с микроокружением, после выделения ограниченной ASTR с микроокружением.

В иллюстративных вариантах осуществления любой из представленных здесь составов, содержащих химерный антигенный рецептор с ограниченной ASTR с микроокружением, ограниченная ASTR с микроокружением может определяться путем пэннинга библиотеки антител. В некоторых вариантах осуществления ограниченная ASTR с микроокружением определяется путем пэннинга библиотеки идентификации бактериофагов или библиотеки идентификации дрожжей. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит биспецифический ASTR.

В другом аспекте, представленном здесь, описана трансдуцированная Т-клетка и/или НК-клетка, содержащая рекомбинантный полинуклеотид, включая одну или несколько транскрипционных единиц, функционально связанных с промотором, активным в Т-клетках и/или НК-клетках, причем одна или несколько транскрипционных единиц кодируют первый сконструированный сигнальный полипептид, регулируемый с помощью контрольного элемента *in vivo*, причем указанный первый сконструированный сигнальный полипептид содержит конститутивно активный мутаген рецептора IL-7, а также контрольный элемент *in vivo* способен связываться с соединением *in vivo* или сконфигурировано для связывания соединения *in vivo*.

В другом аспекте, представленном здесь, описан рекомбинантный ретровирус, содержащий рекомбинантный полинуклеотид, включая одну или несколько транскрипционных единиц, функционально связанных с промотором, активным в Т-клетках и/или НК-клетках, причем одна или несколько транскрипционных единиц кодируют первый сконструированный сигнальный полипептид, регулируемый с помощью контрольного элемента *in vivo*, причем указанный первый сконструированный сигнальный полипептид содержит конститутивно активный мутант рецептора IL-7, а также контрольный элемент *in vivo* способен связывать и/или конструировать и/или сконфигурировать рецептор для связывания с соединением *in vivo*.

В другом аспекте, представленном здесь, описан способ трансдуцирования Т-клетки и/или НК-клетки, включающий взаимодействие Т-клетки и/или НК-клетки с рекомбинантным ретровирусом, содержащим рекомбинантный полинуклеотид, включая одну или несколько транскрипционных единиц, функционально связанных с промотором, активным в Т-клетках и/или НК-клетках, причем одна или несколько транскрипционных единиц кодируют первый сконструированный сигнальный полипептид, регулируемый с помощью контрольного элемента *in vivo*, причем указанный первый сконструированный сигнальный полипептид содержит конститутивно активный мутаген рецептора IL-7, а также контрольный элемент *in vivo* способен связываться с соединением *in vivo* в условиях трансдукции, тем самым трансформируя Т-клетку и/или НК-клетку.

В иллюстративных вариантах осуществления аспектов трансдуцирования Т-клетки и/или НК-клетки, аспектов рекомбинантного ретровируса и аспектов способа, приведенных в предыдущих пунктах, рекомбинантный полинуклеотид дополнительно единицу транскрипции, которая кодирует второй сконструированный сигнальный полипептид, содержащий первый рецептор химерного антигена, обладающего антигенспецифической областью для нацеливания (ASTR), трансмембранный домен и внутриклеточный активирующий домен. В других иллюстративных вариантах осуществления лимфопролиферативный элемент содержит мутированный рецептор IL-7 или его фрагмент. В других иллюстративных вариантах осуществления контрольным элементом *in vivo* является полинуклеотид, содержащий рибопереклюатель. В некоторых случаях рибопереклюатель способен связывать нуклеозидный аналог, а соединение, связывающее контрольный элемент *in vivo*, представляет собой нуклеозидный аналог. В других случаях аналогом нуклеозида является противовирусное вещество, такое как, например, ацикловир или пенцикловир. В определенных вариантах осуществления, противовирусным веществом является ацикловир. В других иллюстративных вариантах осуществления конститутивно активный мутаген рецептора IL-7 слит с РЭФР или его эпитопом. В других иллюстративных вариантах осуществления конститутивно активный мутаген рецептора IL-7 содержит eTag. В еще одних иллюстративных вариантах осуществления конститутивно активный мутаген рецептора IL-7 содержит PPCL-вставку. В других иллюстративных вариантах осуществления конститутивно активный мутаген рецептора IL-7 содержит PPCL-вставку в позиции, эквивалентной позиции 243 в человеческом IL-8 рецепторе дикого типа. В еще одних иллюстративных вариантах осуществления трансдуцированной Т-клеткой или НК-клеткой является трансдуцированная Т-клетка.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

На РИС. показана схема иллюстративных композиций, включающих упаковывающую клетку (100) и рекомбинантный ретровирус (200), вырабатываемый упаковывающей клеткой (100). На РИС. 1 различные векторы (называемые рекомбинантными полинуклеотидами (110)), способные кодировать аспекты изобретения, упакованы в

рекомбинантный ретровирус (200), который включает в свой геном первый сконструированный сигнальный полипептид, содержащий лимфопролиферативный элемент, а в некоторых вариантах осуществления, второй спроектированный сигнальный полипептид, которым является химерным антигенным рецептором или CAR.

5 Рекомбинантный ретровирус экспрессирует на своей мембране, элементе псевдотипирования (в неограничивающем варианте осуществления полипептид гемагглютинаина вируса кори (H) и полипептид вируса кори (F) или варианты его делеции в цитоплазматической области) (240), что позволяет ретровирусу осуществлять связывание и слияние с клеткой-мишенью; элемент активации (в неограничивающих
10 вариантах осуществления элемент активации, который имеет полипептид, способный связываться с CD28 и полипептид, способный связываться с CD3) (210 и 220, соответственно), который способен связываться с и активировать покоящуюся Т-клетку; и мембраносвязанный цитокин (в неограничивающем варианте осуществления слитый полипептид IL-7 DAF-фактора) (230). Части, обозначенные как (250), (260), (270), (280)
15 и (290), представляют собой Src-FLAG-Vpx, матрицу ВИЧ gag, капсид ВИЧ gag, РНК и ВИЧ pol, соответственно.

На РИС. 2 показана схема иллюстративных композиций, включающих рекомбинантный ретровирус, вырабатываемый упаковывающей клеткой (200), и покоящуюся Т-клетку (300), трансфицируемую рекомбинантным ретровирусом (200).
20 Элементы на поверхности ретровируса связываются с рецепторами и/или лигандами на поверхности покоящейся Т-клетки. Элемент псевдотипирования может включать связующий полипептид и фузогенный полипептид (в неограничивающих вариантах осуществления полипептид гемагглютинаина вируса кори (H) и слитый полипептид вируса кори (F)) или варианты его делеции в цитоплазматической области, которые
25 облегчают связывание и слияние ретровируса с Т-клеткой. В неограничивающих вариантах осуществления ретровирус содержит на своей поверхности элемент активации (в неограничивающих вариантах осуществления элемент активации, который имеет полипептид, способный связываться с CD28 и полипептид, способным связываться с CD3), который способен активировать покоящуюся Т-клетку путем взаимодействия с
30 комплексом рецепторов Т-клеток и, необязательно, ко-рецептором (320). Кроме того, мембраносвязанные цитокины (в неограничивающих вариантах осуществления слитый полипептид IL-7 DAF-фактора), присутствующие на поверхности ретровируса, связываются с IL-7R α (310) на поверхности покоящейся Т-клетки. Ретровирус сливается с Т-клеткой, а полинуклеотиды, кодирующие первый сконструированный сигнальный
35 полипептид, который включает лимфопролиферативный элемент (в иллюстративных вариантах осуществления, конститутивно активный IL-7R α) (370), подвергаются обратной транскрипции в цитозоле перед миграцией в ядро для включения в ДНК активированной Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления Src-FLAG-Vpx (250), упакованный вирусом, входит в цитозоль покоящихся Т-клеток и способствует
40 деградации SAMHD1 (350), что приводит к увеличению пула цитоплазматических дНТФ, доступных для обратной транскрипции. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды могут также кодировать второй сконструированный сигнальный полипептид, который включает CAR (360). В некоторых вариантах осуществления лимфопролиферативный элемент экспрессируется, когда соединение связывается с
45 контрольным элементом *in vivo*, который регулирует его экспрессию (в неограничивающем примере контрольный элемент *in vivo* представляет собой рибопереключател, который связывает аналог нуклеозида). В некоторых вариантах осуществления экспрессия CAR также регулируется контрольным элементом *in vivo*.

Часть (330) - SLAM и CD46. Часть (340) - CD3.

На РИС. 3А-3Е показаны схемы векторных систем. На РИС. 3А показана полинуклеотидная последовательность, кодирующую домен FRB, слитый с доменом активатора NFκB p65 (p65 AD) и ДНК-связывающий домен ZFHD1, слитый с тремя повторами FKBP, которые экспрессируются конститутивно. Конструкция на РИС. 3А также включает ген REV ВИЧ1 и Vpx в виде слияния SrcFlagVpx под рапамицин-индуцируемым промотором ZFHD1/p65 AD. На РИС. 3В показана конструкция, содержащая полинуклеотид, кодирующий последовательность rtTA, контролируемый промотором ZFHD1/p65 AD. На РИС. 3С показана конструкция, содержащая полинуклеотид, кодирующий ген устойчивости к пуромицину, фланкированными loxP-участками, и внеклеточный MYC-маркер, фланкированный lox2272-участками. Оба этих селективных маркера контролируются промотором BiTRE, фланкированным FRT-участками. На РИС. 3D показана конструкция, содержащая полинуклеотид, кодирующий RFP, фланкированный loxP-участками, который находится под контролем промотора TRE и одного сайта FRT между промотором TRE и 5'loxP-участком RFP. На РИС. 3Е показана конструкция, содержащая полинуклеотид, кодирующий GFP, фланкированный loxP-участками, который находится под контролем промотора TRE и одного сайта FRT между промотором TRE и 5'loxP-участком RFP. Конструкции на РИС. 3С-3Е выступают в качестве посадочных площадок для других полинуклеотидных последовательностей для вставки в геном пакующей клеточной линии.

На РИС. 4А-4С показаны схемы конструкций. На фиг.4А показана конструкция, содержащая трицистронный полинуклеотид, кодирующий scFvFc анти-CD3 (клон UCNT1) с участком связывания с CD14 GPI, дополнительный клеточный домен CD80 (ECD), способный связывать CD28 с участком присоединения ГИФ-якоря CD16В и IL-7 (DAF) с транспозоновыми последовательностями, фланкирующими полинуклеотидную область для интеграции в геном НЕК293S. На РИС. 4В, показана конструкция, содержащая полинуклеотид с BiTRE-промотором и полинуклеотидную область, кодирующую полиполипептиды gag и pol в одном направлении, а также полинуклеотидную область, кодирующую белки вирусов кори FΔх и HΔу в другом направлении. На РИС. 4С показана конструкция, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую CAR и лимфопролиферативный элемент IL7Rα-insPPCL, регулируемый промотора CD3Z, который не активен в клетках НЕК293S, при этом CAR и IL7Rα-insPPCL разделены полинуклеотидной последовательностью, кодирующей рибосомальный шаг T2A, а IL7Rα-insPPCL имеет рибозим, контролируемый рибопереключателем ацикловира. CAR-содержащая конструкция дополнительно включает cPPT/CTS, последовательность RRE и полинуклеотидную последовательность, кодирующую ВИЧ-1 пси (Ψ) Вся полинуклеотидная последовательность на CAR-содержащей конструкции, которая должна быть интегрирована в геном, фланкирована FRT-участками.

На РИС. 5А-5С показаны молекулярные структуры ацикловира (РИС. 5А), пенцикловира (РИС. 5В) и 2'-дезоксигуанозина (РИС. 5С) в качестве репрезентативных аналогов нуклеозидов для целей селективного управления рибопереключателем.

На РИС. 6 представлена регулируемая область рибопереключатателя дезоксигуанозина *Mesoplasma florum* типа I-A и связанный с ней генный продукт. Последовательность представляет собой обратный комплимент nt624396 - nt625670 геномной ДНК *M. florum* L1 (AE017263.1), который аналогичен nt636277 - nt 637550 геномной ДНК *M. florum* W37 (CP006778.1). Последовательность аптамера связывающего дезоксигуанозин, используемая для начального скрининга, выделена жирным шрифтом и подчеркнута.

Генный продукт, расположенный вниз по течению (рибонуклеотидредуктаза класса Ib (аэробная), бета-субъединица), обозначается прописными буквами.

На РИС. 7 представлены области аптамера рибопереклювателя дезоксигуанозина *M. florum* типа I-A, назначенные для осуществления направленной стратегии эволюции генов. Нуклеотиды в пустых овалах были нацелены для осуществления рандомизации. Нуклеотиды в заштрихованных овалах были нацелены для осуществления введения/удаления и рандомизации.

На РИС. 8А и 8В представлена библиотека скрининга аптамера рибопереклювателя дезоксигуанозина *M. florum* типа I-A. На РИС. 8А нуклеотиды в боксах со сплошными линиями представляют собой участки последовательности, нацеленные на осуществление рандомизации, и нуклеотиды в боксах с пунктирными линиями представляют собой участки последовательности, предназначенные для осуществления введения/удаления и рандомизации. На РИС. 8В показаны возможные последовательности, генерируемые посредством мутации («случайные нуклеотиды («N»)) и делеции/вставки.

На РИС. 9 представлена библиотека олигонуклеотидов аптамера рибопереклювателя дезоксигуанозина *M. florum* типа I-A, синтезированная в виде обратного комплемента, с добавлением дополнительных пар оснований для обеспечения амплификации PCR и добавления промотора T7 для транскрипции *in vitro* данных скрининга библиотеки. Также показан соответствующий праймер амплификации промотора T7 и праймер обратной амплификации.

На РИС. 10 представлена регулируемая область рибопереклювателя гуанозина *xpt Bacillus subtilis* и связанный с ней генный продукт. Последовательность представляет собой обратный комплемент nt2319439 - nt2320353 геномной ДНК *B. subtilis* доп. *subtilis* (CP003329.1). Последовательность аптамера связывающего гуанозин, используемая для начального скрининга, выделена жирным шрифтом и подчеркнута. Генный продукт, расположенный вниз по течению (ксантин фосфорибозилтрансфераза - *xpt*), обозначается прописными буквами.

На РИС. 11 представлены области аптамера рибопереклювателя гуанозина *B. subtilis*, назначенные для осуществления направленной стратегии эволюции генов. Нуклеотиды в пустых овалах были нацелены для осуществления рандомизации. Нуклеотиды в заштрихованных овалах были нацелены для осуществления введения/удаления и рандомизации.

На РИС. 12А и 12В представлена библиотека скрининга аптамера рибопереклювателя гуанозина *xpt B. subtilis*. На РИС. 12А нуклеотиды в боксах со сплошными линиями представляют собой участки последовательности, нацеленные на осуществление рандомизации, и нуклеотиды в боксах с пунктирными линиями представляют собой участки последовательности, предназначенные для осуществления введения/удаления и рандомизации. На РИС. 12В показаны возможные последовательности, генерируемые посредством мутации (случайные нуклеотиды («N»)) и делеции/вставки.

На РИС. 13 представлена библиотека олигонуклеотидов аптамера рибопереклювателя гуанозина *xpt B. subtilis*, синтезированная в виде обратного комплемента, с добавлением дополнительных пар оснований для обеспечения амплификации PCR и добавления промотора T7 для транскрипции *in vitro* данных скрининга библиотеки. Также показан соответствующий праймер амплификации промотора T7 и праймер обратной амплификации.

На РИС. 14 показана конструкция селективной библиотеки. Библиотека была построена на данных известной гуанозин- и дезоксигуанозинсвязывающей РНК (Пиковская, 2013).

На РИС. 15 показана иллюстрация аптамера оксида графена (GrO). На этапе (1) РНК транскрибировали и очищали. На этапе (2) очищенную РНК элюировали. На этапе (3) аптамеры инкубировали контр-мишенями и буфером. На этапе (4) последовательности, связанные с контр-мишенями или буферными компонентами, удаляли оксидом графена.

5 На этапе (5) методом центрифугирования разделяли необычно чувствительные виды в супернатанте, которые затем отбрасывались. Две дополнительные 5-минутные промывки удаляли большую часть последовательностей, связывающих и сливающих остаточные контр-мишени, и буфер. На этапе (6) раствор ацикловира в 1X буфере выбора добавляли в GrO-связанную библиотеку для положительного отбора, тем самым
10 потенциальные последовательности аптамера десорбируют из GrO посредством взаимодействия с положительной мишенью. На этапе (7) посредством заключительного этапа центрифугирования разделяли последовательности, связывающие мишень, в супернатанте из нечувствительных последовательностей, все еще адсорбированных до GrO. На этапе (8) выбранные последовательности подвергали обратной транскрипции, затем библиотеку амплифицировали с помощью PCR, после чего транскрибировали с целью генерации библиотеки для следующего раунда отбора.

На РИС. 16 показана иллюстрация параллельной оценки оксида графена. Обогащенные библиотеки, подвергающиеся параллельной оценке, были разделены на четыре равные части. Затем образцы библиотек добавляли к оксиду графена и
20 инкубировали с целью загрузки библиотеки в оксиде графена. Для удаления несвязывающего материала проводили две 5-минутные промывки. Для положительного образца (ацикловира) и специальной мишени (пенцикловира) каждая мишень была приготовлена отдельно в 1X буфере выбора до 1 мкМ; контр-мишень заменила положительную мишень 10 мкМ каждой контр-мишени в растворе; отрицательный
25 образец заменил положительную мишень равным объемом свободной от нуклеазы воды. Затем образцы объединяли с соответствующими препаратами оксида графена и инкубировали. После инкубации образцы центрифугировали для извлечения их супернатантов, и восстановление библиотеки определяли по показаниям спектрофотометра NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific, Уилмингтон, штат Делавэр).
30 Оставшийся образец библиотеки анализировали на денатурирующем ПААГ. Фотографии гелей были сделаны после окрашивания/обесцвечивания с помощью Gel-Star. Для последующего раунда параллельной оценки восстанавливали полосы, соответствующие ожидаемому размеру библиотеки, при этом положительная ацикловир-мишень заменяет контр-мишени для целей инкубации с предварительной загрузкой
35 образцов отрицательных, контр- и специальных мишеней. Материал, восстановленный после второй параллельной оценки, использовался для установления последовательности и анализа.

На РИС. 17 представлены семь кандидатов-аптамеров против ацикловира. Свободную энергию для каждого аптамера вычисляли при 37°C и с использованием 1 M Na+Quikfold
40 3.0 (Zuker, 2003). Последовательности были определены посредством собственных алгоритмов. Подчеркнутые области в каждой последовательности представляют собой области нормализации праймера PCR.

На РИС. 18 представлены семь кандидатов-аптамеров против пенцикловира. Свободную энергию для каждого аптамера вычисляли при 37°C и с использованием 1
45 M Na+Quikfold 3.0 (Zuker, 2003). Последовательности были определены посредством собственных алгоритмов. Подчеркнутые области в каждой последовательности представляют собой области нормализации праймера PCR.

На РИС. 19А приведена схема вариантов IL7Rα, испытанных на

лимфопролиферативную активность/выживаемость при экспрессии в МКПК. На РИС. 19В представлена гистограмма, показывающая процент жизнеспособности МКПК в присутствии и отсутствии IL-2.

На РИС. 20 представлен график эффективности трансдукции в отношении ПУМ для отрицательно выбранных и нестимулированных Т-клеток, трансдуцированных с использованием лентивирусов, псевдотипированных либо VSV-G, либо усеченных версий полипептидов ВК (Ed) F и H. Символы расположены в шахматном порядке для большей наглядности.

На РИС. 21 показан график, демонстрирующий что нацеленные на дзета-цепь CD3 miРНК, которые находятся в интроне промотора EF-1-альфа, способны к подавлению экспрессии комплекса CD3.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Используемый здесь термин «химерный антигенный рецептор» или «CAR» относится к спроектированным рецепторам, которые прививают антигенную специфичность клеткам, например Т-клеткам, НК-клеткам, макрофагам и стволовым клеткам. CAR согласно изобретению включают по меньшей мере одну антигенспецифическую область для нацеливания (ASTR) и внутриклеточный активирующий домен (ВАД) и может включать стебель, трансмембранный домен (ТМ) и один или несколько ко-стимулирующих доменов (КСД). В другом варианте осуществления CAR является биспецифическим CAR, который специфичен для двух разных антигенов или эпитопов. После того, как ASTR связывается специфически с целевым антигеном, ВАД активирует внутриклеточную сигнальную систему. Например, ВАД может перенаправлять Т-клеточную специфичность и реакционную способность по отношению к выбранной мишени с ограничением, не связанным с МНС, с использованием антиген-связывающих свойств антител. Ограничение антигена, не связанное с МНС, дает Т-клеткам, экспрессирующим CAR, способность распознавать антиген, не зависящую от процесса обработки антигена, тем самым минуя основной механизм ускользания от опухоли. Более того, при экспрессии в Т-клетках CAR преимущественно не димеризуются с эндогенными цепями Т-клеточного рецептора (ТКР) и бета-цепями.

Используемый здесь термин «микроокружение» означает любую часть или область ткани или тела, которая имеет постоянные или временные, физические или химические отличия от других областей ткани или областей тела. Например, понятие «микроокружение опухоли», используемое здесь, относится к среде, в которой существует опухоль и которая является неклеточной областью внутри опухоли и областью непосредственно вне опухолевой ткани, но не относится к внутриклеточному отделению самой клетки рака. Микроокружение опухоли может относиться к любым и всем условиям опухолевой среды, включая условия, которые создают структурную и функциональную среду для выживания и/или увеличения и/или распространения злокачественного процесса. Например, микроокружение опухоли может включать изменения в таких условиях, как, но не ограничиваясь этим, давление, температура, рН, ионная сила, осмотическое давление, осмоляльность, окислительный стресс, концентрация одного или нескольких растворенных веществ, концентрация электролитов, концентрация глюкозы, концентрация гиалуроновой кислоты, концентрация молочной кислоты или лактата, концентрация альбумина, уровни аденозина, уровни R-2-гидроксиглутарата, концентрация пирувата, концентрация кислорода и/или наличие окислителей, восстановителей или сопутствующих факторов, а также другие условия, которые понятны квалифицированному специалисту.

Используемые здесь взаимозаменяемые термины «полинуклеотид» и «нуклеиновая

кислота» относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо рибонуклеотидам, либо дезоксирибонуклеотидам. Таким образом, этот термин включает, но не ограничивается, одно-, двух- или многоцепочечную ДНК или РНК, геномную ДНК, кДНК, гибриды ДНК-РНК или полимер, содержащий пуриновые и

5 пириимидиновые основания или другие природные, химически или биохимически модифицированные, искусственные или дериватизированные нуклеотидные основания.

Используемый здесь термин «антитело» включает поликлональные и моноклональные антитела, в том числе интактные антитела и фрагменты антител, которые сохраняют специфическое связывание с антигеном. Фрагментами антител могут быть, но не

10 ограничиваются ими, фрагменты антиген-связывания (Fab), фрагменты Fab', фрагменты F(ab')₂ фрагменты Fv, фрагменты Fab'-SH, фрагменты (Fab')₂ Fv, фрагменты Fd, рекомбинантные фрагменты IgG (rIgG), фрагменты одноцепочечных антител, включая одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), двухвалентные scFv's, трехвалентные scFv's и единичные фрагменты антитела домена (например, sdAb, sdFv, нанотело).

15 Термин включает в себя генно-модифицированные и/или другим образом модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как внутримышечные антитела, пептидные антитела, химерные антитела, одноцепочечные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела, слитые белки, включая антигенспецифическую нацеливающую область антитела и белки не антител,

20 гетероконъюгатные антитела, мультиспецифические, например, биспецифические, антитела, диатомы, триаболы и тетрабутиды, тандемные ди-scFv's и тандемные три-scFv's. Если не указано иное, термин «антитело» следует понимать как включающий в себя фрагменты функциональных антител. Термин также включает интактные или полноразмерные антитела, в том числе антитела любого класса или подкласса, включая

25 IgG и его подклассы, IgM, IgE, IgA и IgD.

Используемый здесь термин «фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, например антиген-связывающую или вариабельную область интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv фрагменты; диатела; линейные антитела (Zapata и соавт., Protein Eng., 8 (10): 1057-1062 (1995));

30 молекулы одноцепочечных антител; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Расщепление антител папаином дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых «Fab» фрагменты, каждый из которых имеет один антиген-связывающий участок, и остаточный «Fc» фрагмент, обозначение, отражающее способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином дает фрагмент

35 F(ab')₂, который имеет два антигенсвязывающих участка, и по-прежнему сохраняет способность к перекрестному сшиванию антигена.

Взаимозаменяемыми терминами здесь будут «одноцепочечные фрагменты Fv», «scFv» или «sFv», которые включают домены V_H и V_L антитела, причем эти домены

40 присутствуют в одной полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fv дополнительно включает полипептидный линкер или спейсер между доменами V_H и V_L, который позволяет sFv образовывать желаемую структуру для связывания антигена. Описание sFv см. в Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, стр. 269-315

45 (1994).

Используемый здесь термин «встречающиеся в природе» области V_H и V_L относятся к доменам V_H и V_L, которые были выделены из клетки-хозяина без дальнейшей молекулярной эволюции с целью изменения их аффинности при генерировании в формате

scFv в определенных условиях, например, условиях, раскрытых в патенте США 8709755 B2 и заявке на патент WO/2016/033331A1.

Используемый здесь термин «степень сродства/аффинность» относится к константе равновесия для обратимого связывания двух веществ и выражается как константа диссоциации (K_d). Степень сродства может быть по меньшей мере в 1 раз больше, по меньшей мере в 2 раза больше, по меньшей мере в 3 раза больше, по меньшей мере в 4 раза больше, по меньшей мере в 5 раз больше, по меньшей мере в 6 раз больше, по меньшей мере в 7 раз больше, по меньшей мере в 8 раз больше, по меньшей мере в 9 раз больше, по меньшей мере в 10 раз больше, по меньшей мере в 20 раз больше, по меньшей мере в 30 раз больше, по меньшей мере в 40 раз больше, по меньшей мере в 50 раз больше, по меньшей мере в 60 раз больше, по меньшей мере в 70 раз больше, по меньшей мере в 80 раз больше, по меньшей мере в 90 раз больше, по меньшей мере в 100 раз больше или, по меньшей мере, в 1000 раз больше или более, чем степень сродства антитела для несвязанных аминокислотных последовательностей. Аффинность антитела к целевому белку может быть, например, равна примерно от 100 наномолярных единиц (нМ) до примерно 0,1 нМ, от примерно 100 нМ до примерно 1 пикомолярной единицы (пМ) или от примерно 100 нМ до примерно 1 фемтомолярной единицы (фМ) или больше. Используемый здесь термин «авидность» относится к сопротивлению комплекса из двух или более агентов к диссоциации после разбавления. Термины «иммунореактивный» и «преимущественно связывают» здесь взаимозаменяемы в отношении антител и/или антиген-связывающих фрагментов.

Используемый здесь термин «связывание» относится к прямой связи между двумя молекулами в результате, например, ковалентных, электростатических, гидрофобных и ионных и/или водородных взаимодействий, включая такие взаимодействия, как солевые мостики и водные мостики. Неспецифическое связывание относится к связыванию с аффинностью менее примерно 10^{-7} М, например связывание с аффинностью равно 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М и т.д.

Используемая здесь ссылка на «систему экспрессии клеточной поверхности» или «систему отображения поверхности клетки» относится к отображению или экспрессии белка или его части на поверхности клетки. Как правило, генерируется клетка, которая экспрессирует представляющие интерес белки, слитые с белком клеточной поверхности. Например, белок экспрессируется в виде слитого белка с трансмембранным доменом.

Используемый здесь термин «элемент» включает полипептиды, в том числе слияния полипептидов, области полипептидов и их функциональные мутагены или фрагменты, а также полинуклеотиды, включая микроРНК и shРНК, и их функциональные мутагены или фрагменты.

Используемый здесь термин «область» обозначает любой сегмент полипептида или полинуклеотида.

Используемый здесь термин «домен» обозначает область полипептида или полинуклеотида с функциональным и/или структурным свойством.

Используемый здесь термин «стебель» или «домен стебля» относится к гибкому полипептидному соединителю, обеспечивающему структурную гибкость и расстояние до фланкирующих полипептидных областей и может состоять из натуральных или синтетических полипептидов. Стебель может быть получен из шарнира или шарнирной области иммуноглобулина (например, IgG1), который обычно определяется как растяжение от Glu216 до Pro230 человеческого IgG1 (Burton (1985) Molec. Immunol., 22: 161-206). Шарнирные области других изотипов IgG могут быть выровнены последовательностью IgG1, путем помещения первого и последнего цистеинового

остатков, образующих межзубные дисульфидные связи (S-S), в одну позицию. Стебель может иметь природное происхождение или искусственное происхождение, включая, но не ограничиваясь, измененную шарнирную область, как описано в патенте США №5677425. Стебель может включать полную шарнирную область, полученную из

5 антитела любого класса или подкласса. Стебель может также включать области, полученные из CD8, CD28 или других рецепторов, которые обеспечивают аналогичную функцию по обеспечению гибкости и расстояния до фланкирующих областей.

Используемый здесь термин «выделенный» означает, что материал удален из его первоначальной среды (например, естественной среды, если материал встречается в

10 природе). Например, природный полинуклеотид или полипептид, присутствующий в живом организме, не выделяют, но тот же полинуклеотид или полипептид, отделенный от некоторых или всех сосуществующих материалов в естественной системе, выделяют. Такие полинуклеотиды могут быть частью вектора, и/или такие полинуклеотиды или полипептиды могут быть частью композиции и все же быть выделены, при этом такой

15 вектор или композиция не являются частью его естественной среды.

Используемый здесь термин «полипептид» представляет собой одну цепь аминокислотных остатков, связанных пептидными связями. Полипептид не складывается в фиксированную структуру и не имеет посттрансляционной модификации. «Белок» представляет собой полипептид, который складывается в фиксированную структуру.

20 Понятия «полипептиды» и «белки» здесь являются взаимозаменяемыми.

Используемый здесь полипептид может быть «очищен» для удаления загрязняющих компонентов природной среды полипептида, например, материалы, которые будут мешать диагностическому или терапевтическому применению полипептида, таких как, например, ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные

25 вещества. Полипептид может быть очищен (1) до более чем 90%, более 95% или более 98% по массе антитела, как определено методом Лоури, например, более 99 мас. %, (2) - степень, достаточная для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающимся стаканом или (3) для гомогенности электрофорезом в полиакриламидном

30 геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГ) в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с окрашиванием Кумасси синим или серебряным.

Используемый здесь термин «иммунные клетки» обычно включает белые кровяные клетки (лейкоциты), которые получены из гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), вырабатываемых в костном мозге. «Иммунные клетки» включают, например,

35 лимфоциты (Т-клетки, В-клетки, клетки естественного киллера (ЕК)) и клетки, полученные из миелоидов (нейтрофил, эозинофил, базофил, моноцит, макрофаг, дендритные клетки).

Используемый здесь термин «Т-клетка» включает в себя все типы иммунных клеток, экспрессирующих CD3, включая Т-хелперы (клетки CD4⁺), цитотоксические Т-клетки (клетки CD8⁺), Т-регуляторные клетки (Treg) и гамма-дельта-Т-клетки.

40

Используемый здесь термин «цитотоксическая клетка» включает в себя Т-клетки CD8⁺, клетки естественного киллера (ЕК), (ЕК-Т-клетки), $\gamma\delta$ -Т-клетки, субпопуляцию клеток CD4⁺ и нейтрофилы, которые являются клетками, способными опосредовать

45 ответы на цитотоксичности.

Используемый здесь термин «стволовая клетка» обычно включает плюрипотентные или мультипотентные стволовые клетки. «Стволовые клетки» включают, например, эмбриональные стволовые клетки (ES); мезенхимальные стволовые клетки (MSC);

индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS); и целые клетки-предшественники (гематопозитические стволовые клетки (HSC), клетки, полученные из костного мозга, и т.д.).

Используемые здесь термины «терапия», «лечение» и т.п. относятся к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного лечения заболевания и/или нежелательного явления, связанного с заболеванием. Понятие «лечение», используемое здесь, охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, например человека, и включает: а) предотвращение возникновения заболевания у испытуемого, который может быть предрасположен к заболеванию, но еще не был диагностирован как имеющий его; (b) ингибирование заболевания, то есть прекращение его развития; и (с) облегчение течения заболевания, т.е. вызвавшее уменьшение заболевания.

Используемые здесь взаимозаменяемые термины «человек», «испытуемый», «хозяин» и «пациент» относятся к млекопитающему, включая, но не ограничиваясь, людей, мышей (например, крыс, мышей), лагоморфов (например, кролики), нечеловекообразных приматов, люди, представителей семейства псовых, кошачьих, копытных (например, лошади, быки, овечки, свиньи, собаки) и т.д.

Используемые здесь термины «терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» относятся к количеству вещества или комбинированным количествам двух веществ, которые при введении млекопитающему или другому испытуемому в ходе лечения заболевания являются достаточными для воздействия на ход лечения такого заболевания. Значение «терапевтически эффективного количества» будет варьироваться в зависимости от веществ (а), заболевания и его тяжести, а также от возраста, веса и т.д. испытуемого, подлежащего лечению.

Используемый здесь термин «эволюция» или «эволюционирование» относится к использованию одного или нескольких способов мутагенеза для получения иного полинуклеотида, кодирующего другой полипептид, который сам является улучшенной биологической молекулой и/или способствует образованию другой улучшенной биологической молекулы. «Физиологические» или «нормальные» или «нормальные физиологические» условия - это такие условия, как, помимо прочего, давление, температура, pH, ионная сила, осмотическое давление, осмоляльность, окислительный стресс, концентрация одного или нескольких растворенных веществ, концентрация электролитов, концентрация глюкозы, концентрация гиалуронана, концентрация молочной кислоты или лактата, концентрация альбумина, уровни аденозина, уровни R-2-гидроксиглутарата, концентрация пирувата, концентрация кислорода и/или наличие окислителей, восстановителей или сопутствующие факторы, а также другие условия, которые будут рассматриваться в пределах нормального диапазона в месте введения, или в ткани или организме в месте воздействия, испытуемому.

Используемый здесь термин «генетически модифицированная клетка» включает клетки, которые содержат экзогенные нуклеиновые кислоты независимо от того, включены ли экзогенные нуклеиновые кислоты в геном клетки.

Используемый здесь термин «полипептид» может включать часть или целую молекулу белка, а также любые посттрансляционные или другие модификации.

Используемый здесь элемент псевдотипирования может включать «связывающий полипептид», включающий один или несколько полипептидов, обычно гликопротеинов, которые идентифицируют и связывают целевую клетку-хозяина и один или несколько

«фузогенных полипептидов», которые опосредуют слияние ретровирусной и целевой клетки-хозяина мембраны, тем самым позволяя ретровирусному геному проникать в целевую клетку-хозяин. Используемый здесь «связывающий полипептид» также может упоминаться как «Т-клеточный и/или НК-связывающий полипептид» или «элемент связывания с мишенью», а «фузогенный полипептид» также может упоминаться как «фузогенный элемент».

«Покоящийся» лимфоцит, такой как, например, покоящаяся Т-клетка, представляет собой лимфоцит на стадии G0 клеточного цикла, который не экспрессирует маркеры активации, такие как Ki-67. Покоящиеся лимфоциты могут включать в себя наивные Т-клетки, которые никогда не сталкивались с определенными антигенами и Т-клетками памяти, которые были изменены предыдущим столкновением с антигеном.

«Покоящийся» лимфоцит можно также назвать «неподвижным» лимфоцитом.

Используемый здесь термин «лимфодеплегия» включает в себя способы, которые уменьшают количество лимфоцитов у испытуемого, например, путем введения вещества для лимфодеплеции. Лимфодеплегия также может быть достигнута путем частичной радиационной терапии части тела или всего организма. Лимфоудоминирующим агентом может быть химическое соединение или композиция, способная уменьшать количество функциональных лимфоцитов у млекопитающих при их введении млекопитающему. Одним из примеров такого агента является один или несколько химиотерапевтических веществ. Такие вещества и дозы известны и могут быть выбраны лечащим врачом в зависимости от характеристик пациента, подлежащего лечению. Примеры веществ для лимфодеплеции включают, но не ограничиваются ими, флударабин, циклофосфамид, кладрибин, денилейкин-дрейфтокс или их комбинации.

Следует понимать, что настоящее изобретение, а также аспекты и варианты осуществления, представленные здесь, не ограничиваются конкретными раскрытыми примерами, так как они, разумеется, могут меняться. Следует также понимать, что используемая здесь терминология предназначена только для описания конкретных примеров и вариантов осуществления и не предназначена ограничить исследования, поскольку область настоящего изобретения будет ограничена только прилагаемой формулой изобретения.

В тех случаях, когда предоставляется диапазон значений, следует понимать, что каждое промежуточное значение до десятой части нижней границы, если контекстом явно не предусмотрено иное, между верхней и нижней границей этого диапазона и любым другим заявленным или промежуточным значением в указанном диапазоне, включено в данное описание. Верхние и нижние границы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также охватываются изобретением с учетом любого особо изъятых предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает одну или обе границы, в изобретение также включены диапазоны, исключаяющие одну или обе из указанных включенных границ. Когда заданы множественные нижние и множественные верхние значения для диапазонов, квалифицированный специалист должен понимать, что выбранный диапазон будет содержать нижнее значение, которое меньше, чем верхнее значение. Все заголовки в этом описании предназначены для удобства читателя и не ограничивают его содержания.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, которые обычно понимаются специалистом в данной области техники, к которому относится настоящее изобретение. Несмотря на то, что любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным здесь, могут также использоваться в практике или испытаниях настоящего изобретения, на данный момент

описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые здесь, включены путем ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми цитируются публикации.

Следует отметить, что в данном описании и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают множественное число, если из контекста явно не следует иное. Так, например, ссылка на «химерный антигенный рецептор» включает в себя множество таких химерных антигенных рецепторов и их эквивалентов, известных специалистам в данной области техники, и так далее. Кроме того, следует отметить, что возможно составление формулы изобретения для исключения любого необязательного элемента. Таким образом, данное заявление предназначено для использования в качестве предшествующей основы для использования такой исключительной терминологии, как «исключительно», «только» и т.п. в связи с декламацией элементов претензии или использованием «отрицательного» ограничения.

Понятно, что некоторые особенности изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть представлены вместе в одном варианте осуществления. И наоборот, различные особенности изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть представлены отдельно или в любой подходящей подкомбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящихся к изобретению, прямо охватываются настоящим изобретением и раскрыты здесь точно так же, как если бы каждая комбинация была индивидуально и явно раскрыта. Кроме того, все подкомбинации различных вариантов осуществления и их элементов также прямо охвачены настоящим изобретением и раскрыты здесь точно так же, как если бы каждая такая подкомбинация была индивидуально и явно раскрыта здесь.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение разрешает вопросы предшествующего уровня техники путем предоставления способов и составов для генетической модификации лимфоцитов и способов проведения адаптивной клеточной терапии, которые включают трансдукцию Т-клеток и/или НК-клеток, что требует гораздо меньшего времени *ex vivo*, например, 24, 12, или 8 часов или менее, а в некоторых вариантах осуществления без предварительной стимуляции *ex vivo*. Эти способы хорошо подходят для замкнутой системы *ex vivo* анализа крови у испытуемого и могут выполняться при присутствии испытуемого в том же помещении, что и/или в некоторых вариантах осуществления, в пределах их прямой видимости клеток крови или выделенной клеток крови, т.е. во время осуществления всего способа. Более конкретно, аспекты и варианты осуществления раскрытого здесь изобретения разрешают вопросы, связанные с текущими адаптивными клеточными терапиями, путем предоставления способов для трансдукции покоящихся Т-клеток и/или покоящихся НК-клеток, которые обычно используют элемент псевдотипирования, облегчающий связывание и слияние рекомбинантного ретровируса с покоящейся Т-клеткой и/или покоящейся НК-клеткой для упрощенной генетической модификации покоящихся Т-клеток и/или НК-клеток рекомбинантными ретровирусами. Кроме того, способы, приведенные в настоящем документе, разрешают вопросы в данной области техники, используя в иллюстративных вариантах осуществления химерный антигенный рецептор и лимфопролиферативный элемент, экспрессия которого находится под контролем контрольного элемента *in vivo*, так что воздействие испытуемого на соединение, которое связывает контрольный элемент *in vivo*, или прекращение такого воздействия, способствует увеличению генетически модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток *in vivo*.

В результате этих и других улучшений, подробно описанных здесь, в одном из аспектов представлен способ модификации покоящихся Т-клеток и/или покоящихся НК-клеток испытуемого, например пациента, имеющего заболевание или расстройство, при которых у него отбирается кровь; покоящиеся Т-клетки и/или НК-клетки генетически модифицированы путем их взаимодействия с рекомбинантный ретровирусом; и генетически модифицированные клетки повторно вводятся испытуемому обычно в течение более короткого периода времени, чем в предшествующих способах, например, в течение 24 часов и в некоторых неограничивающих вариантах осуществления в течение 12 часов и/или без дальнейшего увеличения популяции генетически модифицированных Т-клеток и/или НК-клетки *ex vivo*, например, в результате чего генетически модифицированные покоящиеся Т-клетки и/или НК-клетки не подвергаются более чем 4 клеточным делениям *ex vivo*. Таким образом, предлагаемые здесь способы могут быть осуществлены за гораздо меньшее время, чем текущие варианты CAR-терапии, тем самым обеспечивая процессы, с помощью которых испытуемый может оставаться в клинике на протяжении всего времени выполнения этапов *ex vivo*. Это в свою очередь облегчает выполнение этапов *ex vivo* в закрытой системе, уменьшая тем самым шансы на загрязнение и смешение образцов пациента и еще больше облегчая их выполнение в клинических лабораториях.

Соответственно, на РИС. 1 и 2 представлены принципиальные схемы иллюстративных композиций, используемых в способах, представленных в настоящем документе. На РИС. 1 представлена схема упаковывающей клетки (100) и рекомбинантного ретровируса, вырабатываемого упаковывающей клеткой (200). Упаковывающая клетка (100) содержит рекомбинантные полинуклеотиды (110), включенные в ее геном, которые включают рекомбинантные транскрипционные элементы, экспрессирующие ретровирусные белки и различные мембраносвязанные полипептиды под контролем индуцируемых промоторов, регулируемых трансаактиваторами, которые связываются и активируются посредством лиганд. Такие трансаактиваторы, индуцируемые промоторы и лиганды используются для индукции последовательной экспрессии и накопления клеточных мембранных полипептидов, которые будут включены в мембрану рекомбинантного ретровируса, а также ретровирусных компонентов, необходимых для упаковки и сборки ретровируса.

В результате последовательной индуцированной экспрессии различных полинуклеотидов, как подробно описано ниже, иллюстративная упаковывающая клетка (100), представленная на РИС. 1, вырабатывается, и может быть использован в иллюстративных способах для получения рекомбинантных ретровирусов, используемых в способах трансфекции покоящихся Т-клеток и/или НК-клеток (300), представленных на РИС. 2). Упаковывающая клетка (100) в неограничивающих иллюстративных вариантах осуществления содержит в своем геноме нуклеиновые кислоты, кодирующие упакованный ретровирусный РНК-геном, который включает по меньшей мере некоторые из элементов ретровирусного генома, необходимые для упаковки и сборки ретровируса (в качестве неограничивающих иллюстративных примеров выступают ретровирусный пси-элемент, ретровирусный gag-полипептид и ретровирусный pol-полипептид).

Некоторые мембраносвязанные полипептиды, включенные или связанные с клеточной мембраной упаковывающей клетки, будут включены или связаны с ретровирусом, но не кодируются ретровирусным геномом. Например, упаковывающая клетка и рекомбинантный ретровирус, образованный из нее, может включать ретровирусный полипептид гена Vpr (250), который в неограничивающих иллюстративных примерах

может быть экспрессирован в виде слитого белка, связанного с мембраной, например полипептида Src-Flag-Vpx; элемента псевдотипирования, который может включать связывающий полипептид и фузогенный полипептид (240), в неограничивающем варианте осуществления включающий гемагглютининовый (H) полипептид вируса кори и слитый (F) полипептид вируса кори или варианты их делеции в цитоплазматической области; необязательно один или несколько элементов активации (210, 220), которые в неограничивающем варианте осуществления включают мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD3 и мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD28; и/или необязательно мембраносвязанный цитокин (230), неограничивающим вариантом осуществления которого является слитый полипептид, включающий IL-7, слитый с DAF-фактором, или его фрагмент. В настоящем документе представлены различные другие специфические типы таких мембраносвязанных полипептидов.

В результате последовательной экспрессии транскрипционных элементов упаковывающей клеткой получают рекомбинантный ретровирус. Ретровирусный геном РНК внутри и, как правило, интегрированный в геном упаковывающей клетки, которая становится геномом рекомбинантного ретровируса, включает ретровирусные компоненты (в качестве неограничивающих иллюстративных примеров выступают ретровирусные Gag- и Pol-полинуклеотиды), необходимые для ретровирусного производства, инфицирования и интеграции в геном клетки-хозяина, которой обычно является покоящаяся Т-клетка и/или НК-клетка. Кроме того, ретровирусный геном дополнительно включает полинуклеотиды, кодирующие один или, как правило, два сконструированных сигнальных полипептида, описанных в настоящем документе. Один из сконструированных сигнальных полипептидов обычно кодирует лимфопролиферативный элемент (в неограничивающих примерах - конститутивный мутант рецептора интерлейкина-7), а другой сконструированный сигнальный полипептид обычно кодирует химерный антигенный рецептор.

После это рекомбинантный ретровирус (200) используют для трансдуцирования покоящейся Т-клетки и/или покоящейся НК-клетки (300) способами, описанными в настоящем документе. Как показано на РИС. 2, после того, как покоящаяся Т-клетка и/или НК-клетка (300) взаимодействует с рекомбинантным ретровирусом (200), описанные выше мембранные полипептиды на поверхности ретровируса связываются с рецепторами и/или лигандами на поверхности покоящейся Т-клетки и/или НК-клетки (300). Например, элемент псевдотипирования, который, как указано выше, может включать связывающий полипептид, связывающийся с молекулами на поверхности покоящихся Т-клеток и/или покоящихся НК-клеток, и фузогенный полипептид, облегчающий связывание и слияние ретровируса (200) с мембраной Т-клетки и/или НК-клетки. Элементы активации (210, 220) активируют покоящуюся Т-клетку и/или НК-клетку (300) путем взаимодействия с рецепторным комплексом Т-клеток, процесс, который происходит во время взаимодействия или после инкубации. Кроме того, мембраносвязанные цитокины (230) могут присутствовать на поверхности ретровируса и связывать рецепторы цитокинов (310) на поверхности покоящейся Т-клетки и/или НК-клетки (300), тем самым дополнительно способствуя связыванию и активации. Таким образом, не ограничиваясь теорией, в иллюстративных вариантах осуществления, представленных здесь, в результате одного или нескольких из этих компонентов рекомбинантного ретровируса (200), стимуляции *ex vivo* или активации элементом, который еще не находится в или на ретровирусе (200), не требуется. Это, в свою очередь, помогает сократить время *ex vivo*, необходимое для завершения способов, описанных

в приведенных здесь иллюстративных вариантах.

Сразу после связывания с Т-клеткой и/или НК-клеткой (200) ретровирус сливается с Т-клеткой и/или НК-клеткой (300), а полипептиды и нуклеиновые кислоты в ретровирусе входят в Т-клетку и/или НК-клетку (300). Как указано выше, одним из этих полипептидов в ретровирусе является полипептид гена Vpx (250). Полипептид гена Vpx (250) связывает и индуцирует снижение уровня рестрикционного фактора SAMHD1 (350), который снижает уровень свободных дНТФ в цитоплазме. Таким образом, концентрация свободных дНТФ в цитоплазме возрастает по мере того, как ген Vpx снижает уровень SAMHD1, а активность обратной транскрипции увеличивается, что облегчает обратную транскрипцию ретровирусного генома и введение Т-клеток и/или НК-клеток в геном.

После введение ретровирусного генома в Т-клетку и/или НК-клетку (200) геном Т-клеток и/или НК-клеток включает нуклеиновые кислоты, кодирующие сигнальный полипептид, который в свою очередь кодирует лимфопролиферативный элемент (370), и, необязательно, сигнальный полипептид, кодирующий CAR (360). Экспрессия лимфопролиферативного элемента и, необязательно, CAR управляется контрольным элементом *in vivo*. Воздействие соединения, связывающего контрольный элемент *in vivo*, которое происходит *in vivo* посредством введения его испытуемому, чья Т-клетка и/или НК-клетка (300) трансдуцирована, способствует пролиферации Т-клеток и/или НК-клеток (300) *in vivo* в результате экспрессии лимфопролиферативного элемента и, необязательно, в результате экспрессии CAR и связывания CAR с его клеткой-мишенью. Таким образом, Т-клетки и/или НК-клетки, в данном случае трансдуцированные рекомбинантными ретровирусами, имеют один или несколько сигналов, которые приводят к пролиферации и/или запуску гибели клеток, что, в свою очередь, в иллюстративных вариантах, не отвечает требованиям предыдущих способов уменьшения числа лимфоцитов в клетке-хозяина до возвращения трансдуцированных Т-клеток и/или НК-клеток обратно в организм испытуемого. Это, в свою очередь, в иллюстративных вариантах осуществления дополнительно уменьшает необходимое число дней обработки до того, как трансдуцированные Т-клетки и/или НК-клетки снова будут введены испытуемому. Таким образом, в иллюстративных вариантах осуществления требуется не более 36 часов, 24 часов, 12 часов или, в некоторых случаях, даже 8 часов с момента забора крови у пациента до повторного введения ему крови, что принципиально меняет CAR-T по сравнению с предыдущими способами. Кроме того, контрольный элемент *in vivo* обеспечивает также один из механизмов безопасности, предусмотренных настоящим изобретением. Например, прекращение введения соединения может снизить или даже прекратить экспрессию лимфопролиферативного элемента и, необязательно, CAR, тем самым завершая пролиферацию и/или сигнал выживания, передаваемый в трансдуцированную Т-клетку и/или НК-клетку и ее потомству.

СПОСОБЫ ПРОВЕДЕНИЯ АДОПТИВНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

В некоторых аспектах, представленных здесь, описаны способы проведения адоптивной клеточной терапии на пациенте. В качестве иллюстративного примера способ может включать следующее:

- забор крови у любого пациента;
- выделение моноклеарных клеток периферической крови (РВМС), содержащих полежащие Т-клетки и/или полежащие НК-клетки;
- взаимодействие полежащих Т-клеток и/или полежащих НК-клеток пациента *ex vivo* с рекомбинантными ретровирусами, причем рекомбинантные ретровирусы содержат псевдотипирующий элемент на своей поверхности, который способен связывать

покояющуюся Т-клетку и/или НК-клетку и облегчает слияние мембран рекомбинантного ретровируса, при этом указанное взаимодействие облегчает трансдукцию покоящихся Т-клеток и/или НК-клеток посредством рекомбинантных ретровирусов, тем самым производя генно-модифицированные Т-клетки и/или НК-клетки; и

- 5 повторное введение генно-модифицированных клеток пациенту в течение 36, 24, 12 или даже 8 часов после сбора крови у пациента, тем самым выполняя ему адоптивную клеточную терапию.

В некоторых аспектах, представленных здесь, способы с аналогичными этапами называются способами генетической модификации и увеличения лимфоцитов у
10 испытуемого. Специалист в данной области техники поймет, что обсуждаемое здесь изобретение относится к способам и составам для проведения адаптивной клеточной терапии, также относится к способам генетической модификации и увеличения лимфоцитов у испытуемого.

Как правило, способы адаптивной клеточной терапии по настоящему изобретению
15 осуществляются путем аутологичного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают от испытуемого, который должен проходить клеточную терапию, или из образца, полученного от такого испытуемого. Таким образом, в некоторых аспектах клетки получают от испытуемого, например пациента, нуждающегося в лечении, а после выделения и обработки их вводят тому же
20 испытуемому. В некоторых вариантах осуществления описанных здесь способов и составов испытуемый, имеющий заболевание или нарушение, приходит в медицинское учреждение, где у него известными способами берется кровь, таким как венепункция. В некоторых вариантах объем крови, взятый у испытуемого, равен от 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75 или 100 мл на нижней границе диапазона до 200, 250, 300, 350, 400, 500,
25 750, 1000, 2000 или 2500 мл на верхней границе диапазона. В некоторых вариантах осуществления у пациента отбирают 10-400 мл крови. В некоторых вариантах осуществления у пациента отбирают 20-250 мл крови. В некоторых вариантах осуществления кровь свежееотобранная в процессе ее обработки. В любом из вариантов осуществления, раскрытых здесь, свежей кровью может быть кровь, которая была
30 взята у пациента менее 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 минут назад. В некоторых вариантах осуществления кровь обрабатывается способами, представленными здесь, без хранения.

взаимодействие между Т-клетками и/или НК-клетками и рекомбинантными ретровирусами обычно облегчает трансдукцию Т-клеток и/или НК-клеток
35 рекомбинантным ретровирусом. По всему тексту настоящего изобретения трансдуцированная Т-клетка и/или НК-клетка включает потомство трансформированных *ex vivo* клеток, которые сохраняют по меньшей мере некоторые из нуклеиновых кислот или полинуклеотидов, входящих в клетку во время трансдукции *ex vivo*. В способах, которые здесь описывают «повторное введение» трансдуцированной
40 клетки, следует понимать, что такая клетка обычно не находится в трансдуцированном состоянии во время ее отбора из крови пациента. Испытуемым в любом из раскрытых здесь аспектов может быть, например, животное, млекопитающее, а в иллюстративных вариантах осуществления - человек.

Не ограничиваясь теорией, в неограничивающих иллюстративных способах доставка
45 полинуклеотида, кодирующего лимфопротрофирующий элемент, такой как конститутивно активный мутаген IL7, в покоящуюся Т-клетку и/или НК-клетку *ex vivo*, которая может интегрироваться в геном Т-клеток или НК-клеток, обеспечивает эту клетку драйвером для увеличения *in vivo* без необходимости в приеме

противолимфогенного средства клетки-хозяина. Таким образом, в иллюстративных вариантах осуществления испытуемый не подвергается воздействию лимфоподобного вещества в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 21 или 28 дней или в течение 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев или 6 месяцев осуществления взаимодействия, во время осуществления взаимодействия и/или в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 21 или 28 дней или в течение 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев или 6 месяцев после того, как модифицированные Т-клетки и/или НК-клетки снова были введены обратно испытуемому. Кроме того, в неограничивающих иллюстративных вариантах осуществления предлагаемые здесь способы могут быть выполнены без воздействия противолимфогенного вещества на испытуемого на этапе, когда рекомбинантный ретровирус находится во взаимодействии с покоящимися Т-клетками и/или покоящимися НК-клетками испытуемого и/или на протяжении осуществления всего способа *ex vivo*.

Следовательно, способы увеличения генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток у испытуемого *in vivo* являются признаком некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения. В иллюстративных вариантах осуществления такие способы не содержат или практически не содержат исследования *ex vivo*.

Весь этот способ/процесс, начиная с забора крови у испытуемого до ее повторного введения обратно испытуемому после трансверсии Т-клеток и/или НК-клеток *ex vivo* в неограничивающих иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения, может осуществляться в течение периода времени, равного менее 48 часов, менее 36 часов, менее 24 часов, менее 12 часов, менее 11 часов, менее 10 часов, менее 9 часов, менее 8 часов, менее 7 часов, менее 6 часов, менее 5 часов, менее 4 часов, менее 3 часов или менее 2 часов. В других вариантах осуществления весь способ/процесс, начиная с извлечения/сбора крови у испытуемого до ее повторного введения обратно испытуемому после трансверсии Т-клеток и/или НК-клеток *ex vivo* в неограничивающих иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения, осуществляется в течение периода времени, равного 1-12 часа, 2-8 часа, 4-12 часа, 4-24 часа, 8-24 часа, 8-36 часа, 8-48 часа, 12-24 часа, 12-36 часа, 12-48 часа или в течение периода времени от 15, 30, 60, 90, 120, 180 и 240 минут на нижней границе диапазона до 120, 180 и 240, 300, 360, 420 и 480 минут на верхней границе диапазона. В других вариантах осуществления весь способ/процесс, начиная с извлечения/сбора крови у испытуемого до ее повторного введения обратно испытуемому после трансдукции Т-клеток и/или НК-клеток *ex vivo* осуществляется в течение периода времени от 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 и 12 часов при нижней границе диапазона до 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 36 или 48 часов при верхней границе диапазона. В некоторых вариантах осуществления генно-модифицированные Т-клетки и/или НК-клетки отделяются от рекомбинантных ретровирусов после периода времени, в течение которого происходит взаимодействие.

Поскольку способы, представленные здесь в отношении адаптивной клеточной терапии и связанные с ней способы модификации покоящихся Т-клеток и/или покоящихся НК-клеток *in vivo* перед их увеличением *in vivo*, могут быть осуществлены за значительно меньшее время, чем предыдущие способы с фундаментальными улучшениями в процессе лечения и безопасности пациентов, т.к. возможность изготовления препарата становится возможной. Таким образом, ожидается, что такие процессы будут благоприятными с точки зрения регулирующих органов, ответственных за утверждение данных процессов при проведении исследований *in vivo* в терапевтических целях. Например, испытуемый в неограничивающих примерах может оставаться в одном здании (например, в клинике, в которой осуществляют введение препарата) или в комнате, когда прибор обрабатывает данные крови или образца в течение всего времени, когда образец обрабатывается

перед тем, как модифицированные Т-клетки и/или НК клетки повторно вводятся пациенту. В неограничивающих иллюстративных вариантах осуществления испытуемый остается в пределах границ учреждения и/или в пределах 100, 50, 25 или 12 футов или расстояния руки от их обрабатываемой крови или клеток, во время всего способа/процесса, начиная от кровопускания/сбор крови у пациента до ее повторного введения пациенту после трансдукции Т-клеток и/или НК-клеток *ex vivo*. В других неограничивающих иллюстративных вариантах осуществления испытуемый остается в сознании, и/или по меньшей мере один человек может продолжать следить за кровью или клетками испытуемого, проходящего обследование, в течение и/или непрерывно во время осуществления всего способа/процесса, начиная от кровопускания/сбор крови у пациента до ее повторного введения пациенту после трансдукции Т-клеток и/или НК-клеток *ex vivo*. В виду улучшений, приведенных здесь, весь способ/процесс в отношении адаптивной клеточной терапии и/или трансдуирования покоящихся Т-клеток и/или НК-клеток, начиная от кровопускания/сбор крови у пациента до ее повторного введения пациенту после трансдукции Т-клеток и/или НК-клеток *ex vivo*, может осуществляться при непрерывном контроле человека. В других неограничивающих иллюстративных вариантах осуществления ни при каких обстоятельствах в течение всего периода осуществления способа/процесса, начиная от кровопускания/сбор крови у пациента до ее повторного введения пациенту после трансдукции Т-клеток и/или НК-клеток *ex vivo*, клетки крови не инкубируются в комнате, в которой отсутствует человек. В других неограничивающих иллюстративных вариантах осуществления весь способ/процесс, начиная от кровопускания/сбор крови у пациента до ее повторного введения пациенту после трансдукции Т-клеток и/или НК-клеток *ex vivo*, осуществляют рядом с испытуемым и/или в той же комнате, в которой находится испытуемый, и/или рядом с кроватью или стулом испытуемого. Таким образом, можно избежать сбоев в идентичности образцов, а также длительных и дорогостоящих инкубаций, занимающих дни и недели. Это также обеспечивается тем фактом, что предлагаемые здесь способы легко адаптируются к закрытым и автоматизированным системам обработки крови, в случае когда образец крови и ее компоненты, которые будут повторно введены испытуемому, только вступают во взаимодействие с утилизируемыми одноразовыми компонентами.

Способы осуществления адаптивной клеточной терапии, описанные в данном документе, обычно включают способы трансдукции покоящихся Т-клеток и/или НК-клеток, которые сами составляют различные аспекты настоящего изобретения. Специалисту в данной области будет понятно, что представленные здесь подробные данные по трансдукции Т-клеток и/или НК-клеток могут применяться к любому аспекту, который включает такую (ие) стадию(и). Соответственно, описанный здесь в некоторых аспектах способ представляет собой способ трансдукции Т-клетки и/или НК-клетки, обычно покоящейся Т-клетки и/или покоящейся НК-клетки, который включает взаимодействие покоящейся Т-клетки и/или покоящейся НК-клетки с рекомбинантным ретровирусом, при этом рекомбинантный ретровирус обычно содержит элемент псевдотипирования на своей поверхности, который способен связывать покоящуюся Т-клетку и/или НК-клетку и облегчает мембранное слияние рекомбинантного ретровируса с ней, причем указанное взаимодействие (и инкубация в условиях взаимодействия) облегчает трансдукцию покоящейся Т-клетки и/или НК-клеток рекомбинантными ретровирусами, в результате чего получают генно-модифицированную Т-клетку и/или НК-клетку. Другие варианты осуществления такого способа могут включать любой из вариантов осуществления ретровирусов, лимфопролиферативных элементов, CAR, элементов псевдотипирования,

рибопереключателей, элементов активации, мембраносвязанных цитокинов, miРНК и/или других элементов, описанных в настоящем документе. Такой способ трансдукции Т-клеток и/или НК-клеток может быть осуществлен *in vitro* или *ex vivo*.

В способах адаптивной клеточной терапии и любом способе, представленном здесь, который включает трансдукцию покоящихся Т-клеток и/или покоящихся НК-клеток *ex vivo*, обычно нейтрофилы/гранулоциты отделяют от клеток крови до того, как клетки вступают во взаимодействие с рекомбинантным ретровирусом. В некоторых вариантах осуществления моноклеарные клетки периферической крови (МКПК), включая лимфоциты периферической крови (ЛПК), такие как Т-клетки и/или НК-клетки, выделяют из других компонентов образца крови, используя, например, метод афереза и/или центрифугирования в градиенте плотности. В некоторых вариантах осуществления нейтрофилы удаляются до того, как МКПК и/или Т-клетки и/или НК-клетки будут обработаны, вступают во взаимодействие с рекомбинантным ретровирусом, будут трансдуцированы или трансфицированы. Что касается пациента, подлежащего лечению, его клетки могут быть аллогенными и/или аутологичными.

В качестве неограничивающих примеров в некоторых вариантах осуществления МКПК выделяют с использованием системы обработки клеток Sepax или Sepax 2 (BioSafe). В некоторых вариантах осуществления МКПК выделяют с использованием клеточного процессора CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). В некоторых вариантах осуществления используется автоматический сепаратор афереза, который отбирает кровь у пациента, передает кровь через устройство, которое сортирует конкретные типы клеток (например, МКПК), и возвращает остаток обратно в пациента. Центрифугирование в градиенте плотности может быть выполнено после афереза. В некоторых вариантах осуществления МКПК выделяют с использованием фильтра для лейкоредукции. В некоторых вариантах осуществления сортировка клеток с использованием магнитного шарика затем используется для очистки определенной популяции клеток из МКПК, такой как, например, ЛПК или их подмножество в соответствии с клеточным фенотипом (то есть положительным выбором). Могут также использоваться другие способы очистки, такие как, например, адгезия субстрата, которая использует субстрат, имитирующий среду, с которой Т-клетка сталкивается во время комплектования, позволяя им прилипать и мигрировать, или отрицательную выборку, в которой нежелательные клетки предназначены для удаления комплексами антител, которые нацелены на нежелательные клетки. В некоторых вариантах осуществления для очистки клеток может использоваться эритроцитарная розеткообразующая клетка.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления любого из указанных здесь соответствующих аспектов ЛПК включают Т-клетки и/или НК-клетки. Т-клетки и/или НК-клетки, которые взаимодействуют с рекомбинантными ретровирусами по настоящему изобретению, в определенных вариантах осуществления, например, в способах модификации лимфоцитов и способах проведения адаптивной клеточной терапии, являются в основном покоящимися Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки и/или НК-клетки состоят из 95 и 100% покоящихся клеток (Ki-67-). В некоторых вариантах осуществления Т-клетки и/или НК-клетки, которые взаимодействуют с рекомбинантными ретровирусами, включают от 90, 91, 92, 93, 94 и 95% покоящихся клеток при нижней границе диапазона до 96, 97, 98, 99 или 100% покоящихся клеток при верхней границе диапазона. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки и/или НК-клетки включают непримированные клетки.

В некоторых вариантах осуществления описанных здесь способов и составов Т-

клетки и/или НК-клетки вступают во взаимодействие *ex vivo* с рекомбинантными ретровирусами для целей генетического изменения Т-клеток и/или НК-клеток в отношении незаконного целевого иммунного ответа у испытуемого при повторном введении. В течение периода взаимодействия рекомбинантные ретровирусы определяют и связываются с Т-клетками и/или НК-клетками, в этот момент они начинают сливаться с мембранами ретровирусной клетки и клетки-хозяина. Затем посредством процесса трансдукции генетический материал из рекомбинантных ретровирусов входит в Т-клетки и/или НК-клетки и включается в ДНК клетки-хозяина. Способы лентивирусов трансдукции хорошо известны. Типовые способы описаны, например, в работах Wang и соавт. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; Cooper и соавт. (2003) *Blood.* 101:1637-1644; Verhoeven и соавт. (2009) *Methods Mol Biol.* 506: 97-114; и Cavalieri и соавт. (2003) *Blood.* 102(2): 497-505.

Многие из предложенных здесь способов включают трансдукцию Т-клеток и/или НК-клеток. Известны способы для трансдукции Т-клеток и/или НК-клеток *ex vivo* ретровирусами, такими как лентивирусы. Способы, представленные здесь в иллюстративных вариантах осуществления, не требуют стимуляции или активации *ex vivo*. Таким образом, этот основной этап в предыдущих способах можно избежать в настоящем способе, хотя экспрессирующая стимулирующая (ие) молекула (ы) *ex vivo*, такая (такие) как гранулы анти-CD3 и/или анти-CD28, может (могут) присутствовать в процессе трансдукции. Однако, благодаря представленным здесь иллюстративным способам, стимуляция *ex vivo* не требуется. В некоторых примерных способах может быть использована 3-10-кратная множественностью инфекции (MOI), а в некоторых вариантах осуществления 5-10-кратная MOI ретровируса, например лентивируса.

Реакцию трансдукции можно проводить в замкнутой системе, такой как SeroX, обсуждаемая здесь, при которой реакция трансдукции может быть проведена в одноразовых пакетах, загруженных в систему. Клетки крови, такие как МКПК, из взятого у испытуемого образца крови, могут взаимодействовать с рекомбинантными ретровирусами, описанными здесь, в пакетах, сразу после отделения, выделения и/или очищения клеток крови от гранулоцитов, включая нейтрофилы, которые обычно отсутствуют на этапе взаимодействия (т.е. реакция трансдукции).

Ретровирус может быть введен в пакет, который содержит изолированные МКПК, тем самым вступая во взаимодействие с МКПК. Время от сбора крови у испытуемого до момента, когда клетки крови, такие как МКПК, добавляются в пакет для осуществления реакции трансдукции, может составлять от 30 минут до 4 часов, от 30 минут до 2 часов или примерно 1 час в некоторых примерах. К реакционной смеси для трансдукции можно добавлять такие добавки, как среда, человеческий сывороточный альбумин, человеческое АТ + сыворотка и/или сыворотку, взятую у испытуемого. Обычно присутствуют среды, известные в данной области техники для процессов *ex vivo* (в качестве неограничивающих примеров, X-VIVO 15 (Lonza) или CTS-среды (Thermo Fisher Scientific)). Вспомогательные цитокины, такие как IL2, IL7 или IL15, или те, которые найдены в сывороточном альбумине человека (HSA), могут быть добавлены в реакционную смесь для трансдукции.

Реакционную смесь для трансдукции можно инкубировать при температуре от 23 до 39°C, а в некоторых иллюстративных вариантах осуществления - при 37°C. В некоторых вариантах осуществления для достижения более быстрого слияния/ трансдукции реакцию трансдукции можно проводить при 37-39°C. К реакции трансдукции может быть добавлен дезоксигуанозина трифосфат (dGTP). Реакционную смесь для трансдукции можно выдерживать в течение 1-12 часов, а в некоторых

вариантах - 6-12 часов. После завершения трансдукции и перед тем, как трансдуцированные Т-клетки и/или НК-клетки будут введены обратно испытуемому, клетки вымываются из реакционной смеси для трансдукции. Например, для промывки клеток, например, с помощью 10-50 мл промывочного раствора можно использовать систему, такую как прибор Seraх, до того, как трансдуцированные клетки снова будут введены испытуемому. В некоторых вариантах осуществления нейтрофилы удаляются до того, как МКПК и/или Т-клетки и/или НК-клетки будут обработаны, вступят во взаимодействие с рекомбинантным ретровирусом, будут трансдуцированы или трансфицированы.

В иллюстративном варианте осуществления для проведения адаптивной клеточной терапии кровь отбирается у пациента в пакет для крови, а потом мешок для крови прикрепляется к системе обработки клеток, такой как система обработки клеток Seraх. МКПК, выделенные с использованием системы обработки клеток, собирают в пакет, вводят во взаимодействие с рекомбинантным ретровирусом в условиях, достаточных для трансдукции Т-клеток и/или НК-клеток, и инкубируют. После инкубации пакет, содержащий смесь МКПК и рекомбинантного ретровируса, присоединяют к системе обработки клеток и промывают МКПК. Промытые МКПК собирают в пакет и повторно вводят пациенту. В некоторых вариантах осуществления весь способ, начиная с забора крови до повторного введения трансдуцированных Т и/или НК-клеток, осуществляется в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 18 или 24 часов. В иллюстративных вариантах осуществления весь способ осуществляется в течение 12 часов.

В некоторых вариантах осуществления клетками-мишенями для рекомбинантных ретровирусов являются ЛПК. В некоторых вариантах осуществления клетками-мишенями являются Т-клетки и/или НК-клетки. В некоторых вариантах осуществления Т-клетками являются Т-хелперы и/или киллерные Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные ретровирусы, представленные здесь, имеют элементы псевдотипирования на своей поверхности, которые способны связываться с Т-клеткой и/или НК-клеткой и облегчают мембранное слияние с ними рекомбинантных ретровирусов. В других вариантах осуществления рекомбинантные ретровирусы имеют на своей поверхности элементы активации, которые способны связываться с покоящимися Т-клетками и/или НК-клетками. В других вариантах осуществления рекомбинантные ретровирусы имеют на своей поверхности мембраносвязанные цитокины. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные ретровирусы включают полинуклеотид, имеющий одну или несколько единиц транскрипции, кодирующих один или несколько сконструированных сигнальных полипептидов, один или несколько из которых включают лимфопролиферативный элемент. В других вариантах осуществления, когда используются два сигнальных полипептида, один включает лимфопролиферативный элемент, а другой, как правило, представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), который включает антигенспецифическую область для нацеливания (ASTR), трансмембранный домен и внутриклеточный активирующий домен. Как указано в настоящем документе, активирующий (ие) элемент (ы), который (ые) обычно связан(ы) с поверхностью представленного здесь рекомбинантного ретровируса, способен и в результате взаимодействия покоящихся Т-клеток и/или НК-клеток в течение достаточного периода времени и в соответствующих условиях активировать покоящиеся Т-клетки и/или НК-клетки. Следует понимать, что такая активация происходит со временем в течение этапа взаимодействия согласно представленным здесь способам. Кроме того, следует

понимать, что в некоторых вариантах осуществления, где на поверхности рекомбинантного ретровируса обнаруживается элемент псевдотипирования, который связывает Т-клетку и/или НК-клетку, согласно представленным здесь способам активация может быть индуцирована связыванием элемента псевдотипирования, В этих вариантах элемент активации является необязательным.

Дополнительная информация, касающаяся элемента псевдотипирования, элемента активации, мембраносвязанного цитокина, сконструированного сигнального полипептида, лимфопролиферативного элемента и CAR, представлена в других разделах данного документа.

В некоторых вариантах осуществления описанных здесь способов и составов трансдукции подвергают 5-90% всех лимфоцитов, собранных из крови. ВВ некоторых вариантах осуществления процент трансдуцируемых лимфоцитов составляет от 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60% на нижней границе диапазона до 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 и 90% на верхней границе диапазона. В некоторых вариантах осуществления процент трансдуцируемых лимфоцитов составляет по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55% или по меньшей мере 60%.

В некоторых вариантах осуществления описанных здесь способов и составов генно-модифицированные Т-клетки и/или НК-клетки вводятся обратно, вводятся повторно или реинфузируют пациенту без осуществления дополнительной манипуляции *ex vivo*, такой как стимуляция и/или активация Т-клеток и/или НК-клеток. В известных способах манипуляция *ex vivo* используется для стимуляции/активации Т-клеток и/или НК-клеток и для увеличения генгл-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток перед введения генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток пациенту. В известных способах области техники данный процесс обычно занимает несколько дней или недель и требует, чтобы пациент находился в клинике в течение дней проведения вливания крови или недель после первоначального кровопускания. В некоторых вариантах осуществления описанных здесь способов и составов Т-клетки и/или НК-клетки не стимулируются *ex vivo* путем воздействия на твердые носители анти-CD3/анти-CD28, такие как, например, гранулы, покрытые анти-CD3/CD28, перед вступлением Т-клеток и/или НК-клеток во взаимодействие с рекомбинантными ретровирусами. Согласно данному изобретению это способ не требует проведения исследования *ex vivo*. В других вариантах осуществления генно-модифицированные Т-клетки и/или НК-клетки не увеличиваются *ex vivo* или увеличиваются только для небольшого числа делений клеток (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раундов клеточного деления), но они довольно увеличены или, в основном, увеличены *in vivo*, то есть в организме пациента. В некоторых вариантах осуществления дополнительный материал не добавляется, чтобы обеспечить дальнейшее увеличение клеток. В некоторых вариантах осуществления ни одно клеточное производство ЛПК не происходит, в то время как ЛПК взаимодействуют с рекомбинантным ретровирусом. В иллюстративных вариантах осуществления ни одно клеточное производство ЛПК не происходит, в то время как ЛПК присутствуют *ex vivo*. В предыдущих методах адаптивной клеточной терапии у пациентов наблюдался дефицит лимфоцитов перед реинфузией генно-модифицированными Т-клетками и/или НК-клетками. В некоторых вариантах осуществления пациенты или испытуемые не страдают дефицитом лимфоцитов перед кровопусканием. В некоторых вариантах осуществления пациенты терапии или испытуемые не страдают дефицитом лимфоцитов перед реинфузией генно-модифицированными Т-клетками и/или НК-клетками.

В любом из вариантов осуществления, раскрытых здесь, количество Т-клеток и/или НК-клеток, подлежащих повторному вливанию пациенту, может быть равно от 1×10^3 , 2.5×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 2.5×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 2.5×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 2.5×10^6 , 5×10^6 и 1×10^7 клеток/кг на нижней границе диапазона до 5×10^4 , 1×10^5 , 2.5×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 2.5×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 2.5×10^7 , 5×10^7 и 1×10^8 клеток/кг на верхней границе диапазона. В иллюстративных вариантах осуществления количество Т-клеток и/или НК-клеток, подлежащих повторному вливанию пациенту, может быть равно от 1×10^4 , 2.5×10^4 , 5×10^4 и 1×10^5 клеток/кг на нижней границе диапазона до 2.5×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 2.5×10^5 , 5×10^5 и 1×10^6 клеток/кг на верхней границе диапазона. В любом из вариантов осуществления количество ЛПК, подлежащих повторному вливанию пациенту, может быть меньше 5×10^5 , 1×10^6 , 2.5×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 2.5×10^7 , 5×10^7 и 1×10^8 клеток на нижней границе диапазона и 2.5×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 2.5×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2.5×10^8 , 5×10^8 и 1×10^9 клеток на верхней границе диапазона. В некоторых вариантах осуществления количество Т-клеток и/или НК-клеток, подлежащих повторному вливанию испытуемому или пациенту весом 70 кг, равно от 7×10^5 до 2.5×10^8 клеток. В других вариантах осуществления количество Т-клеток и/или НК-клеток доступных для трансдукции, равно приблизительно 7×10^6 плюс/минус 10%.

В описанных здесь способах вся процедура адаптивной клеточной терапии, начиная с забора крови до реинфузии генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток, может быть эффективно выполнено за более короткое время, чем в предыдущих способах. В некоторых вариантах осуществления вся процедура адаптивной клеточной терапии может быть выполнена менее чем за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 18 или 24 часа. В иллюстративных вариантах осуществления вся процедура адаптивной клеточной терапии может быть выполнена менее чем за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 часов. В некоторых вариантах осуществления вся процедура адаптивной клеточной терапии может быть выполнена за период времени от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 15 часов на нижней границе диапазона до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 18 или 24 часов на верхней границе диапазона.

В некоторых представленных здесь вариантах осуществления стадии извлечения образца крови у пациента, взаимодействия Т-клеток и/или НК-клеток с рекомбинантными ретровирусами и/или введения генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток пациенту происходят в закрытой системе. Закрытая система представляет собой процесс культивирования, который обычно закрыт или полностью закрыт для загрязнения. Преимущество настоящего изобретения заключается в том, что здесь представлены способы проведения CAR-терапии в закрытой системе. Одним из самых больших рисков для безопасности и регулятивного контроля в процедуре обработки клеток является риск заражения путем частых воздействий внешней среды, как это принято в традиционных открытых системах культивирования клеток. Чтобы уменьшить этот риск, особенно в отсутствие антибиотиков, были разработаны некоторые коммерческие процессы, направленные на использование одноразового оборудования. Однако даже при их использовании в асептических условиях всегда существует риск заражения в результате открытия колб для отбора проб или добавления дополнительных сред для выращивания клеток. Для разрешения этой проблемы, представленный здесь процесс является процессом, выполняемым с закрытой системой, который разработан и может управляться таким образом, чтобы продукт не подвергался

воздействию внешней среды. Это важно, потому что внешняя среда обычно не стерильна. Передача материала происходит через стерильные соединения или сварку труб. Для предотвращения воздействия окружающей среды воздух для газообмена проходит через газопроницаемую мембрану или, как и другие добавки, через фильтр с размером пор 0,2 мкм.

В некоторых вариантах осуществления закрытая система включает систему циркуляции *ex vivo*, связанную с системой кровообращения пациента *ex vivo*, в результате этого кровь вытягивается и затем циркулирует в системе кровообращения *ex vivo*, прежде чем будет введена обратно пациенту. В некоторых вариантах осуществления система кровообращения *ex vivo* включает систему или устройство для выделения ЛПК и/или систему или устройство для выделения Т-клеток и/или НК-клеток в сочетании с системой или устройством воздействия на клетки рекомбинантного ретровируса. В некоторых вариантах осуществления закрытая система не позволяет воздействию Т-клеток и/или НК-клеток взаимодействовать с воздухом.

Такие способы использования закрытой системы могут быть выполнены с помощью имеющихся в продаже изделия. Например, способ может быть выполнен в изделиях, приспособленных для производства Т-клеток с закрытой системой. Такие изделия включают G-Rex™, биореактор WAVE™, пакеты OriGen PermaLife™ и пакеты VueLife®.

В некоторых вариантах осуществления описанных здесь способов и составов генно-модифицированные Т-клетки и/или НК-клетки в организме пациента подвергаются воздействию соединения, которое связывается с присутствующим в нем контрольным элементом *in vivo*, при этом контрольный элемент *in vivo* является частью генетического материала, вводимого рекомбинантными ретровирусами. В некоторых вариантах осуществления контрольным элементом *in vivo* может быть рибопереключател, а соединение может связывать домен аптамера рибопереключател. В некоторых вариантах осуществления контрольным элементом *in vivo* может быть молекулярный шаперон. В любом из раскрытых здесь вариантов осуществления соединением может быть аналог нуклеозида. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеозида может представлять собой аналог нуклеозида противовирусного препарата, при этом противовирусный препарат представляет собой соединение, одобренное Управлением по контролю за продуктами и лекарственными средствами для противовирусной терапии, или соединение из противовирусного клинического исследования, проведенного в США. В иллюстративных вариантах осуществления соединение может представлять собой ацикловир или пенцикловир. В некоторых вариантах осуществления соединение может представлять собой фамцикловир, пероральное пролекарств пеникловира или валацикловира, пероральное пролекарство ацикловира. Связывание соединения с контрольным элементом *in vivo* влияет на экспрессию введенного генетического материала и, следовательно, на распространение генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток.

В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеозида или пролекарство, например ацикловир, валацикловир, пенцикловир или фамцикловир, вводят испытываемому до, одновременно с и/или после выделения ЛПК из крови испытываемого и перед вступлением Т-клеток и/или НК-клеток в взаимодействие с рекомбинантным ретровирусом. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеозида противовирусного препарата или пролекарства вводят пациенту в течение 5, 10, 15, 30 и 60 минут при нижней границе диапазона и до 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24, 48 или 24 часов при верхней границе диапазона, до выделения ЛПК из крови или до того, как Т-клетки и/или НК-клетки вступят во взаимодействие с рекомбинантным ретровирусом. В других

вариантах осуществления аналог нуклеозида противовирусного препарата или пролекарства вводят пациенту в течение 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 или 24 часов при нижней границе диапазона и $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 21 или 28 дней при верхней границе диапазона, после выделения ЛПК из крови и после того, как Т-клетки и/или НК-клетки вступают во взаимодействие с рекомбинантным ретровирусом при способах, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеозида противовирусного препарата или пролекарства вводят пациенту минимум через 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 или 24 часа или минимум $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 21 или 28 дней после выделения ЛПК из крови и после того, как Т-клетки и/или НК-клетки вступают во взаимодействие с рекомбинантным ретровирусом при способах, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеозида противовирусного препарата или пролекарства вводят пациенту минимум через 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 30, 60, 90 или 120 дней / 5, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 120 месяцев или неопределенной период времени после повторной реинфузии ЛПК пациенту. В любом из вариантов осуществления, раскрытых в данном документе, аналог нуклеозида противовирусного препарата или пролекарства можно вводить до и/или во время повторной реинфузии ЛПК и/или после повторной реинфузии ЛПК.

В некоторых вариантах осуществления соединение, которое связывается с контрольным элементом *in vivo*, вводится испытуемому один, два, три раза или четыре раза в день. В некоторых вариантах осуществления суточная доза соединения вводится в течение 1 недели, 2 недель, 4 недель, 3 месяцев, 6 месяцев, 1 года, до тех пор, пока пациент не излечится, например, от рака или неопределенно долго. Препарат в иллюстративных вариантах осуществления представляет собой аналог нуклеозида противовирусного препарата, который связывается с аналогом нуклеозида, таким как рибопереключателем, как описано более подробно здесь.

В настоящей области техники известны способы доставки препаратов, будь то на основе малых молекул или биологических веществ, и которые могут быть использованы в способах, описанных в данном документе. Любые такие способы могут быть использованы для доставки лекарств, соединений-кандидатов или антител для использования в способах по настоящему изобретению. Например, общие пути введения включают неинвазивные пероральные (через рот), местные (наносятся на кожу), трансмукозные (назальные, буккальные/сублингвальные, вагинальные, глазные и ректальные) и ингаляционные пути. Многие белковые и пептидные лекарственные препараты, такие как моноклональные антитела, должны доставляться путем инъекции или массива наночастиц. Например, многие способы иммунизации основаны на доставке белковых препаратов и часто выполняются посредством инъекций.

СКОНСТРУИРОВАННЫЙ (ЫЕ) СИГНАЛЬНЫЙ (ЫЕ) ПОЛИПЕПТИД (Ы)

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные ретровирусы, используемые для взаимодействия с Т-клетками и/или НК-клетками, содержат полинуклеотид, имеющий одну или несколько единиц транскрипции, кодирующих один или несколько сконструированных сигнальных полипептидов, один или несколько из которых включают лимфопролиферативный элемент. В некоторых вариантах осуществления сигнальный полипептид включает любую следующую комбинацию: внеклеточный антигенсвязывающий домен (или антигенспецифическую область для нацеливания или АSTR), стебель, трансмембранный домен, внутриклеточный активирующий домен, лимфопролиферативный элемент, модулирующий домен (такой как костимулирующий домен) и мотив выживаемости Т-клетки. В иллюстративных вариантах осуществления

по меньшей мере один, два или все сконструированные сигнальные полипептиды представляют собой CAR. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два сигнальных полипептида, один включает лимфопротеративный элемент, а другой кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), который включает

5 антигенспецифическую область для нацеливания (ASTR), трансмембранный домен и внутриклеточный активирующий домен. В других вариантах осуществления CAR может включать лимфопротеративный элемент, слитый с антигенспецифической областью для нацеливания. В других вариантах осуществления, когда лимфопротеративный элемент представляет собой конститутивно активный рецептор интерлейкина, такой

10 как известный вариант IL-7R α , антигенспецифическая область для нацеливания не требуется, поскольку связывание не зависит от присутствия лиганда. Специалист в данной области может перенастроить систему, чтобы поместить лимфопротеративный элемент и CAR на отдельные полинуклеотиды с аналогичными или разнородными контрольными элементами для описанных здесь способов и составов. Специалист в

15 данной области признает, что такие сконструированные полипептиды можно также назвать рекомбинантными полипептидами.

Антигенспецифическая область для нацеливания

В некоторых вариантах осуществления сконструированный сигнальный полипептид включает элемент специфической пары связывания, которым обычно является ASTR, иногда упоминается здесь как антигенсвязывающий домен. Специфические пары

20 связывания включают, но не ограничиваются ими, пары связывания антиген-антитело; пары связывания лиганд-рецептор; и т.п. Таким образом, член специфической пары связывания, подходящий для использования в сконструированном сигнальном полипептиде настоящего изобретения, включает ASTR, который представляет собой

25 антитело, антиген, лиганд, рецептор-связывающий домен лиганда, рецептор, лигандсвязывающий домен рецептора и аффитело.

ASTR, подходящим для использования в сконструированном сигнальном полипептиде настоящего изобретения, может быть антигенсвязывающий полипептид. В некоторых вариантах осуществления ASTR представляет собой антитело, например:

30 полноразмерное антитело, одноцепочечное антитело, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, (Pab')₂-фрагмент, Fv-фрагмент и двухвалентное одноцепочечное антитело или диатело.

В некоторых вариантах осуществления ASTR представляет собой одиночную цепь Fv (scFv). В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь располагается в N-конце легкой цепи в сконструированном сигнальном полипептиде. В других вариантах

35 осуществления легкая цепь располагается в N-конце тяжелой цепи в сконструированном сигнальном полипептиде. В любом из раскрытых вариантов осуществления тяжелая и легкая цепи могут быть разделены линкером, как это описано более подробно в данном изобретении. В любом из раскрытых вариантов осуществления тяжелая или легкая цепь может быть расположена на N-конце сконструированного сигнального полипептида

40 и обычно является С-концом другого домена, такого как сигнальная последовательность или пептид.

Другие домены распознавания антител (сAb VHH (вариабельные домены антител верблюдовых) и гуманизированные версии, IgNAR VH (вариабельные домены антител акуковых) и гуманизированные версии, вариабельные домены sdAb VH (вариабельные

45 домены с одним антителом домена) и вариабельные домены антител «верблюдовых» подходят для использования со спроектированными сигнальными полипептидами и способами, использующими сконструированные сигнальные полипептиды настоящего изобретения. В некоторых случаях пригодны также для использования домены

распознавания Т-клеточного рецептора (TCR), такие как одноцепочечные TCR (scTv, одноцепочечные двухдоменные TCR, содержащие V α V β).

В некоторых вариантах осуществления, ASTR может быть мультиспецифичной, например, биспецифические антитела. Мультиспецифические антитела обладают специфичностью связывания по меньшей мере для двух разных участков. В некоторых вариантах осуществления одна из специфичностей связывания относится к одному целевому антигену, а другая относится к другому целевому антигену. В определенных вариантах осуществления биспецифические антитела могут связываться с двумя различными эпитопами целевого антигена ta. Биспецифические антитела также могут быть использованы для локализации цитотоксических агентов в клетках, которые экспрессируют целевой антиген. Биспецифические антитела могут быть подготовлены в качестве полноразмерных антител или фрагментов антител.

ASTR, подходящий для использования в сконструированном сигнальном полипептиде настоящего изобретения, может обладать множеством специфичностей связывания антигенов. В некоторых случаях антигенсвязывающий домен специфичен по отношению к эпитопу, присутствующему в антигене, который экспрессируется (синтезируется) клеткой-мишенью. В одном примере клетка-мишень является ассоциированным с раковой клеткой антигеном. Антиген, ассоциированный с раковой клеткой, может быть антигеном, ассоциированным с, например, клеткой рака молочной железы, лимфомой В-клеток, клеткой лимфомы Ходжкина, клеткой рака яичников, клеткой рака предстательной железы, клеткой мезотелиомы, клеткой рака легких (например, небольшой клеток рака легких), клеткой не-ходжкинской В-клеточной лимфомы (В-NHL), клеткой рака яичников, клеткой рака предстательной железы, клеткой мезотелиомы, клеткой рака легкого (например, небольшой рака легкого клетки), клеткой меланомы, клеткой хронической лимфоцитарной лейкемии, клеткой острого лимфоцитарного лейкоза, клеткой нейробластомы, глиомой, глиобластомой, медуллобластомой, клеткой колоректального рака и т.д. Антиген, ассоциированный с раковой клеткой, также может быть экспрессирован нераковой клеткой.

Неограничивающие примеры антигенов, с которыми может связываться ASTR спроектированного сигнального полипептида, включают, например, CD19, CD20, CD38, CD30, ERBB2, CA125, MUC-1, простат-специфический мембранный антиген (PSMA), поверхностную адгезионную молекулу CD44, мезотелин, карциноэмбрионального антигена (CEA), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), EGFRvIII, рецептор фактора роста эндотелия сосудов-2 (VEGFR2), меланома-ассоциированный антиген с высокой молекулярной массой (HMW-MAA), MAGE-A1, IL-13R-a2, GD2, Ax1, Ror2 и т.п.

В некоторых случаях член конкретной пары связывания, подходящий для использования в спроектированном сигнальном полипептиде, представляет собой ASTR, который является лигандом для рецептора. Лиганды включают, но не ограничиваются ими, цитокины (например, IL-13 и т.д.); факторы роста (например, эндгулин, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и т.п.); интегринсвязывающий пептид (например, пептид, содержащий последовательность Arg-Gly-Asp); и т.п.

Когда член конкретной пары связывания в спроектированном сигнальном полипептиде является лигандом, спроектированный сигнальный полипептид может быть активирован в присутствии второго элемента специфической пары связывания, где второй член специфической пары связывания является рецептором для лиганд. Например, когда лиганд представляет собой VEGF, вторым членом специфической пары связывания может быть рецептор VEGF, включая растворимый рецептор VEGF.

Как отмечалось выше, в некоторых случаях член специфической пары связывания,

включенный в спроектированный сигнальный полипептид, представляет собой ASTR, который является рецептором, например, рецептором для лиганда, корецептором и т.д. Рецептор может быть лиганд-связывающий фрагмент рецептора. Подходящие рецепторы включают, но не ограничиваются ими: рецептор фактора роста (например, рецептор VEGF); подсемейство подкласса лектин-подобного киллера рецептора К, член 1 (NKG2D) (рецептор для MICA, MICB и ULB6); рецептор цитокинов (например, рецептор IL-13, рецептор IL-2 и т.д.); CD27; рецептор естественной цитотоксичности (NCR) (например, полипептид NKP30 (NCR3 / CD337) (рецептор для HLA-B-ассоциированного транскрипта 3 (BAT3) и B7-H6) и т.д.); и т.п.

10 Стебель

В некоторых вариантах осуществления спроектированный сигнальный полипептид включает стебель, который расположен в части сконструированного сигнального полипептида, находящегося вне клетки, и расположен между ASTR и трансмембранным доменом. В некоторых случаях стебель обладает по меньшей мере 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%-ой идентичностью с областью дикого CD8 (TTTPAPRPPTPAPTASQPLSL RPEACRPAAGG AVHTRGLDFA (SEQ ID NO: 79), обладает по меньшей мере 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%-ой идентичностью с областью стебля дикого CD8 (FCKIEVMY PPPYLDNEKSNGTPIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP (SEQ ID NO: 80)) или обладает по меньшей мере 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%-ной идентичностью с областью стебля тяжелой цепи иммуноглобулина дикого типа. В сконструированном сигнальном полипептиде используемый стебель позволяет антигенспецифической области для нацеливания и, как правило, всему сконструированному сигнальному полипептиду сохранять повышенное связывание с целевым антигеном.

Область стебля может иметь длину от примерно 4 аминокислот до примерно 50 аминокислот, например, от примерно 4 аа до примерно 10 аа, от примерно 10 аа до примерно 15 аа, от примерно 15 аа до примерно 20 аа, от примерно 20 аа до примерно 25 аа, от примерно 25 аа до примерно 30 аа, от примерно 30 до примерно 40 аа или от примерно 40 до примерно 50 аа.

В некоторых случаях стебель сконструированного сигнального полипептида включает по меньшей мере один цистеин. Например, в некоторых случаях стебель может включать последовательность Cys-Pro-Pro-Cys (SEQ ID NO: 62). При наличии, в стебле первого сконструированного сигнального полипептида может иметься цистеин для образования дисульфидной связи со стеблем во втором сконструированном сигнальном полипептиде.

Стебли могут включать аминокислотные последовательности шарнирной области иммуноглобулина, которые известны в данной области техники; см., например, Tan и соавт. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:162; и Huck и соавт. (1986) Nucl. Acids Res. 14: 1779. В качестве неограничивающих примеров область шарнира иммуноглобулина может включать домен с по меньшей мере 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательностей с растяжением не менее 10, 15, 20 или всех аминокислот любой из следующих аминокислотных последовательностей: DKTHТ (SEQ ID NO: 63); CPPC (SEQ ID NO: 62); CPEPKSCDTPPPCPR (SEQ ID NO: 64) (см., например, Glaser и соавт. (2005) J. Biol. Chem. 280:41494); ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 65); KSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 66); KCCVDCP (SEQ ID NO: 67); KYGPPCP (SEQ ID NO: 68); EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 69) (шарнир человеческого IgG1); ERKCCVECPPCP (SEQ ID NO: 70) (шарнир человеческого IgG2); ELKTPLGDTTHTCPRCP (SEQ ID NO: 71) (шарнир человеческого IgG3); SPNMVPHANHAQ (SEQ ID NO: 72) (шарнир человеческого IgG4); и т.п. Стебель может включать шарнирную область с аминокислотной последовательностью шарнирной области человеческого IgG1, IgG2,

IgG3 или IgG4. Стебель может включать одну или несколько аминокислотных замен и/или вставок и/или делеций по сравнению с областью шарнира дикого типа (встречающийся в природе). Например, His229 шарнира человеческого IgG1 может быть заменен Тур, так что стебель включает последовательность EPKSCDKTYTCCPPCP (см., например, Yan и соавт. (2012) J. Biol. Chem. 287:5891). Стебель может включать аминокислотную последовательность, полученную из человеческого CD8; например, стебель может включать следующую аминокислотную последовательность: TTTAPRPPTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 73), или ее варианты.

Трансмембранный домен

Сконструированный сигнальный полипептид по настоящему изобретению может включать трансмембранные домены, предназначенные для вставки в эукариотическую клеточную мембрану. Трансмембранный домен может быть вставлен между ASTR и ко-стимулирующим доменом. Трансмембранный домен может быть вставлен между стеблем и ко-стимулирующим доменом, так что химерный антигенный рецептор включает по порядку от аминоконца (N-конец) до карбоксильного конца (C-конец): ASTR; стебель; трансмембранный домен; и активирующий домен.

Любой трансмембранный (ТМ) домен, который обеспечивает введение полипептида в клеточную мембрану эукариотической клетки (например, млекопитающего), подходит для применения в аспектах и вариантах осуществления, раскрытых в данном документе.

Неограничивающие примеры доменов ТМ, подходящих для любого из аспектов или вариантов осуществления, представленных здесь, включают домен, по меньшей мере, с 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с увеличением участка по меньшей мере 10, 15, 20 или всех аминокислот любого из следующих доменов ТМ: а) CD*-альфа (IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 46)); б) CD8-бета (LGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC (SEQ ID NO: 47)); в) CD4 (ALIVLGGVAGLLLFGLGIFFCVRC (SEQ ID NO: 48)); д) CD3Z (LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV (SEQ ID NO: 49)); е) CD28 (FWVLVWGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 50)); ф) CD134 (OX40): (VAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL (SEQ ID NO: 51)); г) CD7 (ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA (SEQ ID NO: 52)), h) CD8 TTTAPRPPTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL YC (SEQ ID NO: 75), и i) CD28 IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 76).

В качестве неограничивающих примеров трансмембранный домен одного из аспектов изобретения может обладать по меньшей мере 80, 90 или 95%-ой идентичностью последовательности с трансмембранным доменом SEQ ID NO: 46, трансмембранным доменом CD8 бета, трансмембранным доменом CD4, трансмембранным доменом CD3-дзета, трансмембранным доменом CD28, трансмембранным доменом CD134 или трансмембранным доменом CD7.

Внутриклеточный активирующий домен

Внутриклеточные активирующие домены, пригодные для использования в спроектированном сигнальном полипептиде по настоящему изобретению при активации, обычно индуцируют продукцию одного или нескольких цитокинов; увеличение клеточной смерти; и/или увеличение распространения Т-клеток CD8⁺, Т-клеток CD4⁺, естественных киллерных Т-клеток, Т-клеток $\gamma\delta$ и/или нейтрофилов. Активирующий доменов также может упоминаться здесь как домен активации.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный активирующий домен включает по меньшей мере один (например, один, два, три, четыре, пять, шесть и т.д.)

ИТАМ-мотивов, как описано ниже. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный активирующий домен включает сигнальные цепи типа DAP10/CD28. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный активирующий домен не ковалентно связан с мембраносвязанным спроектированным сигнальным полипептидом, а вместо этого рассеивается в цитоплазме. В качестве неограничивающих примеров внутриклеточный активирующий домен по одному аспекту изобретения может обладать по меньшей мере 80%, 90% или 95%-ой идентичностью последовательности с CD3Z, CD3D, CD3E, CD3G, CD79A, DAP12, FCER1G, DAP10/CD28 или ZAP70, как описано ниже.

Внутриклеточные активирующие домены, подходящие для использования в сконструированном сигнальном полипептиде настоящего изобретения, включают внутриклеточные сигнальные полипептиды, включающие иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ИТАМ). ИТАМ-мотив - YX_1X_2L/I , где X_1 и X_2 отдельно друг от друга представляют собой любую аминокислоту. В некоторых случаях внутриклеточный активирующий домен сконструированного сигнального полипептида включает 1, 2, 3, 4 или 5 ИТАМ-мотивов. В некоторых случаях ИТАМ-мотив повторяется дважды во внутриклеточном активирующем домене, при этом первый и второй экземпляры ИТАМ-мотива отделены друг от друга на 6-8 аминокислот, например: $YX_1X_2L/I(X_3)_n(YX_1X_2L/I)$, где n - целое число от 6 до 8, и каждый из 6-8 X_3 может быть любой аминокислотой. В некоторых случаях внутриклеточный активирующий домен сконструированного сигнального полипептида включает 3 ИТАМ-мотива.

Подходящим внутриклеточным активирующим доменом может быть часть, содержащая ИТАМ-мотив, которая получена из полипептида, содержавшего такой ИТАМ-мотив. Например, подходящим внутриклеточным активирующим доменом может быть домен, содержащий ИТАМ-мотив, из любого белка, содержащего ИТАМ-мотив. Таким образом, подходящий внутриклеточный активирующий домен не должен содержать полную последовательность всего белка, из которого он получен. Примеры подходящих полипептидов, содержащих мотив ИТАМ, включают, но не ограничиваются: CD3Z (CD3-дзета); CD3D (CD3-дельта); CD3E (CD3-эпсилон); CD3G (CD3-гамма); CD79A (антиген-рецепторный комплекс-ассоциированная белковая альфа-цепь); DAP12; и FCER1G (гамма-цепь рецептора Fc-эпсилон I).

В некоторых случаях внутриклеточный активирующий домен получают из CD3-дзета цепи гликопротеина на поверхности Т-клетки (также известной как CD3Z, ТЗ-дзета цепь рецептора Т-клеток, CD247, CD3-ZETA, CD3H, CD3Q, T3Z, TCRZ и т.д.). Например, подходящий внутриклеточный активирующий домен может включать домен с по меньшей мере 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, или 100%-ной идентичностью последовательности с растяжением по меньшей мере 10, 15, 20 или всех аминокислот в следующих последовательностях или до смежного участка от примерно 100 аминокислот до примерно 110 аминокислот (aa), от примерно 110 aa до примерно 115 aa, от примерно 115 aa до примерно 120 aa, от примерно 120 aa до примерно 130 aa, от примерно 130 aa до примерно 140 aa, от примерно 140 aa до примерно 150 aa или от примерно 150 aa до примерно 160 aa любой из следующих аминокислотных последовательностей (2 изоформы): MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYhffilNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 11) или MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

(SEQ ID NO: 12), при этом мотивы ITAM выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Аналогичным образом подходящий полипептид внутриклеточного активирующего домена может включать мотив ITAM, содержащий часть полноразмерной

аминокислотной последовательности цепи CD3-дзета. Таким образом, подходящий

внутриклеточный активирующий домен может включать домен с по меньшей мере 50,

60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, или 100%-ной идентичностью последовательности

с растяжением по меньшей мере 10, 15, 20 или всех аминокислот в следующих

последовательностях или до смежного участка от примерно 100 аминокислот до

примерно 110 аминокислот (aa), от примерно 110 aa до примерно 115 aa, от примерно

115 aa до примерно 120 aa, от примерно 120 aa до примерно 130 aa, от примерно 130

aa до примерно 140 aa, от примерно 140 aa до примерно 150 aa или от примерно 150 aa

до примерно 160 aa любой из следующих аминокислотных последовательностей: RVK

JFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLY

NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ

ID NO: 13); RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPR

QRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL

HMQALPPR (SEQ ID NO: 81); NQLYNELNLGRREEYDVLDKR (SEQ ID NO: 14);

EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK (SEQ ID NO: 15); или DGLYQGLSTATKDTYDALHMQ

(SEQ ID NO: 16), при этом мотивы ITAM выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

В некоторых случаях внутриклеточный активирующий домен получен из дельта-

цепи гликопротеина CD3 на поверхности Т-клеток (также известный как CD3D, CD3-

DELTA, T3D, антиген CD3, дельта-субъединица, CD3-дельта, CD3d-антиген, дельта-

полипептид (комплекс TiT3), OKT3, дельта-цепь, дельта-цепь T3 Т-клеточного рецептора

T3, дельта-цепь CD3 гликопротеина Т-клеточной поверхности и т.д.). Таким образом,

подходящий внутриклеточный активирующий домен может включать домен с по

меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%-

ной идентичностью последовательности с растяжением по меньшей мере 10, 15, 20 или

всех аминокислот в следующих последовательностях или до смежного участка от

примерно 100 аминокислот до примерно 110 аминокислот (aa), от примерно 110 aa до

примерно 115 aa, от примерно 115 aa до примерно 120 aa, от примерно 120 aa до

примерно 130 aa, от примерно 130 aa до примерно 140 aa, от примерно 140 aa до

примерно 150 aa или от примерно 150 aa до примерно 160 aa любой из следующих

аминокислотных последовательностей: MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDREV

FVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRM

CQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQP

LRDRDDAQYSHLGGNWARNK (SEQ ID NO: 17) или MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKI

PIEELEDREV FVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKEST

VQVHYRTADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK (SEQ ID NO: 18), при

этом мотивы ITAM выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Аналогичным образом подходящий полипептид внутриклеточного активирующего

домена может включать мотив ITAM, содержащий часть полноразмерной

аминокислотной последовательности цепи CD3-дельта. Таким образом, подходящий

внутриклеточный активирующий домен может включать домен с по меньшей мере

50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%-ной

идентичностью последовательности с растяжением не менее 10, 15, 20 или всех

аминокислот любой из следующих аминокислотных последовательностей:

DQVYQPLRDRDDAQYSHLGGN (SEQ ID NO: 19), при этом мотивы ITAM выделены

жирным шрифтом и подчеркнуты.

В некоторых случаях внутриклеточный активирующий домен получают из CD3-эпсилон цепи гликопротеина на поверхности Т-клетки (также известной как CD3ε, T3/Leu-4 эпсилон цепь антигена на поверхности Т-клетки, CD3-эпсилон цепь гликопротеина на поверхности Т-клетки, AI504783, CD3, CD3-эпсилон, T3ε и т.д.). Таким образом,

5 подходящий внутриклеточный активирующий домен может включать домен с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%-ной идентичностью последовательности с растяжением по меньшей мере 10, 15, 20 или всех аминокислот в следующих последовательностях или до смежного участка от примерно 100 аминокислот до примерно 110 аминокислот (aa), от примерно 110 aa до
10 примерно 115 aa, от примерно 115 aa до примерно 120 aa, от примерно 120 aa до примерно 130 aa, от примерно 130 aa до примерно 140 aa, от примерно 140 aa до примерно 150 aa или от примерно 150 aa до примерно 160 aa следующей аминокислотной последовательности: MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGI
15 TVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGS KPEDANFYLYLRARVCENCMEMDMSVATIVIVDICITGGLLLVYYWSKNRKAKAKPV TRGAGAGGRQGRGQNKERPPVPNPDIYEPYRKGQRDLYSGLNQRR (SEQ ID NO: 20), при этом мотивы ITAM выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Аналогичным образом подходящий полипептид внутриклеточного активирующего домена может включать мотив ITAM, содержащий часть полноразмерной
20 аминокислотной последовательности цепи CD3-эпсилон. Таким образом, подходящий внутриклеточный активирующий домен может включать домен с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%-ной идентичностью последовательности с растяжением не менее 10, 15, 20 или всех аминокислот любой из следующих аминокислотных последовательностей:

25 NPDYEPYRKGQRDLYSGLNQR (SEQ ID NO: 21), при этом мотивы ITAM выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

В некоторых случаях внутриклеточный активирующий домен получают из CD3-гамма цепи гликопротеина на поверхности Т-клетки (также известной как CD3G, T3-гамма цепь рецептора Т-клеток, CD3-GAMMA, T3G, гамма-полипептид (комплекс T3T3) и т.д.). Таким образом, подходящий внутриклеточный активирующий домен может
30 включать домен с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%-ной идентичностью последовательности с растяжением по меньшей мере 10, 15, 20 или всех аминокислот в следующих последовательностях или до смежного участка от примерно 100 аминокислот до примерно 110 аминокислот (aa), от примерно
35 110 aa до примерно 115 aa, от примерно 115 aa до примерно 120 aa, от примерно 120 aa до примерно 130 aa, от примерно 130 aa до примерно 140 aa, от примерно 140 aa до примерно 150 aa или от примерно 150 aa до примерно 160 aa следующей аминокислотной последовательности: MEQKGGLAVLILAILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLL
40 TCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAICDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVY YRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVQRQSRASDKQTLLPNDQLY QPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN (SEQ ID NO: 22), при этом мотивы ITAM выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Аналогичным образом подходящий полипептид внутриклеточного активирующего домена может включать мотив ITAM, содержащий часть полноразмерной
45 аминокислотной последовательности цепи CD3-гамма. Таким образом, подходящий внутриклеточный активирующий домен может включать домен с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%-ной идентичностью последовательности с растяжением не менее 10, 15, 20 или всех

аминокислот любой из следующих аминокислотных последовательностей:
DQLYQPLKDREDDQYSHLQGN (SEQ ID NO: 23), при этом мотивы ИТАМ выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

В некоторых случаях внутриклеточный активирующий домен получают из CD79A (также известный как комплекс-ассоциированная белковая альфа-цепь рецептора В-клеточного антигена, антиген CD79a (ассоциированный с иммуноглобулином альфа-рецептор); Таким образом, подходящий внутриклеточный активирующий домен может включать домен с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%-ной идентичностью последовательности с растяжением по меньшей мере 10, 15, 20 или всех аминокислот в следующих последовательностях или до смежного участка от примерно 100 аминокислот до примерно ПО аминокислот (aa), от примерно 110 aa до примерно 115 aa, от примерно 115 aa до примерно 120 aa, от примерно 120 aa до примерно 130 aa, от примерно 130 aa до примерно 140 aa, от примерно 140 aa до примерно 150 aa или от примерно 150 aa до примерно 160 aa любой из следующих аминокислотных последовательностей: **MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTWPPEFLGPGEDPN GTLIQNVNKS HGGIYVCRVQEGNESYQQSCGYLRVRQPPRPFLDMGEGTKNRIITAE GIILLFCAWPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQ GTYQDVGSLNIGDVQLEKP** (SEQ ID NO: 24) или **MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTWPPEFLGPGEDPNEPPRPFLDMGEGTKNRIITAE GIILLFCAVVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLEKP** (SEQ ID NO: 25), при этом мотивы ИТАМ выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Аналогичным образом подходящий полипептид внутриклеточного активирующего домена может включать мотив ИТАМ, содержащий часть полноразмерной аминокислотной последовательности CD79A. Таким образом, подходящий внутриклеточный активирующий домен может включать домен с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%-ной идентичностью последовательности с растяжением не менее 10, 15, 20 или всех аминокислот любой из следующих аминокислотных последовательностей: **ENLYEGLNLDDCSMYEDISRG** (SEQ ID NO: 26), при этом мотивы ИТАМ выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

В некоторых случаях внутриклеточный активирующий домен получают из DAP12 (также известный как TYROBP, белок связывания тирозинкиназы белков TYRO, KARAP, PLOSL, ДНК-активационный белок 12, KAR-ассоциированный белок, белок связывания тирозин-киназы белка TYRO, белок, связанный с рецептором активации клетки-киллера, активирующий рецептор белка клетки-киллера; и т.д.). Например, подходящий внутриклеточный активирующий домен может включать домен с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%-ной идентичностью последовательности с растяжением по меньшей мере 10, 15, 20 или всех аминокислот в следующих последовательностях или до смежного участка от примерно 100 аминокислот до примерно 110 аминокислот (aa), от примерно 110 aa до примерно 115 aa, от примерно 115 aa до примерно 120 aa, от примерно 120 aa до примерно 130 aa, от примерно 130 aa до примерно 140 aa, от примерно 140 aa до примерно 150 aa или от примерно 150 aa до примерно 160 aa любой из следующих аминокислотных последовательностей (4 изоформы): **MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCS CSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRQKITETESPYQE LQGQRSDVYSDLNTQRPYYK** (SEQ ID NO: 27), **MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQ**

AQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRIVPRGRGAAEATRKQRITE
 TESPQELQGQRSDVYSDLNTQ (SEQ ID NO: 28), MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCS
 TVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRIVPRGRGAAEATRKQRITETESPQELQ
 GQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO: 29) или MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCS
 5 VSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRIVPRGRGAAEATRKQRJTETESPQELQGG
 RSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO: 30), при этом мотивы ITAM выделены жирным
 шрифтом и подчеркнуты.

Аналогичным образом подходящий полипептид внутриклеточного активирующего
 домена может включать мотив ITAM, содержащий часть полноразмерной
 10 аминокислотной последовательности DAP12. Таким образом, подходящий
 внутриклеточный активирующий домен может включать домен с по меньшей мере
 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%-ной
 идентичностью последовательности с растяжением не менее 10, 15, 20 или всех
 аминокислот любой из следующих аминокислотных последовательностей:
 15 ESPYQELQGQRSDVYSDLNTQ (SEQ ID NO: 31), при этом мотивы ITAM выделены
 жирным шрифтом и подчеркнуты.

В некоторых случаях внутриклеточный активирующий домен получен из FCER1G
 (также известного как FCRG, гамма-цепь Fc-эпсилон рецептора I, гамма-цепь Fc-
 рецептора, fc-эпсилон RI-гамма, fcR-гамма, fceRI-гамма, высокоаффинный
 20 иммуноглобулин гамма-субъединицы эпсилон-рецептора, гамма-цепь рецептора
 иммуноглобулина E высокой аффинности и т.д.). Например, подходящий
 внутриклеточный активирующий домен может включать домен с по меньшей мере
 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%-ной
 идентичностью последовательности с растяжением по меньшей мере 10, 15, 20 или всех
 25 аминокислот в следующих последовательностях или до смежного участка от примерно
 50 аминокислот до примерно 60 аминокислот (aa), от примерно 60 aa до примерно 70
 aa, от примерно 70 aa до примерно 80 aa, от примерно 80 aa до примерно 88 aa
 следующей аминокислотной последовательности: MIPAVLLLLLLVEQAAALGEPQL
 CYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKP
 30 PQ (SEQ ID NO: 32), при этом мотивы ITAM выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Аналогичным образом подходящий полипептид внутриклеточного активирующего
 домена может включать мотив ITAM, содержащий часть полноразмерной
 аминокислотной последовательности FCER1G. Таким образом, подходящий
 внутриклеточный активирующий домен может включать домен с по меньшей мере
 35 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%-ной
 идентичностью последовательности с растяжением не менее 10, 15, 20 или всех
 аминокислот любой из следующих аминокислотных последовательностей:
 DGVYTGLSTRNQETYETLKHE (SEQ ID NO: 33), при этом мотивы ITAM выделены
 жирным шрифтом и подчеркнуты.

Внутриклеточные активирующие домены, подходящие для использования в
 сконструированном сигнальном полипептиде настоящего изобретения, включают
 сигнальную цепь типа DAP10/CD28. Примером сигнальной цепи DAP10 является
 следующая аминокислотная последовательность: RPRRSPAQDGKVYINMPGRG (SEQ
 ID NO: 34). В некоторых вариантах осуществления подходящий внутриклеточный
 45 активирующий домен включает домен с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%,
 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%-ной идентичностью последовательности
 с растяжением не менее 10, 15, 20 или всех аминокислот в следующей
 последовательности: RPRRSPAQDGKVYINMPGRG (SEQ ID NO: 34).

Примером сигнальной цепи CD28 является следующая аминокислотная последовательность: FWVLWVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 35). В некоторых вариантах осуществления подходящий внутриклеточный домен включает домен с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%-ной идентичностью последовательности с растяжением не менее 10, 15, 20 или всех аминокислот в следующей последовательности: FWVLWVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 35).

Внутриклеточные активирующие домены, подходящие для использования в сконструированном сигнальном полипептиде настоящего изобретения, включают полипептид ZAP70. Например, подходящий внутриклеточный активирующий домен может включать домен с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%-ной идентичностью последовательности с растяжением по меньшей мере 10, 15, 20 или всех аминокислот в следующих последовательностях или до смежного участка от примерно 300 аминокислот до примерно 400 аминокислот, от примерно 400 аминокислот до примерно 500 аминокислот, от примерно 500 аминокислот до примерно 619 аминокислот следующей аминокислотной последовательности: MPDPAANLPFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLRSLG GYVLSLVHVDVRFHNFPIERQLNGTYAIAGGKAHCSPAELCEFYSRDPDGLPCNLKPCN RPSGLEPQPGVFDCLRDAMVRDYVRQTWKLEGEALEQAIISQAPQVEKLIATTAHERMP WYHSSLTREEAERKLYSGAQTGDKFLLRPRKEQGTYSLSLIYGKTVYHYLISQDKAGK YCIPEGTKFDTLWQLVEYLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPANHPSTLTH PQRRIDTLNSDGYTPEPARITSPDKPRPMPMDTSVYESPYSDPEELKDKKLFLKRDNLLI ADIELGCGNFGSVRQGWRRMRKKQIDVAIKVLKQGTEKADTEEMMREAQMHQLDNPYI VRLIGVCQAEALMLVMEMAGGGPLHKFLVGKREEIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEK NFNHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDSYYTARSAGKWPLKWYAPECIN FRKFSSRSVDWSYGVMTWEALSYGQKPYKXMKGPVMAFIEQGKRMECPPECPELY ALMSDCWIYKWEDRPDFTLVEQRMRCYYSLSASKVEGPPGSTQKAEAAACA (SEQ ID NO: 36).

Лимфопролиферативные элементы

Число периферических Т-лимфоцитов поддерживается на чрезвычайно стабильных уровнях в течение всей взрослой жизни, несмотря на продолжающееся добавление клеток в следствие эмиграции из тимуса и пролиферации в ответ на антигенное столкновение и потери клеток из-за удаления антигенспецифических эффекторов после клиренса антигенов (Marrak, P. и соавт. 2000. Nat Immunol 1:107-111; Freitas, A.A. и соавт. 2000. Annu Rev Immunol 18:83-111). Размер периферического Т-клеточного компартмента регулируется несколькими факторами, которые влияют как на пролиферацию, так и на выживаемость. Однако в лимфопенальной среде Т-лимфоциты делятся независимо от родственного антигена вследствие механизмов «острой гомеостатической пролиферации», которые поддерживают размер периферического Т-клеточного компартмента. Условия для лимфопении были установлены у испытуемых или пациентов во время проведения адаптивной клеточной терапии пролиферирующими Т-клетками *in vitro* и введении их пациентам с истощением лимфоцитов, что привело к усилению сцепления и противоопухолевой функции переносимых Т-клеток. Однако, истощение количества лимфоцитов у испытуемого нежелательно, поскольку оно может вызвать серьезные побочные эффекты, включая иммунную дисфункцию и смерть.

Исследования показали, что лимфоузлы удаляют эндогенные лимфоциты, функционирующие как клеточные раковины для гомеостатических цитокинов, тем

самым освобождая цитокины, чтобы спровоцировать выживание и пролиферацию переносимых клеток. Известно, что некоторые цитокины, такие как IL-7 и IL-15, опосредуют антигеннезависимую пролиферацию Т-клеток и, таким образом, способны вызывать гомеостатическую пролиферацию в нелимфоцитарных средах. Однако, эти цитокины и их рецепторы имеют внутренние механизмы контроля, которые предотвращают лимфопролиферативные расстройства при гомеостазе.

Многие из аспектов, представленных здесь, включают лимфопролиферативный элемент или нуклеиновую кислоту, кодирующую, как обычно докладывают, часть спроектированного сигнального полипептида. В иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения лимфопролиферативный элемент вводится в покоящуюся Т-клетку и/или покоящуюся НК-клетку, как правило, путем трансдукции покоящейся Т-клетки и/или покоящейся НК-клетки ретровирусом, геном которого кодирует лимфопролиферативный элемент как часть спроектированной сигнализации полипептид. Лимфопролиферативный элемент может выступать цитокин или, в дополнительных иллюстративных вариантах осуществления, рецептор цитокинов или фрагмент, включающий его сигнальный домен, который активирует путь STAT3, путь STAT4 или, в еще более иллюстративных вариантах осуществления, путь Jak/STAT5. Учитывая это, лимфопролиферативный элемент может быть в неограничивающем примере цитокиновым рецептором или активным фрагментом, включающий его сигнальный домен, такой как рецептор интерлейкина или активный фрагмент, включающий его сигнальный домен, который активирует STAT5. Таким образом, лимфопролиферативный элемент представляет собой полипептид, который индуцирует пролиферацию Т-клеток и/или НК-клеток. Иллюстративные лимфопролиферативные элементы индуцируют пролиферацию путем активации STAT5. Таким образом, фрагменты таких лимфопролиферативных элементов сохраняют способность индуцировать пролиферацию Т-клеток и/или НК-клеток в иллюстративных вариантах путем активации STAT5.

В некоторых из представленных здесь способов и составов лимфопролиферативный элемент используется для стимулирования пролиферации или увеличения генно-модифицированных Т-клеток *in vivo* без использования пациента с истощением лимфоцитов. Учитывая это, неограничивающие иллюстративные варианты осуществления предложенных здесь способов, которые включают введение лимфопролиферативного элемента в покоящуюся Т-клетку и/или НК-клетку пациента, как правило, путем трансдукции такой Т-клетки и/или НК-клетки, могут быть выполнены без пациента с истощением лимфоцитов до, во время и/или после выполнения способа; без пациента с истощением лимфоцитов до, во время и/или после взятия крови у пациента перед выполнением такого способа; или без пациента с истощением лимфоцитов до, во время и/или после генетической модификации Т-клеток или НК-клеток пациента *ex vivo*; и/или до, во время или после повторного введения генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток пациенту. Факторы, способствующие пролиферации Т-клеток *in vivo*, включают цитокины и их рецепторы, в которых рецептор обычно содержит лиганд-связывающий домен и сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления лимфопролиферативный элемент, используемый в описанных здесь способах и составах, представляет собой цитокин и/или рецептор цитокина. Цитокином может быть интерлейкин, а рецептором цитокинов может быть рецептор интерлейкина. Лимфопролиферативный элемент может быть функциональным фрагментом цитокина и/или функциональным фрагментом рецептора цитокинов, таким как его сигнальный домен, при этом фрагмент способен стимулировать пролиферацию Т-клеток, например,

путем активации STAT5.

В некоторых вариантах осуществления лимфопролиферативный элемент цитокина в представленных здесь способах и составах включает один или несколько из следующих элементов: Интерлейкин-7 (IL-7), его рецептор (IL-7R) или его сигнальный домен;

5 Интерлейкин-12 (IL-12), его рецептор (IL-12R) или его сигнальный домен; Интерлейкин-23 (IL-23), его рецептор, состоящий из IL-12R β 1 и IL-23R, или его сигнального домена; Интерлейкин-27 (IL-27), его рецептор (IL-27R) или его сигнальный домен; Интерлейкин-15 (IL-15), его рецептор (IL-15R) или его сигнальный домен; Интерлейкин-21 (IL-21), его рецептор (IL-21R) или его сигнальный домен; или трансформирующий фактор роста β (TGF β), его рецептор (TGF β R) или его сигнальный домен; рецептор TGF β -деки (TGF- β -доминантно-отрицательный рецептор II (DNRII)). В некоторых вариантах осуществления лимфопролиферативный элемент представляет собой рецептор IL-12R или TGF β -деки (TGF- β -доминантно-отрицательный рецептор II (DNRII)).

15 IL-7 связывается с рецептором IL-7, гетеродимером, состоящим из IL-7R-альфа и общим рецептором гамма-цепи. Связывание приводит к каскаду сигналов, важных для развития Т-клеток в тимусе и выживанию на периферии. Известно, что связывание IL-7 с рецептором IL-7 активирует путь Jak / STAT5.

IL-12 участвует в установлении различий между наивными Т-клетками и клетками Th1 (Hsieh CS и соавт. 1993. Science. 260(5107):547-9) и известен как стимулирующий фактор роста Т-клетки. IL-12 связывается с рецептором IL-12, который представляет собой гетеродимерный рецептор, образованный IL-12R- β 1 и IL-12R- β 2. IL12, может действовать методом активации STAT4, но также, как было показано, методом активации STAT5 в Т-клетках (Ahn, H., и соавт. 1998. J. Immun. 161:5893-5900). Семейство IL-12 состоит из цитокинов IL-12, IL-23 и IL-27. Рецептор для IL-23 состоит из IL-12R β 1 и IL-23R. IL-27 представляет собой гетеродимерный цитокин, который состоит из двух разных генов, вирус-индуцированного гена Эпштейна-Барра 3 (EBI3) и IL-27p28. IL-27 взаимодействует с рецептором IL-27.

IL-15 представляет собой стимулирующий фактор Т и NK-клеток, который по структуре и функции аналогичен IL-2. Оба цитокина индуцируют пролиферацию Т-клеток; и их совместные функции, как полагают, являются результатом обоих рецепторов, использующих IL-2 / IL-15R β и общие γ -цепи. Сигнальный путь IL-15 начинается с связывания с рецептором IL-15R α с последующим представлением окружающим клеткам, несущим комплекс IL-15R $\beta\gamma$ с на их клеточной поверхности. При связывании субъединицы IL-15 β активируется Янус-киназа 1 (Jak1) и Янус-киназа γ с-субъединица 3 (Jak3), что приводит к фосфорилированию и активации STAT3 и STAT5.

IL-21 экспрессируется в активированных человеческих CD4 + Т-клетках и NK-клетках, а экспрессия IL-21 регулируется в Th2 и Th17 подмножествах Т-хелперах. Рецептор IL-21 (IL-21R) экспрессируется на поверхности Т, В и NK-клеток и аналогичен по структуре рецепторам для других цитокинов I типа, таких как IL-2R или IL-15. IL-21R требует димеризации с общей гамма-цепью (γ с) для связывания IL-21. При связывании с IL-21 рецептор IL-21 действует через путь Jak/STAT, активируя STAT1, STAT3 и STAT5.

40 TGF β -рецепторы-ловушки (TGF- β -доминантно-отрицательный рецептор II типа (DNRII)) блокируют передачу сигналов TGF β , конкурируя с природными рецепторами связывания TGF β . TGF β -DNRII представляет собой усеченную форму RII с мертвой киназой, которая содержит внеклеточный связывающий домен TGF β и трансмембранный домен RII. TGF β -DNRII связывает лиганд, но не фосфорилирует и не активирует RI, что уменьшает или устраняет фосфорилирование Smad.

Мутации с приобретением функций в IL-7R α были идентифицированы у пациентов

с острыми лимфобластными лейкозами В и Т-клеток (В-ALL и Т-ALL) (Zenatti PP, и соавт. 2011. Nat Genet 43:932-939; Snochat, С. и соавт. 2011. J Exp Med 208:901-908; McElroy, С.А. и соавт. 2012. PNAS 109(7):2503-2508). Мутации включали вставки и делеции в N-концевой области IL-7R α TMD, причем почти все последовательности содержали
 5 дополнительный остаток Cys и мутацию S165-к-С165. Цистеин приводил к конститутивной активации рецептора. Некоторые из мутаций во всех группе Т-клеток активировали JAK1. Эти мутагены IL-7R с усилением функции могут быть использованы в любом из аспектов, представленных здесь, как один из лимфопролиферативных элементов.

10 Соответственно, в некоторых вариантах осуществления лимфопролиферативный элемент представляет собой мутированный рецептор IL-7. В других вариантах осуществления мутированный рецептор IL-7 является конститутивно активным, активируя путь JAK-STAT5 в отсутствие лиганда цитокина. В еще одних вариантах осуществления мутированный рецептор IL-7 содержит вставку из 1-10 аминокислот в
 15 положении 237-254, которая включает остаток цистеина, обладающий способностью конститутивно активировать путь STAT5. В некоторых вариантах осуществления мутированный рецептор IL-7 представляет собой IL-7R α -insPPCL (представлен SEQ ID NO: 82).

В некоторых вариантах осуществления лимфопролиферативный элемент представляет
 20 собой химерный цитокиновый рецептор, такой как, но не ограничиваясь этим, цитокин, привязанный к его рецептору, который обычно конститутивно активирует один и тот же путь STAT в качестве соответствующего активированного рецептора цитокинов дикого типа, такого как STAT3, STAT4, и в иллюстративных варианты осуществления - STAT5. В некоторых вариантах осуществления химерный цитокиновый рецептор
 25 представляет собой интерлейкин или его фрагмент, привязанный или ковалентно связанный с его родственным рецептором или его фрагментом через линкер. В некоторых вариантах осуществления химерный цитокиновый рецептор связан с IL-7 с IL-7R α . В других вариантах осуществления химерный цитокиновый рецептор представляет собой IL-7, привязанный к домену IL-7R α , такой как, например,
 30 внеклеточный домен IL-7R α и/или трансмембранный домен IL-7R α . В некоторых вариантах осуществления лимфопролиферативный элемент представляет собой рецептор цитокинов, который не привязан к цитокину, и на самом деле в иллюстративных вариантах осуществления, представленных здесь, лимфопролиферативный элемент представляет собой конститутивно активный рецептор цитокинов, который не привязан
 35 к цитокину. Такие химерные рецепторы IL-7 обычно конститутивно активируют STAT5 при экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления лимфопролиферативный элемент не является цитокином или рецептором цитокинов, а представляет собой miРНК, который стимулирует путь STAT5, как правило, путем потенцирования активации STAT5 методом
 40 деградации отрицательного регулятора в пути SOCS. В некоторых вариантах осуществления miРНК представляет собой белки, которые влияют на пролиферацию, такие как, но не ограничиваясь ими, ABCG1, SOCS1, TGF β R2, SMAD2, cCBL и PD1. В иллюстративных вариантах осуществления, как показано здесь, такие miРНК могут быть расположены в интронах внутри упаковывающих клеточное и/или рекомбинантное
 45 геноме ретровируса, как правило, с экспрессией, вызванной промотором, который активен в Т-клетке и/или НК-клетке. Считается, что не ограничиваясь теорией, включение интронов в единицы транскрипции приводит к более высокой экспрессии и/или стабильности транскриптов. Таким образом, способность размещать miРНК внутри

интронов ретровирусного генома добавляет к учениям настоящего изобретения, которые преодолевают проблемы в предшествующем уровне техники, чтобы попытаться получить максимальную активность в размерных ограничениях ретровирусов, таких как геном лентивируса. В некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 miРНК в иллюстративных вариантах осуществления между 2 и 5, например 4 miРНК, один или несколько из которых связывают нуклеиновые кислоты, кодирующие один или более ABCG1, SOCS1, TGFbR2, SMAD2, cCBL и PD1, могут быть включены в рекомбинантный ретровирусный геном и доставлены в клетку-мишень, например Т-клетки и/или NK-клетки, с использованием способов, описанных в настоящем изобретении. Фактически, как описано здесь, 1, 2, 3 или 4 miРНК могут быть доставлены в один интрон, такой как интрон EF1a.

ABCG1 представляет собой АТФ-связывающий кассетный транспортер, который отрицательно регулирует пролиферацию тимоцитов и периферических лимфоцитов (Armstrong и соавт. 2010. J Immunol 184(1):173-183).

SOCS1 является членом семейства SOCS (супрессор цитокиновых сигналов) отрицательных регуляторов передачи сигнала цитокинов, которые ингибируют путь Jak / Stat, такой как STAT5. SOCS1 также известен как JAB (Янус-киназа-связывающий белок), SSI-1 (Stat-индуцированный ингибитор Stat-1) и TIP3 (Тес-взаимодействующий белок).

TGFbR2 является членом семейства серина/треонин-протеинкиназы, который связывает TGF-β, образуя комплекс, фосфорилирующий белки, которые затем входят в ядро и регулируют транскрипцию генов, связанных с пролиферацией.

SMAD2 опосредует сигнал трансформирующего фактора роста (ТФР)-β и регулирует множественные клеточные процессы, такие как пролиферация клеток, апоптоз и дифференцировка.

cCBL является E3 убиквитиновой лигазой, которая ингибирует передачу сигналов ТФР путем дефосфорилирования и инактивации ZAP-70, а также и путем интернализации ТФР.

PD1 (CD279) представляет собой рецептор клеточной поверхности, экспрессируемый на Т-клетках и ProB-клетках. PD-1 связывает два лиганда - PD-L1 и PD-L2. Передача сигналов через функции PD-1 для предотвращения активации клеток.

В некоторых описанных здесь способах и составах экспрессия лимфопролиферативного элемента индуцируется и может даже зависеть от связывания соединения с контрольным элементом *in vivo* (как обсуждается здесь в другом разделе), который в неограничивающих вариантах осуществления представляет собой рибопереключател. В некоторых вариантах осуществления лимфопролиферативный элемент экспрессируется из промотора, активного в Т-клетке и/или NK-клетке. Для описанных здесь способов и составов квалифицированный специалист в данной области техники понимает, что известны промоторы, которые активны в Т-клетках и/или NK-клетках и могут быть использованы для экспрессии первого сконструированного сигнального полипептида, второго сконструированного сигнального полипептида или любого его компонента. В иллюстративных вариантах осуществления такой промотор не активен в пакующей клеточной линии, такой как пакующие линии, описанные в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор EF1a или промотор вируса мышинных стволовых клеток (MSCV) (Jones и соавт., Human Gene Therapy (2009) 20:630-40). В иллюстративных вариантах осуществления промотор представляет собой Т-клеточный специфический CD3-дзета-промотор.

В некоторых вариантах осуществления лимфопролиферативный элемент ограничен микроокружением. Например, лимфопролиферативный элемент может быть мутированным рецептором, который дифференцирует свой соответствующий цитокин в aberrантных и физиологических условиях. Например, IL-7R, который может связывать IL7 более сильно в опухолевой среде, чем в нормальной физиологической среде.

В некоторых вариантах осуществления лимфопролиферативный элемент слит с областью распознавания или элиминации. Такие области распознавания или элиминации раскрыты более подробно в данном изобретении. Такое слияние дает преимущество, особенно когда используется усеченный или другой мутированный

лимфопролиферативный элемент, требующий меньшего количества полинуклеотидов в ретровирусном геноме. Это важно в иллюстративных вариантах осуществления, представленных здесь, поскольку помогает разрешить включение большего количества нуклеиновых кислот, кодирующих функциональные элементы в ретровирусный геном. В других вариантах осуществления лимфопролиферативный элемент слит с ко-стимулирующим доменом и/или внутриклеточным активирующим доменом.

Лимфопролиферативный элемент, описанный здесь, не является химерным антигенным рецептором (CAR), внутриклеточным активирующим доменом или его ко-стимулирующим доменом. Однако, в некоторых вариантах осуществления лимфопролиферативный элемент может быть слит с антигенспецифической областью для нацеливания (ASTR) и активирован путем связывания области ASTR с ее антигеном. В других вариантах осуществления спроектированный сигнальный полипептид может включать ASTR, внутриклеточный домен активации (такой как домен сигнализации CD2-дзета), ко-стимулирующий домен и лимфопролиферативный домен. Более подробная информация о ко-стимулирующих доменах, внутриклеточных активационных доменах, ASTR и других доменах CAR раскрыта в другом разделе.

В иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения элемент выживаемости Т-клеток и/или NK-клеток вводится в покоящуюся Т-клетку и/или покоящуюся NK-клетку, как правило, путем трансдукции покоящейся Т-клетки и/или покоящейся NK-клетки ретровирусом, геном которого кодирует элемент выживаемости Т-клетки и/или NK-клеток как часть спроектированного сигнального полипептида. В некоторых вариантах осуществления лимфопролиферативный элемент также представляет собой элемент выживания клеток Т-клеток и/или NK-клеток. Как обсуждалось выше, некоторые из лимфопролиферативных элементов не только способствуют пролиферации, но также способствуют выживанию клеток. В некоторых вариантах осуществления мотив выживаемости Т-клеток и/или NK не является лимфопролиферативным элементом. Например, мотив выживаемости Т-клеток и/или NK-клеток может быть мотивом выживаемости Т-клеток CD28 или мотивом выживаемости клеток CD137. Такие мотивы выживаемости Т-клеток можно найти на спроектированных сигнальных полипептидах, которые включают ASTR, таких как scFv. В иллюстративном варианте осуществления мотив выживаемости Т-клеток представляет собой мотив выживаемости Т-клеток CD28 или мотив CD 137, связанный с scFv через трансмембранный домен CD8a или трансмембранный домен CD28. В определенных вариантах осуществления указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептидную последовательность, содержащую мотив активации на основе иммунорецептора тирозина (ITAM). В определенном варианте осуществления указанная полипептидная последовательность представляет собой сигнальный домен CD3 ζ .

Модулирующие домены

Модулирующие домены могут изменять характер действия внутриклеточного активирующего домена в сконструированном сигнальном полипептиде, включая усиление или снижение нижестоящих эффектов активирующего домена или изменение характера ответа. Модулирующие домены, подходящие для использования в сконструированном сигнальном полипептиде настоящего изобретения, включают ко-стимулирующие домены. Модулирующий домен, подходящий для включения в сконструированный сигнальный полипептид, может иметь длину от примерно 30 аминокислот до примерно 70 аминокислот (aa), например, модулирующий домен может иметь длину от примерно 30 aa до примерно 35 aa, от примерно 35 aa до примерно 40 aa, от примерно 40 aa до примерно 45 aa, от примерно 45 aa до примерно 50 aa, от примерно 50 aa до примерно 55 aa, от примерно 55 aa до примерно 60 aa, от примерно 60 до примерно 65 aa или от примерно 65 до примерно 70 aa. В других случаях модулирующий домен имеет длину от примерно 70 aa до примерно 100 aa, от примерно 100 aa до примерно 200 aa или более 200 aa.

Ко-стимулирующие домены обычно усиливают и/или изменяют характер ответа на домен активации. Ко-стимулирующие домены, подходящие для использования в спроектированном сигнальном полипептиде настоящего изобретения, обычно представляют собой полипептиды, полученные из рецепторов. В некоторых вариантах осуществления гомодимеризуются ко-стимулирующие области. Ко-стимулирующий домен испытуемого может быть внутриклеточной частью трансмембранного белка (то есть, ко-стимулирующий домен может быть получен из трансмембранного белка). Неограничивающие примеры подходящих ко-стимулирующих полипептидов включают, но не ограничиваются ими, 4-1BB (CD137), CD27, CD28, удаленные для Lck-связывания (ICΔ), ICOS, OX40, BTLA, CD27, CD30, GITR и HVEM. Например, ко-стимулирующий домен по данному аспекту изобретения может обладать по меньшей мере 80%, 90% или 95%-ной идентичностью последовательности с ко-стимулирующим доменом 4-1BB (CD137), CD27, CD28, CD28, удаленным для Lck-связывания (ICΔ), ICOS, OX40, BTLA, CD27, CD30, GITR или HVEM. Например, ко-стимулирующий домен по данному аспекту изобретения может обладать по меньшей мере 80%, 90% или 95%-ной идентичностью последовательности с ко-стимулирующим доменом по неограничивающим примерам подходящих ко-стимулирующих полипептидов, которые включают, не ограничиваясь ими, 4-1BB (CD137), CD27, CD28, CD28, удаленные для Lck-связывания (ICΔ), ICOS, OX40, BTLA, CD27, CD30, GITR и HVEM. Например, ко-стимулирующий домен по данному аспекту изобретения может обладать по меньшей мере 80%, 90% или 95%-ной идентичностью последовательности с ко-стимулирующим доменом 4-1BB (CD137), CD27, CD28, CD28, удаленным для Lck-связывания (ICΔ), ICOS, OX40, BTLA, CD27, CD30, GITR или HVEM.

Ко-стимулирующий домен, подходящий для включения в сконструированный сигнальный полипептид, может иметь длину от примерно 30 аминокислот до примерно 70 аминокислот (aa), например, ко-стимулирующий домен может иметь длину от примерно 30 aa до примерно 35 aa, от примерно 35 aa до примерно 40 aa, от примерно 40 aa до примерно 45 aa, от примерно 45 aa до примерно 50 aa, от примерно 50 aa до примерно 55 aa, от примерно 55 aa до примерно 60 aa, от примерно 60 до примерно 65 aa или от примерно 65 до примерно 70 aa. В других случаях ко-стимулирующий домен имеет длину от примерно 70 aa до примерно 100 aa, от примерно 100 aa до примерно 200 aa или более 200 aa.

В некоторых случаях ко-стимулирующий домен получают из внутриклеточной части трансмембранного белка CD137 (также известной как TNFRSF9; CD137; 4-1BB; CDw137;

ILA и т.д.). Например, подходящий ко-стимулирующий домен может включать домен с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%-ной идентичностью последовательности с растяжением не менее 10, 15, 20 или всех аминокислот в следующей аминокислотной последовательности: KRGRKKLLYIF
 5 KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 1). В некоторых из этих вариантов осуществления ко-стимулирующий домен имеет длину от примерно 30 aa до примерно 35 aa, от примерно 35 aa до примерно 40 aa, от примерно 40 aa до примерно 45 aa, от примерно 45 aa до примерно 50 aa, от примерно 50 aa до примерно 55 aa, от примерно 55 aa до примерно 60 aa, от примерно 60 до примерно 65 aa или от примерно
 10 65 до примерно 70 aa.

В некоторых случаях ко-стимулирующий домен получают из внутриклеточной части трансмембранного белка CD28 (также известной как Tr44). Например, подходящий ко-стимулирующий домен может включать домен с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%-ной идентичностью
 15 последовательности с растяжением не менее 10, 15, 20 или всех аминокислот в следующей аминокислотной последовательности: RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKKNYQPYAP PRDFAAYRS (SEQ ID NO: 2). В некоторых из этих вариантов осуществления ко-стимулирующий домен имеет длину от примерно 30 aa до примерно 35 aa, от примерно 35 aa до примерно 40 aa, от примерно 40 aa до примерно 45 aa, от примерно 45 aa до
 20 примерно 50 aa, от примерно 50 aa до примерно 55 aa, от примерно 55 aa до примерно 60 aa, от примерно 60 до примерно 65 aa или от примерно 65 до примерно 70 aa.

В некоторых случаях ко-стимулирующий домен получают из внутриклеточной части трансмембранного белка CD28, удаленной для связывания Lck (ICL). Например, подходящий ко-стимулирующий домен может включать домен с по меньшей мере 50%,
 25 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%-ной идентичностью последовательности с растяжением не менее 10, 15, 20 или всех аминокислот в следующей аминокислотной последовательности: RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKKNYQAYA AARDFAAYRS (SEQ ID NO: 3). В некоторых из этих вариантов осуществления ко-стимулирующий домен имеет длину от примерно 30 aa до примерно 35 aa, от примерно
 30 35 aa до примерно 40 aa, от примерно 40 aa до примерно 45 aa, от примерно 45 aa до примерно 50 aa, от примерно 50 aa до примерно 55 aa, от примерно 55 aa до примерно 60 aa, от примерно 60 до примерно 65 aa или от примерно 65 до примерно 70 aa.

В некоторых случаях ко-стимулирующий домен получают из внутриклеточной части трансмембранного белка ICOS (также известной как AILIM, CD278 и CVID1). Например,
 35 подходящий ко-стимулирующий домен может включать домен с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%-ной идентичностью последовательности с растяжением не менее 10, 15, 20 или всех аминокислот в следующей аминокислотной последовательности: TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLT DVTL (SEQ ID NO: 4). В некоторых из этих вариантов осуществления ко-стимулирующий
 40 домен имеет длину от примерно 30 aa до примерно 35 aa, от примерно 35 aa до примерно 40 aa, от примерно 40 aa до примерно 45 aa, от примерно 45 aa до примерно 50 aa, от примерно 50 aa до примерно 55 aa, от примерно 55 aa до примерно 60 aa, от примерно 60 до примерно 65 aa или от примерно 65 до примерно 70 aa.

В некоторых случаях ко-стимулирующий домен получают из внутриклеточной части трансмембранного белка OX40 (также известной как TNFRSF4, RP5-902P8.3, ACT35, CD134, OX-40, TXGP1L). Например, подходящий ко-стимулирующий домен может
 45 включать домен с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%-ной идентичностью последовательности с растяжением не менее

10, 15, 20 или всех аминокислот в следующей аминокислотной последовательности: R RDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (SEQ ID NO: 5). В некоторых из этих вариантов осуществления ко-стимулирующий домен имеет длину от примерно 30 аа до примерно 35 аа, от примерно 35 аа до примерно 40 аа, от примерно 40 аа до примерно 45 аа, от примерно 45 аа до примерно 50 аа, от примерно 50 аа до примерно 55 аа, от примерно 55 аа до примерно 60 аа, от примерно 60 до примерно 65 аа или от примерно 65 до примерно 70 аа.

В некоторых случаях ко-стимулирующий домен получают из внутриклеточной части трансмембранного белка CD27 (также известной как S 152, T 14, TNFRSF7 и Trp55).

Например, подходящий ко-стимулирующий домен может включать домен с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%-ной идентичностью последовательности с растяжением не менее 10, 15, 20 или всех аминокислот в следующей аминокислотной последовательности: HQRKRYRSNKGES RVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (SEQ ID NO: 6). В некоторых из этих вариантов осуществления ко-стимулирующий домен имеет длину от примерно 30 аа до примерно 35 аа, от примерно 35 аа до примерно 40 аа, от примерно 40 аа до примерно 45 аа, от примерно 45 аа до примерно 50 аа, от примерно

В некоторых случаях ко-стимулирующий домен получают из внутриклеточной части трансмембранного белка BTLA (также известной как BTLA1 и CD272). Например,

подходящий ко-стимулирующий домен может включать домен с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%-ной идентичностью последовательности с растяжением не менее 10, 15, 20 или всех аминокислот в следующей аминокислотной последовательности: CCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQ TEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSHVIGP NSRLARNVKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO: 7).

В некоторых случаях ко-стимулирующий домен получают из внутриклеточной части трансмембранного белка CD30 (также известной как TNFRSF8, DIS166E и Ki-1).

Например, подходящий ко-стимулирующий домен может включать домен с по меньшей мере 0%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%-ной

идентичностью последовательности с растяжением от примерно 100 аминокислот до примерно 110 аминокислот (аа), от примерно 110 аа до примерно 115 аа, от примерно 115 аа до примерно 120 аа, от примерно 120 аа до примерно 130 аа, от примерно 130 аа до примерно 140 аа, от примерно 140 аа до примерно 150 аа, от примерно 150 аа до примерно 160 аа или от примерно 160 аа до примерно 185 аа следующей аминокислотной последовательности: RRACRKRIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGASV TEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLESPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNN KIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCS DVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK (SEQ ID NO: 8).

В некоторых случаях ко-стимулирующий домен получают из внутриклеточной части трансмембранного белка GITR (также известной как TNFRSF18, RP5-902P8.2, AITR, CD357 и GITR-D). Например, подходящий ко-стимулирующий домен может включать

домен с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%-ной идентичностью последовательности с растяжением не менее 10, 15, 20 или всех аминокислот в следующей аминокислотной последовательности: HIWQLRSQ

CMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFP EEERGERSAEEKGRLGDLWV (SEQ ID NO: 9). В некоторых из этих вариантов осуществления ко-стимулирующий домен имеет длину от примерно 30 аа до примерно 35 аа, от примерно 35 аа до примерно 40 аа, от примерно 40 аа до примерно 45 аа, от примерно 45 аа до примерно 50 аа, от примерно 50 аа до

примерно 55 аа, от примерно 55 аа до примерно 60 аа, от примерно 60 до примерно 65 аа или от примерно 65 до примерно 70 аа.

В некоторых случаях ко-стимулирующий домен получают из внутриклеточной части трансмембранного белка HVEM (также известной как TNFRSF14, RP3-395M20.6, ATAR, CD270, HVEA, HVEM, LIGHTR и TR2). Например, подходящий ко-стимулирующий домен может включать домен с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%-ной идентичностью последовательности с растяжением не менее 10, 15, 20 или всех аминокислот в следующей аминокислотной последовательности: CVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAGEATVIEALQAPPDVTTV AVEETIPSFTGRSPNH (SEQ ID NO: 10). В некоторых из этих вариантов осуществления ко-стимулирующий домен, как первого, так и второго полипептида имеет длину от примерно 30 аа до примерно 35 аа, от примерно 35 аа до примерно 40 аа, от примерно 40 аа до примерно 45 аа, от примерно 45 аа до примерно 50 аа, от примерно 50 аа до примерно 55 аа, от примерно 55 аа до примерно 60 аа, от примерно 60 до примерно 65 аа или от примерно 65 до примерно 70 аа.

Линкер

В некоторых случаях спроектированный сигнальный полипептид включает линкер между любыми двумя соседними доменами. Например, линкер может находиться между трансмембранным доменом и первым ко-стимулирующим доменом. В качестве другого примера, ASTR может быть антителом, и линкер может находиться между тяжелой цепью и легкой цепью. В качестве другого примера, линкер может находиться между ASTR и трансмембранным доменом и ко-стимулирующим доменом. В качестве еще одного примера линкер может находиться между ко-стимулирующим доменом и внутриклеточным активирующим доменом второго полипептида. В качестве другого примера, линкер может находиться между ASTR и внутриклеточным сигнальным доменом.

Линкерный пептид может иметь любую из множества аминокислотных последовательностей. Белки могут соединяться спейсерным пептидом, как правило, гибкого по природе, хотя другие химические связи не исключаются. Линкер может представлять собой пептид длиной от примерно 1 до примерно 100 аминокислот или длиной примерно от 1 до примерно 25 аминокислот. Эти линкеры могут быть получены с использованием синтетических олигонуклеотидов, кодирующих линкер, для соединения белков. Могут использоваться пептидные линкеры со степенью гибкости. Связующие пептиды могут иметь практически любую аминокислотную последовательность, принимая во внимание, что подходящие линкеры будут иметь последовательность, которая приводит к обычному гибкому пептиду. Использование небольших аминокислот, таких как глицин и аланин, используется для создания гибкого пептида. Создание таких последовательностей является обычным для специалистов в данной области техники.

Подходящие линкеры могут быть легко подобраны и могут иметь любую из подходящих разных длин, например, от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 аминокислот до 15 аминокислот, от 3 аминокислот до 12 аминокислот кислоты, включая 4 аминокислоты до 10 аминокислот, 5 аминокислот до 9 аминокислот, 6 аминокислот до 8 аминокислот или 7 аминокислот до 8 аминокислот и могут быть длиной 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот.

Примеры гибких линкеров включают глициновые полимеры (G)_n глицин-сериновые полимеры (включая, например, (GS)_n, GSGGS_n, GGGS_n и GGGGS_n, где n - целое число по меньшей мере равное одному), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые

полимеры и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники. Полимеры глицина и глицин-серин представляют интерес, поскольку обе эти аминокислоты относительно неструктурированы и поэтому могут служить нейтральным тросом между компонентами. Полимеры глицина представляют особый интерес, поскольку глицин достигает значительно большего количества пространства ϕ - ψ , чем даже аланина, и гораздо менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). Типичные гибкие линкеры включают, но не ограничиваются, GGGGGGGGGGGGS (SEQ ID NO: 53), GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGS (SEQ ID NO: 54), GGGGGGGGGGGGGGS (SEQ ID NO: 55), GSGG (SEQ ID NO: 56), GSGGG (SEQ ID NO: 57), GSGSG (SEQ ID NO: 58), GSGGG (SEQ ID NO: 59), GGGSG (SEQ ID NO: 60), GSSSG (SEQ ID NO: 61) и т.п. Специалист в данной области техники признает, что конструкция пептида, конъюгированного с любыми описанными выше элементами может включать линкеры, которые являются полностью или частично гибкими, так что линкер может включать гибкий линкер, а также одну или несколько частей, которые придают менее гибкую структуру.

Химерный антигенный рецептор

В некоторых аспектах настоящего изобретения сконструированный сигнальный полипептид представляет собой химерный антигеновый рецептор (CAR) или полинуклеотид, кодирующий CAR, который для упрощения упоминается здесь как «CAR». В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению включает в себя: а) по меньшей мере одну антигенспецифическую область для нацеливания (ASTR); б) трансмембранный домен; и с) внутриклеточный активирующий домен. В иллюстративных вариантах осуществления антигенспецифическая область CAR для нацеливания представляет собой часть scFv антитела к целевому антигену.

CAR по настоящему изобретению может присутствовать в плазматической мембране эукариотической клетки, например клетки млекопитающего, при этом подходящие клетки млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, цитотоксическую клетку, Т-лимфоцит, стволовую клетку, потомство стволовых клеток, клетки-предшественника, потомство клетки-предшественника и NK-клетки, NK-Т-клетки и макрофага. При его присутствии в плазматической мембране эукариотической клетки, CAR по настоящему изобретению активен в присутствии одного или нескольких целевых антигенов, которые при определенных условиях связывают ASTR. Целевой антиген является вторым членом специфической пары связывания. Целевой антиген специфической пары связывания может быть растворимым (например, несвязанный с клеткой) фактором; фактор, присутствующий на поверхности клетки, такой как клетка-мишень; фактор, представленный на твердой поверхности; фактор, присутствующий в липидном бислое; и т.п. Когда ASTR представляет собой антитело, а второй член специфической пары связывания является антигеном, антиген может быть растворимым (например, несвязанным с клеткой) антигеном; антигеном, присутствующим на поверхности клетки, такой как клетка-мишень; антигеном, присутствующим на твердой поверхности; антигеном, присутствующим в липидном бислое; и т.п.

В некоторых случаях CAR по настоящему изобретению, когда он присутствует в плазматической мембране эукариотической клетки и при активации одним или несколькими целевыми антигенами, увеличивает экспрессию по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты в клетке. Например, в некоторых случаях CAR по настоящему изобретению, когда он присутствует в плазматической мембране эукариотической клетки и при активации одним или несколькими целевыми антигенами, увеличивает экспрессию по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты в клетке по меньшей мере

приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 15%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 2% по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз, по меньшей мере приблизительно в 10 раз или более чем в 10 раз, по сравнению с уровнем транскрипции нуклеиновой кислоты в отсутствие одного или нескольких целевых антигенов.

В качестве примера, CAR по настоящему изобретению может включать мотив активации на основе иммунорецептора тирозина (ITAM), содержащий внутриклеточный сигнальный полипептид.

CAR по настоящему изобретению, когда он присутствует в плазматической мембране эукариотической клетки и при активации одним или несколькими целевыми антигенами, в некоторых случаях может приводить к увеличению продуцирования клетками одного или нескольких цитокинов. Например, CAR по настоящему изобретению, когда он присутствует в плазматической мембране эукариотической клетки и при активации одним или несколькими целевыми антигенами, может увеличить производство цитокина клеткой по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 15%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 2% по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз, по меньшей мере приблизительно в 10 раз или более чем в 10 раз, по сравнению с количеством цитокина, продуцируемого клеткой, в отсутствие одного или нескольких целевых антигенов. Цитокины, продуцирование которых может быть увеличено, включают, но не ограничиваются ими, интерферон-гамма (IFN- γ), фактор некроза опухоли-альфа (TNF- α), IL-2, IL-15, IL-12, IL-4, IL-5, IL-10; хемокин; фактор роста; и т.п.

В некоторых случаях CAR по настоящему изобретению, когда он присутствует в плазматической мембране эукариотической клетки и при активации одним или несколькими целевыми антигенами, может приводить как к увеличению транскрипции нуклеиновой кислоты в клетке, так и к увеличению производства цитокина клеткой.

В некоторых случаях CAR по настоящему изобретению, когда он присутствует в плазматической мембране эукариотической клетки и при активации одним или несколькими целевыми антигенами, приводит к цитотоксической активности клетки по отношению к клетке-мишени, которая экспрессирует на ее поверхности клетки и антиген, с которым связывается антиген-связывающий домен первого полипептида CAR-связей. Например, когда эукариотическая клетка представляет собой цитотоксическую клетку (например, NK-клетку или цитотоксический Т-лимфоцит), CAR по настоящему изобретению, когда он присутствует в плазматической мембране клетки, и при активации одной или несколькими целевыми антигенами, увеличивает цитотоксическую активность клетки по отношению к клетке-мишени, которая выражает на ее поверхности клетки одного или нескольких целевых антигенов. Например, если эукариотическая клетка представляет собой NK-клетку или Т-лимфоцит, CAR по настоящему изобретению, когда он присутствует в плазматической мембране эукариотической клетки и при активации одним или несколькими целевыми антигенами, увеличивает цитотоксическую активность клетки по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 15%, по меньшей мере приблизительно на

20%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 2% по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз, по меньшей мере приблизительно в 10 раз или более чем в 10 раз, по сравнению с цитотоксической активностью клетки в отсутствие одного или нескольких целевых антигенов.

В некоторых случаях химерный антигенный рецептор (CAR) по настоящему изобретению, когда он присутствует в плазматической мембране эукариотической клетки и при активации одним или несколькими целевыми антигенами, может привести к другим событиям, связанным с активацией CAR, таким как пролиферация и увеличение (из-за увеличения клеточного деления или антиапоптотических ответов).

В некоторых случаях CAR по настоящему изобретению, когда он присутствует в плазматической мембране эукариотической клетки и при активации одним или несколькими целевыми антигенами, может привести к другим событиям, связанным с активацией CAR, таким как внутриклеточная сигнальная модуляция, клеточная дифференциация или гибель клеток.

CAR по настоящему изобретению может присутствовать в эукариотической клеточной мембране, где первый и второй полипептиды CAR нековалентно связаны друг с другом. CAR по настоящему изобретению может присутствовать в эукариотической клеточной мембране в виде одного гетеродимера, который нековалентно связан с каким-либо другим полипептидом в мембране. В качестве альтернативы, первый CAR по настоящему изобретению может присутствовать в эукариотической клеточной мембране в качестве гетеродимера, который ковалентно или нековалентно связан со вторым CAR по настоящему изобретению. В некоторых случаях первый и второй CAR ковалентно связаны через дисульфидную связь, образованную между цистеинами, присутствующими в стебле, имеющимися как в первом полипептиде первого CAR, так и в первом полипептиде второго CAR.

В некоторых случаях CAR по настоящему изобретению может присутствовать в эукариотической клеточной мембране, где первые полипептиды CAR включают фрагмент антитела, а второй полипептид CAR включает домен, трансдуцирующий сигнал, полученный из цитокинового рецептора, такой, который при димеризации CAR может представлять собой гетеродимерно-сигнально-кодирующий CAR, например, сигнальную область, состоящую по меньшей мере из двух независимых полипептидов. «Сигнальная область», как известно в данной области техники, представляет собой единую химерную макромолекулу, состоящую из фрагмента антитела и домена сигнальной трансдукции, полученного из рецептора цитокинов. В некоторых случаях CAR гетеродимер-сигналоподобного антитела по настоящему изобретению, когда он присутствует в клеточной мембране эукариотической клетки, димеризуется димеризатором и активируется антигеном, например олигомеризованным антигеном, может индуцировать олигомеризацию гетеродимер-сигнальную область CAR. Такая лиганд-индуцированная олигомеризация гетеродимерной сигнальной области CAR может активировать, например, увеличивать или увековечивать, например, поддерживать трансдукцию сигнала, например, лиганд-индуцированная олигомеризация гетеродимерной сигнальной области может передавать сигнал, вызывающий клеточный ответ. В некоторых случаях множественность гетеродимерной сигнальной области CAR может быть использована комбинаторно, вызывая тем самым требуемый клеточный ответ.

В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению ограничены микроокружением. Это свойство, как правило, является следствием ограниченности микроокружения домена ASTR в CAR. Таким образом, CAR по настоящему изобретению могут обладать более низкой аффинностью связывания или, в иллюстративных вариантах осуществления, могут иметь более высокую аффинность связывания с одним или несколькими целевыми антигенами при условиях (состояниях) в микроокружении, чем при условиях в нормальной физиологической среде.

Рекомбинация последовательностей

В некоторых случаях последовательности спроектированных сигнальных полипептидов, которые могут упоминаться здесь как рекомбинантные полипептиды, могут быть перегруппированы или удалены в клетке с использованием технологии рекомбинации, специфичной для определенного участка. В некоторых вариантах осуществления ответ на конкретный сконструированный сигнальный полипептид, связанный с клеточной активацией, может быть изменен с помощью специфичной для участка технологией рекомбинации, например, первый внутриклеточный активирующий домен сконструированного сигнального полипептида, вызывающий первый ответ, связанный с активацией, может быть заменен на второй внутриклеточный активирующий домен, вызывающий второй ответ, связанный с активацией. Как будет понятно специалисту в данной области техники, рекомбинация, специфическая для участка, может быть использована в клетке для обмена любого домена или последовательности сконструированного сигнального полипептида с любым другим доменом или последовательностью, как описано в настоящем документе. Как будет также понятно специалисту в данной области техники, рекомбинация, специфическая для участка, может быть использована в клетке для удаления любого домена или последовательности сконструированного сигнального полипептида. Такой обмен и удаление последовательностей и доменов известен в данной области техники, см., например, процесс переключения домена в сигнальных устройствах, описанный в работе Топе и соавт. (2013) *Biotechnology and Bioengineering*, 3219-3226, описание которых дано в данном документе посредством ссылки. Механизмы и требования для выполнения сайт-специфической рекомбинации *in vivo* также хорошо известны в данной области техники, см., например, работу Grindley и соавт. (2006) *Annual Review of Biochemistry*, 567-605 и работу Tropp (2012) *Molecular Biology* (Jones & Bartlett Publishers, Садбери, штат Массачусетс), описание которых дано в данном документе посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, сконструированные сигнальные полипептиды генерируются путем слияния всех различных доменов, рассмотренных выше, вместе с образованием слитого белка. Сконструированный сигнальный полипептид обычно генерируется единицей транскрипции, содержащей полинуклеотидные последовательности, которые кодируют различные домены сконструированных сигнальных полипептидов, как это уже было ранее описано здесь. В некоторых вариантах осуществления ASTR по настоящему изобретению, который функционирует для распознавания и связывания с антигеном на клетках-мишенях, ограничен микроокружением.

Белки дикого типа или нативный белок, пригодный для использования в целом или частично в по меньшей мере его связывающем домене для целевого антигена (ASTR в настоящем изобретении), может быть обнаружены путем генерации библиотеки белков и скрининга библиотеки белков с желаемой аффинностью связывания с целевым антигеном. Белок дикого типа может быть обнаружен путем скрининга библиотеки кДНК. Библиотека кДНК представляет собой комбинацию клонированных фрагментов

кДНК (комплементарной ДНК), вставленных в выборку клеток-хозяев, которые вместе составляют часть транскриптома организма. кДНК получают из полностью транскрибируемой мРНК и, следовательно, он содержит кодирующую последовательность экспрессированных белков организма. Информация в библиотеках кДНК является мощным и полезным инструментом для обнаружения белков с желаемыми свойствами посредством скрининга библиотек белков с желаемой аффинностью связывания с целевым антигеном.

Комбинации

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, обеспечиваемый рекомбинантными ретровирусами, имеет одну или несколько единиц транскрипции, которые кодируют определенные комбинации одного или нескольких сконструированных сигнальных полипептидов. В некоторых способах и композициях, представленных здесь, генно-модифицированные Т-клетки включают комбинации одного или нескольких сконструированных сигнальных полипептидов после трансдукции Т-клеток рекомбинантными ретровирусами. Следует понимать, что ссылка на первый полипептид, второй полипептид, третий полипептид и т.д. дана для удобства, а элементы на «первом полипептиде» и элементы на «втором полипептиде» означают, что эти элементы находятся на разных полипептидах, которые упоминаются как первая или вторая для ссылки и условного обозначения, обычно в дополнительных элементах или этапах для этого конкретного полипептида.

В некоторых вариантах осуществления первый сконструированный сигнальный полипептид включает внеклеточный антиген-связывающий домен, который способен связывать антиген и внутриклеточный сигнальный домен. В других вариантах осуществления первый сконструированный сигнальный полипептид также включает мотив выживаемости Т-клеток и/или трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления первый сконструированный сигнальный полипептид не включает ко-стимулирующий домен, тогда как в других вариантах осуществления первый сконструированный сигнальный полипептид включает ко-стимулирующий домен.

В некоторых вариантах осуществления второй сконструированный сигнальный полипептид включает продукт лимфопролиферативного гена и, необязательно, внеклеточный антиген-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления второй сконструированный сигнальный полипептид также включает одно или несколько из следующего: мотив выживаемости Т-клеток, внутриклеточный сигнальный домен и один или несколько ко-стимулирующих доменов. В других вариантах осуществления, когда используются два сконструированных сигнальных полипептида, по меньшей мере один представляет собой CAR.

В одном варианте осуществления один или несколько сконструированных сигнальных полипептидов экспрессируются под Т-клеточным специфическим промотором или общим промотором в условиях того же транскрипта, при этом в транскрипте нуклеиновые кислоты, кодирующие сконструированные сигнальные полипептиды, разделяются нуклеиновыми кислотами, которые кодируют один или несколько внутренних сайтов связывания рибосомы (IRE) или один или несколько пептидов расщепления протеазы.

В определенных вариантах осуществления полинуклеотид кодирует два сконструированных сигнальных полипептида, при этом первый сконструированный сигнальный полипептид включает- первый внеклеточный антиген-связывающий домен, который способен связываться с первым антигеном и первым внутриклеточным сигнальным доменом, но не ко-стимулирующим доменом, а второй полипептид включает

второй внеклеточный антиген-связывающий домен, который способен связывать VEGF и второй внутриклеточный сигнальный домен, такой как, например, сигнальный домен ко-стимулирующей молекулы. В определенном варианте осуществления первым антигеном является PSCA, PSMA или BCMA. В определенном варианте осуществления 5 первый внеклеточный антиген-связывающий домен содержит антитело или его фрагмент (например, scFv), например антитело или его фрагмент, специфичный для PSCA, PSMA или BCMA. В определенном варианте осуществления второй внеклеточный антиген-связывающий домен, который связывает VEGF, является рецептором для VEGF, то есть VEGFR. В некоторых вариантах осуществления VEGFR представляет собой VEGFR1, 10 VEGFR2 или VEGFR3. В определенном варианте осуществления VEGFR представляет собой VEGFR2.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует два сконструированных сигнальных полипептида, при этом первый сконструированный сигнальный полипептид включает внеклеточный домен, связывающий антиген опухоли, 15 и сигнальный домен CD3 ξ , а второй сконструированный сигнальный полипептид включает антиген-связывающий домен, где антиген представляет собой ангиогенный или васкулогенный фактор, и один или несколько сигнальных доменов ко-стимулирующей молекулы. Ангиогенным фактором может быть, например, VEGF. Один или несколько сигнальных мотивов ко-стимулирующей молекулы могут содержать, 20 например, ко-стимулирующие сигнальные домены от каждого из рецептора CD27, CD28, OX40, ICOS и 4-1BB.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует два сконструированных сигнальных полипептида, при этом первый сконструированный сигнальный полипептид включает внеклеточный домен, кодирующий антиген опухоли, 25 и сигнальный домен CD3 ζ , второй полипептид содержит антиген-связывающий домен, который способен связываться с VEGF, и ко-стимулирующие сигнальные домены от каждого из рецептора CD27, CD28, OX40, ICOS и 4-1BB. В еще одном варианте осуществления первый сигнальный полипептид или второй сигнальный полипептид также имеет мотив выживаемости Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления 30 мотив выживаемости Т-клеток является или получен из внутриклеточного сигнального домена рецептора IL-7 (IL-7R), внутриклеточного сигнального домена рецептора IL-12, внутриклеточного сигнального домена рецептора IL-15, внутриклеточного сигнального домена рецептора IL-21 или внутриклеточного сигнального домена трансформирующего рецептора фактора роста β (TGF β) или рецептора-ловушка TGF β 35 (TGF- β -доминантно-негативный рецептор II типа (DNRII)).

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует два сконструированных сигнальных полипептида, при этом первый сконструированный сигнальный полипептид включает внеклеточный домен, кодирующий антиген опухоли, 40 и сигнальный домен CD3 ζ , а второй сконструированный сигнальный полипептид включает антиген-связывающий домен, который способен связываться с VEGF, мотив выживаемости внутриклеточного Т-клеточного рецептора IL-7 и ко-стимулирующий сигнальный доменам от каждого из рецепторов CD27, CD28, OX40, ICOS и 4-1BB.

В некоторых вариантах осуществления более чем два сигнальных полипептида кодируются полинуклеотидом. В определенных вариантах осуществления только один 45 из сконструированных сигнальных полипептидов включает антиген-связывающий домен, который связывается с опухоль-ассоциированным антигеном или опухолеспецифическим антигеном; каждый из оставшихся сконструированных сигнальных полипептидов содержит антиген-связывающий домен, который связывается

с антигеном, который не является опухоль-ассоциированным антигеном или опухолеспецифическим антигеном. В других вариантах осуществления два или более сконструированных сигнальных полипептидов включают антиген-связывающие домены, которые связываются с одним или несколькими опухоль-ассоциированными антигенами или опухолеспецифическими антигенами, причем по меньшей мере один из сконструированных сигнальных полипептидов содержит антиген-связывающий домен, который не связывается с опухоль-ассоциированным антигеном или опухолеспецифическому антигеном.

В некоторых вариантах осуществления опухоль-ассоциированным антигеном или опухолеспецифическим антигеном является Her2, простат-специфический мембранный антиген (PSCA), PSMA (антигенспецифический мембранный антиген), антиген созревания В-клеток (BCMA), альфа-фетопrotein (AFP), карциноэмбриональный антиген (CEA), раковый антиген-125 (CA-125), CA19-9, кальретицин, MUC-1, эпителиальный мембранный белок (EMA), эпителиальный опухолевый антиген (ETA), тирозиназа, меланома-ассоциированный антиген (MAGE), CD45, CD99, CD117, хромогранин, цитокератин, десмин, глиофибрилярный кислый белок (GFAP), белок жидкой кистозной болезни (GCDFP-15), антиген HMB-45, белок мелан-А (антиген меланомы, распознаваемый Т-лимфоцитами, MART-1), myo-D1, мышечно-специфический актин (MSA), нейрофиламент, нейрос-пецифическая энолаза (NSE), плацентарная щелочная фосфатаза, синаптофизин, тироглобулин, фактор транскрипции щитовидной железы-1, димерная форма изофермента типа пируваткиназы M2 (опухоль M2-PK), CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (ганглиозид G2), EphA2, CSPG4, CD138, FAP (белок активации фибробласта), CD171, каппа, лямбда, 5T4, $\alpha\beta 6$ интегрин, $\alpha\beta 3$ интегрин (CD61), галактин, K-Ras (V-Ki-ras2 вирусный онкоген саркомы кирстен-кирстен), Ra1-B, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD20, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, EGFR, EGP2, EGP40, EpCAM, эмбриональный AchR, FR α , GD3, HLA-A1+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, антиген Ley, Muc16, NCAM, NKG2D-лиганды, NY-ESO-1, PRAME, ROR1, Survivin, TAG72, TEM, VEGFR2, EGFRvIII (III вариант эпидермального фактора роста), белок спермы 17 (Sp17), мезотелин, PAP (простатическая кислая фосфатаза), проштайн, TARP (Т-клеточный рецептор гамма-чередующийся белок рамочной рамки), Trp-p8, STEAP1 (шестипермембранный эпителиальный антиген простаты 1), аномальный gas-белок или аномальный p53-белок.

В некоторых вариантах осуществления первый сконструированный сигнальный полипептид включает первый внеклеточный антиген-связывающий домен, который связывает первый антиген и первый внутриклеточный сигнальный домен; а второй модифицированный сигнальный полипептид включает второй внеклеточный антиген-связывающий домен, который связывает второй антиген или рецептор, который связывает второй антиген; и второй внутриклеточный сигнальный домен, при этом второй сконструированный сигнальный полипептид не содержит ко-стимулирующий домен. В определенном варианте осуществления первый антиген-связывающий домен и второй антиген-связывающий домен независимо представляют собой антиген-связывающую часть рецептора или антиген-связывающую часть антитела. В определенном варианте осуществления один или оба из первого антиген-связывающего домена или второго антиген-связывающего домена являются фрагментами scFv-антитела. В некоторых вариантах осуществления первый сконструированный сигнальный полипептид и/или второй сконструированный сигнальный полипептид дополнительно содержит трансмембранный домен. В определенном варианте осуществления первый сконструированный сигнальный полипептид или второй

сконструированный сигнальный полипептид содержит мотив выживаемости Т-клеток, например, любой из мотивов выживаемости Т-клеток, описанных в настоящем документе.

В другом варианте осуществления первый сконструированный сигнальный полипептид включает первый внеклеточный антиген-связывающий домен, который связывает HER2, а второй сконструированный сигнальный полипептид включает второй внеклеточный антиген-связывающий домен, который связывает MUC-1.

В другом варианте осуществления второй внеклеточный антиген-связывающий домен второго сконструированного сигнального полипептида связывает интерлейкин.

В другом варианте осуществления второй внеклеточный антиген-связывающий домен второго сконструированного сигнального полипептида связывает молекулу молекулярного образца, ассоциированную с повреждением (DAMP, также известную как алармин). В других вариантах осуществления DAMP представляет собой белок теплового шока, группу с высокой подвижностью белка, хроматин-ассоциированную группу 1 (HMGB1), S100A8 (также известную как MRP8 или калгранулин А), S100A9 (также известный как MRP14 или калгранулин В), сыворотку амилоида А (SAA), дезоксирибонуклеиновую кислоту, аденозинтрифосфат, мочевую кислоту или сульфат гепарина.

В некоторых вариантах осуществления указанный второй антиген представляет собой антиген на антителе, которое связывается с антигеном, представленным опухолевой клеткой.

В некоторых вариантах осуществления активация передачи сигнала через второй сконструированный сигнальный полипептид является неантигенным, но при этом связанным с гипоксией. В некоторых вариантах осуществления гипоксия индуцируется активацией индуцируемого гипоксией фактора-1 (HIF-1 α), HIF-1 β , HIF-2 α , HIF-2 β , HIF-3 α или HIF-3 β .

В некоторых вариантах осуществления экспрессия одного или нескольких сконструированных сигнальных полипептидов регулируется контрольным элементом *in vivo*, который более подробно описан в настоящем изобретении.

Дополнительные последовательности

Сконструированные сигнальные полипептиды, такие как CAR, могут дополнительно включать один или несколько дополнительных полипептидных доменов, при этом такие домены включают, но не ограничиваются ими, сигнальную последовательность; маркер эпитопа; домен сродства; и полипептид, который продуцирует детектируемый сигнал. Неограничивающие примеры дополнительных доменов для любого из аспектов или вариантов осуществления, представленных здесь, включают домен с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%-ной идентичностью последовательности для любой из следующих последовательностей, как описано ниже: сигнальная последовательность, маркер эпитопа, домен сродства или полипептид, который продуцирует детектируемый сигнал.

Сигнальные последовательности, подходящие для использования в CAR испытуемого, например, в первом полипептиде CAR испытуемого, включают любую последовательность сигналов эукариот, в том числе естественную сигнальную последовательность, синтетическую (например, рукотворную) сигнальную последовательность и т.д. В некоторых вариантах осуществления, например, сигнальная последовательность может быть сигнальной последовательностью CD8 MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 74).

Подходящие маркеры эпитопа включают, но не ограничиваются ими, гемагглютинин

(НА, например, YPYDVPDYA; SEQ ID NO: 37); FLAG (например, DYKDDDDK; SEQ ID NO: 38); с-мус (например, EQKLISEEDL, ПОСЛ).

Домены сродства включают пептидные последовательности, которые могут взаимодействовать со связывающим партнером, например, иммобилизованным на твердой подложке, пригодным для идентификации или очистки. Последовательности ДНК, кодирующие несколько последовательных одиночных аминокислот, таких как гистидин, когда они слиты с экспрессированным белком, могут быть использованы для одностадийной очистки рекомбинантного белка с высокой аффинностью, связывающейся со смоляной колонной, такой как серароза никеля. Типичные домены сродства включают His5 (HHHHH, SEQ ID NO: 40), HisX6 (HHHHHH, SEQ ID NO: 41), с-мус (EQKLISEEDL, SEQ ID NO: 39), Flag (DYKDDDDK, SEQ ID NO: 38), Strep Tag (WSHPQFEK, SEQ ID NO: 42), гемагглютинин, например, HA Tag (YPYDVPDYA, SEQ ID NO: 37), GST, тиоредоксин, связывающий домен целлюлозы, RYIRS (SEQ ID NO: 43), Phe-His-His -Tyr (SEQ ID NO: 44), связывающий домен хитина, S-пептид, T7-пептид, SH2-домен, С-концевой РНК-маркер, WEAAAREACCRECCARA (SEQ ID NO: 45), связывающие домены металлов, например, связывающие домены цинка или кальция, такие как кальций-связывающие белки, например, кальмодулин, тропонин С, кальциневрин В, легкая цепь миозина, регенерин, S-модулин, визинин, VILIP, нейрокальцин, гиппокальцин, частотанин, кальтрактин, кальпаинская большая субъединица, S100-белки, парвальбумин, кальбиндин D9K, кальбиндин D28K и кальретинин, интеины, биотин, стрептавидин, MyoD, Id, последовательности лейциновой молнии и мальтозо-связывающий белок.

Подходящие детектируемые сигнальные белки включают, например, флуоресцентные белки; ферменты, которые катализируют реакцию, генерирующую детектируемый сигнал в качестве продукта; и тому подобное.

Подходящие флуоресцентные белки включают, но не ограничиваются ими, зеленый флуоресцентный белок (GFP) или его варианты, синий флуоресцентный вариант GFP (BFP), голубой флуоресцентный вариант GFP (CFP), желтый флуоресцентный вариант GFP (YFP), улучшенный GFP (EGFP), улучшенный CFP (ECFP), улучшенные YFP (EYFP), GFPS65T, изумрудный, топазовый (TYFP), ожерелье Венеры, лимонный, mCitrine, GFPuv, дестабилизированный EGFP (dEGFP), дестабилизированный ECFP (dECFP), дестабилизированный EYFP (dEYFP), mCFPm, небесно-голубой, Т-сапфировый, CyPet, YPet, mKO, HcRed, t-HcRed, DsRed, DsRed2, DsRed-мономер, J-Red, димер2, 1-димер2 (12), mRFPI, поциллопорин, Renilla GFP, частица-монстр GFP, раGFP, белок Kaede и проростковый белок, фикобилипротеины и конъюгаты фикобилипротеина, включая В-фикоэритрин, R-фикоэритрин и аллоцикоцианин. Другие примеры флуоресцентных белков включают mHoneydew, mBanana, mOrange, dTomato, tdTomato, mTangerine, mStrawberry, mCherry, mGrapel, mRaspberry, mGrape2, mPlum (Shaner и соавт. (2005) Nat. Methods 2:905-909), и т.п. Любой из множества флуоресцирующих и окрашенных белков из видов Anthozoan, как описано, например, в работе Matz и соавт. (1999) Nature Biotechnol. 17:969-973, подходит для использования.

Подходящие ферменты включают, но не ограничиваются ими, пероксидазу хрена (HRP), щелочную фосфатазу (AP), бета-галактозидазу (GAL), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, бета-N-ацетилглюкозаминидазу, β -глюкуронидазу, инвертазу, ксантин Оксидазу, люциферазу светлячков, глюкозооксидазу (GO) и тому подобное.

Распознавание и/или удаление домена

Любой из рекомбинантных ретровирусов, представленных здесь, может включать нуклеиновые кислоты, которые кодируют область распознавания или удаления в рамках

нуклеиновых кислот, кодирующих любой из сконструированных сигнальных полипептидов, или отдельно от них. Таким образом, любой из сконструированных сигнальных полипептидов, представленных здесь, может включать область распознавания или удаления. Например, любой из CAR, представленных здесь, может включать домен распознавания или удаления. Более того, домен распознавания или удаления может быть выражен вместе или даже слит с любым из лимфопролиферативных элементов, представленных здесь. Домены распознавания или удаления экспрессируются в Т-клетке и/или NK-клетке, но не экспрессируются на ретровирусе.

В некоторых вариантах осуществления домен распознавания или удаления может быть получен из производного тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-tk) или индуцибельной каспазы-9. В некоторых вариантах осуществления домен распознавания или удаления может включать модифицированную эндогенную молекулу клеточной поверхности, например, как это описано в патенте США 8802374. Модифицированной эндогенной молекулой клеточной поверхности может быть любой связанный с клеточной поверхностью рецептор, лиганд, гликопротеин, молекула клеточной адгезии, антиген, интегрин или кластер дифференцировки (CD), подлежащий изменению. В некоторых вариантах осуществления модифицированная эндогенная молекула клеточной поверхности представляет собой усеченный рецептор тирозинкиназы. В одном аспекте усеченный рецептор тирозинкиназы является членом семейства рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) (например, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4). В некоторых вариантах осуществления домен распознавания может представлять собой полипептид, который распознается антителом, который в свою очередь распознается внеклеточным доменом члена EGFR. В некоторых вариантах осуществления домен распознавания может быть по меньшей мере 20 смежными аминокислотами члена семейства EGFR или, например, 20-50 смежными аминокислотами члена семейства EGFR. Например, SEQ ID NO: 78 представляет собой примерный полипептид, который распознается и в соответствующих условиях связывается антителом, которое распознает внеклеточный домен члена EGFR. Такие внеклеточные эпитопы EGFR иногда упоминаются здесь как eTags. В иллюстративных вариантах осуществления такие эпитопы распознаются коммерчески доступными моноклональными антителами к EGFR.

Рецептор эпидермального фактора роста, также известный как EGFR, ErbB1 и HER1, является рецептором клеточной поверхности для членов семейства эпидермальных факторов роста внеклеточных лигандов. Изменения в активности EGFR были связаны с некоторыми видами рака. В некоторых вариантах осуществления ген, кодирующий полипептид EGFR, включающий рецептор эпидермального фактора роста человека (EGFR), сконструирован путем удаления последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды, включая мембранный дистальный EGF-связывающий домен и цитоплазматический сигнальный хвост, но сохраняет проксимальную внеклеточную мембрану эпитопа, распознаваемого антителом к анти-EGFR. Предпочтительно, чтобы антитело представляло собой известное коммерчески доступное моноклональное антитело к EGFR, такое как цетуксимаб, матузумаб, некрититумаб или панитумумаб.

Другие исследования показали, что применение биотинилированного-цетуксимаба для елей иммуномагнитного отбора в сочетании с антибиотинowymi микро-гранулами успешно обогащает Т-клетки, которые были трансформированы лентивиально с конструкциями, содержащими EGFRt, у 2% населения до более чем 90% чистоты без наблюдаемой токсичности при подготовке клеток. Кроме того, другие исследования

показали, что конститутивная экспрессия этой инертной молекулы EGFR не влияет на фенотип или эффекторную функцию Т-клеток, как это указано координационно выраженным химерным антигенным рецептором (CAR), CD19R. Также, другие исследования показали, что с помощью проточного цитометрического метода EGFR успешно использовали в качестве маркера отслеживания *in vivo* для приживания Т-клеток у мышей. Кроме того, было продемонстрировано, что EGFR обладает потенциалом гена-суицида через пути, опосредуемые антителами, связанными с антителом к рецепту, который в свою очередь связан с антителами к рецепту, описанным Erbitux® (ADCC). Авторы настоящего изобретения успешно экспрессировали eTag в МКПК посредством лентивирусных векторов и обнаружили, что экспрессия eTag *in vitro* за счет МКПК, подвергнутых воздействию цетуксимаба, обеспечивает эффективный механизм удаления МКПК. Таким образом, EGFR можно использовать в качестве неиммуногенного инструмента для отбора, маркера отслеживания и гена-суицида для трансдуцированных Т-клеток, обладающих иммунотерапевтическим потенциалом. Нуклеиновая кислота EGFR также может быть обнаружена с помощью средств, хорошо известных в данной области.

В некоторых представленных здесь вариантах осуществления EGFR экспрессируется как часть одного полипептида, который также включает CAR или как часть одного полипептида, который включает лимфопролиферативный элемент. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность, кодирующая домен распознавания EGFR, может быть отделена от аминокислотной последовательности, кодирующей химерный антигенный рецептор, сигналом расщепления и/или последовательностью шага рибосомы. Рибосомный сигнал проскальзывания и/или расщепления может быть любым шагом рибосомы / или сигналом расщепления, известным в данной области техники. Не ограничиваясь теорией, последовательность шага рибосомы может быть, например, 2A-1 с аминокислотной последовательностью GSGEGRGSLTCDGVEENPGP (SEQ ID NO: 77). Не ограничиваясь теорией, другие примеры сигналов расщепления и последовательности шага рибосомы включают FMDV 2A (F2A); вирус 2A конского ринита (сокращенно E2A); свиной тековирс-1 2A (P2A); и вирус Thosaasigna 2A (T2A). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, кодирующая домен распознавания, может быть выполнена на том же транскрипте, что и CAR или лимфопролиферативный элемент, но отделена от полинуклеотидной последовательности, кодирующей CAR или лимфопролиферативный элемент, с помощью внутреннего участка посадки рибосом.

В других вариантах осуществления, представленных здесь эмпирически, домен распознавания может быть экспрессирован как часть слитого полипептида, соединенного с лимфопролиферативным элементом. Такие конструкции обеспечивают преимущество, особенно в сочетании с другими элементами «экономии пространства», приведенными здесь, в том плане, что они занимают меньше геномного пространства в геноме РНК по сравнению с отдельными полипептидами. В одном иллюстративном варианте осуществления eTag экспрессируется в виде слитого полипептида, соединенного с мутагеном IL7Rα, как экспериментально показано здесь.

ЭЛЕМЕНТЫ ПСЕВДОТИПИРОВАНИЯ

Многие из предложенных здесь способов и композиций включают элементы псевдотипирования. Псевдотипирование ретровирусов гликопротеинами гетерологичных оболочек обычно изменяет тропизм вируса и облегчает трансдукцию клеток-хозяев. Используемый здесь элемент псевдотипирования может включать «связывающий полипептид», включающий один или несколько полипептидов, обычно гликопротеинов,

которые идентифицируют и связывают целевую клетку-хозяина и один или несколько «фузогенных полипептидов», которые опосредуют слияние ретровирусной и целевой клетки-хозяина мембраны, тем самым позволяя ретровирусному геному проникать в целевую клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления, представленных здесь, псевдотипирующие элементами псевдотипирования представлены в виде полипептида (ов)/белка(ов) или в виде последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептид(ы)/белок(и).

В некоторых вариантах осуществления элемент псевдотипирования представляет собой оболочечный белок эндогенного вируса кошачьих (RD114), онкоретровирусный амфотропный оболочечный белок, онкоретровирусный экотропный оболочечный белок, оболочечный белок везикулярного вируса стоматита (VSV-G) и/или оболочечные белки парамиксовирусной кори Н и F.

В некоторых вариантах осуществления элементы псевдотипирования включают связывающий полипептид и фузогенный полипептид, полученный из разных белков. Например, рекомбинантные ретровирусы описанных здесь способов и композиций могут быть псевдотипами со слитыми (F) и гемагглютининовыми (H) полипептидами вируса кори (MV) в качестве неограничивающих примеров, клиническими штаммами дикого MV и вакцинными штаммами, включая штамм Эдмонстона (MV-Edm) или их фрагменты. Считается, не ограничиваясь теорией, что гемагглютининовые (H) и слитые (F) полипептиды играют роль в проникновении в клетки-хозяева, где H-белок связывает MV с рецепторами CD46, SLAM и Nectin-4 на клетках-мишенях, а F-белок опосредует слияние ретровирусных клеток и мембран клеток-хозяев. В иллюстративном варианте осуществления, особенно когда клеткой-мишенью является Т-клетка и/или НК-клетка, связывающий полипептид представляет собой полипептид вируса кори Н, а фузогенный полипептид представляет собой полипептид вируса кори F.

В некоторых исследованиях лентивирусные частицы, псевдотипированные усеченными F и H полипептидами, имели значительное увеличение титров и демонстрировали эффективность трансдукции (Funke и соавт. 2008. *Molecular Therapy*. 16(8): 1427-1436), (Frecha и соавт. 2008. *Blood*. 112(13):4843-4852). Самые высокие титры были получены, когда F цитоплазматический хвост был усечен до 30 остатков (обозначаемый как MV (Ed)-FA30 (ПОСЛЕД. №: 105)). Для вариантов H оптимальное усечение происходило при удалении 18 или 19 остатков (MV(Ed)-HA18 (SEQ ID NO: 106) или MV(Ed)-HA19), хотя варианты с усечением 24 остатков с заменой и без замены удаленных остатков аланином (MV(Ed)-HA24 (SEQ ID NO: 235) и MV(Ed)-HA24+A) также приводили к оптимальным титрам.

В некоторых вариантах осуществления, включая те, которые направлены на трансдуцирование Т-клеток и/или НК-клеток, рекомбинантные ретровирусы из описанных здесь способов и композиций псевдотипируются с мутированными или вариативными видами слитого (F) и гемагглютининового (H) полипептида вируса кори, в иллюстративных примерах - вариантами делеции цитоплазматической области полипептидов F и H вируса кори. В некоторых вариантах осуществления мутированные полипептиды F и H представляют собой «усеченные H» или «усеченные F» полипептиды, цитоплазматическая часть которых усечена, то есть аминокислотные остатки (или кодирующие нуклеиновые кислоты соответствующей молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок) были удалены. «HA_Y» и «FA_X» обозначают такой усеченный полипептид H и F, соответственно, где «Y» относится к 1-34 остаткам, которые были удалены с аминоконца, а «X» относится к 1-35 остаткам, которые были удалены с карбоксильных концов цитоплазматических доменов. В еще одном варианте

осуществления «усеченный F-полипептид» представляет собой FΔ24 или FΔ30 и/или «усеченный Н-белок» выбран из группы, состоящей из НΔ14, НΔ15, НΔ16, НΔ17, НΔ18, НΔ19, НΔ20, НΔ21+А, НΔ24 и НΔ24+4А, более предпочтительно НΔ18 или НΔ24. В иллюстративном варианте осуществления усеченный F-полипептид представляет собой MV(Ed)-FΔ30, а усеченный Н-полипептид представляет собой MV(Ed)-НΔ18.

В некоторых вариантах осуществления фузогенный полипептид включает множество элементов, выраженных в виде одного полипептида. В некоторых вариантах осуществления связывающий полипептид и фузогенный полипептид переводятся из одного и того же транскрипта, но при этом из отдельных участков связывания рибосом; в других вариантах осуществления связывающий полипептид и фузогенный полипептид разделены участком расщепления пептида, который не должен быть связан теорией, расщепляется после перевода, как это часто встречается в литературе, или последовательностью рибосомного шага. В некоторых вариантах осуществления перевод связывающего полипептида и фузогенного полипептида из отдельных участков связывания рибосом приводит к увеличению количества фузогенного полипептида по сравнению со связывающим полипептидом. В некоторых вариантах осуществления отношение фузогенного полипептида к связывающему полипептиду составляет по меньшей мере 2:1, по меньшей мере 3:1, по меньшей мере 4:1, по меньшей мере 5:1, по меньшей мере 6:1, по меньшей мере 7:1 или по меньшей мере 8:1. В некоторых вариантах осуществления отношение фузогенного полипептида к связывающему полипептиду составляет 1,5:1, 2:1 или 3:1 на нижней границе диапазона и 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 или 10:1 на верхней границе диапазона.

ЭЛЕМЕНТЫ АКТИВАЦИИ

Многие из способов и аспектов составов настоящего изобретения включают элемент активации или нуклеиновую кислоту, кодирующую элемент активации. Ограничения, связанные с трансдукцией лентивирусов (LV) в покоящиеся Т-клетки, объясняются рядом барьеров перед входом и после входа, а также клеточными ограничительными факторами (Strebel и соавт., 2009. BMC Medicine 7:48). Одним из ограничений является невозможность того, что огибающие псевдотипированные частицы LV распознают потенциальные рецепторы и опосредуют слияние с клеточной мембраной. Однако, при определенных условиях трансдукция покоящихся Т-клеток лентивирующими векторами на основе ВИЧ-1 возможна в основном в условиях комплекса CD3-рецептора (TCR) CD3 и CD-стимуляции CD28 (Korin & Zack. 1998. Journal of Virology. 72:3161-8, Maurice и соавт. 2002. Blood 99:2342-50), а также путем воздействия на цитокины (Cavalieri и соавт., 2003).

Клетки иммунной системы, такие как Т-лимфоциты, распознают и взаимодействуют с конкретными антигенами через рецепторы или рецепторные комплексы, которые после распознавания или взаимодействия с такими антигенами вызывают активацию клетки и экспансию в организме. Примером такого рецептора является антигенспецифический Т-лимфоцитарный рецепторный комплекс (TCR/CD3). Т-клеточный рецептор (TCR) экспрессируется на поверхности Т-лимфоцитов. Один компонент, CD3, отвечает за внутриклеточную сигнализацию после заполнения TCR лигандом. Т-лимфоцитарный рецептор для комплекса антиген-CD3 (TCR/CD3) распознает антигенные пептиды, которые представлены ему белками основного комплекса гистосовместимости (МНС). Комплексы МНС и пептида экспрессируются на поверхности клеток, содержащих антигены, и других Т-лимфоцитов. Стимуляция комплекса TCR/CD3 приводит к активации Т-лимфоцитов и последующему антигенспецифическому иммунному ответу. Комплекс TCR/CD3 играет центральную

роль в функции эффектора и регуляции иммунной системы.

Т-лимфоциты также требуют превращения второго ко-стимулирующего сигнала в полностью активный. Без такого сигнала Т-лимфоциты либо не реагируют на связывание антигена с РТК, либо становятся анергическими. Такой ко-стимулирующий сигнал, например, подается CD28, Т-лимфоцитарным белком, который взаимодействует с CD80 и CD86 на антиген-продуцирующих клетках. ICOS (индуцируемый ко-стимулятор), являющийся еще одним Т-лимфоцитарным белком, подает ко-стимулирующий сигнал при связывании с лигандом ICOS.

Активация комплекса CD3-рецептора TCR и ко-стимуляции с помощью CD28 может происходить при воздействии *ex vivo* на твердые поверхности (например, гранулы), покрытые анти-CD3 и анти-CD28. В некоторых описанных здесь вариантах осуществления способов и составов покаящиеся Т-клетки активируются воздействием твердых поверхностей, покрытых анти-CD3 и анти-CD28 *ex vivo*.

В некоторых описанных здесь иллюстративных вариантах осуществления способов и составов полипептиды, способные связывать CD3 и/или CD28, представлены в виде «элементов активации» на поверхности рекомбинантных ретровирусов из описанных здесь способов и составов, которые также являются аспектами изобретения.

Полипептиды, связывающие CD3 и/или CD28, называются «элементами активации» из-за их способности активировать покаящиеся Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления элемент активации представляет собой полипептид, способный связываться с CD3. В некоторых вариантах осуществления полипептидом, способным связываться с CD3, является антитело к анти-CD3 или его фрагмент, который сохраняет способность связываться с CD3. В иллюстративных вариантах осуществления антитело к CD3 или его фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело к анти-CD3, такое как, но не ограничиваясь лишь им, анти-CD3 scFv. В другом иллюстративном варианте осуществления полипептидом, способным связываться с CD3, является анти-CD3scFvFc.

Доступны некоторые моноклональные антитела против CD3 человека и их фрагменты антител и могут быть использованы в настоящем изобретении, включая, но не ограничиваясь ими, UCNT1, OKT-3, HIT3A, TRX4, X35-3, VIT3, BMA030 (BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, F111409, CLB-T3.4.2, TR-66, WT31, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW24B6, OKT3D, M-T301, SMC2 и F101.01.

В некоторых вариантах осуществления элементом активации является полипептид, способный связываться с CD28. В некоторых вариантах осуществления полипептидом, способным связываться с CD28, является антитело к анти-CD28 или его фрагмент, который сохраняет способность связываться с CD28. В других вариантах осуществления полипептидом, способным связываться с CD28, является CD80, CD86 или его функциональный фрагмент, способный индуцировать CD28-зависимую активацию Akt, например, внеклеточный домен CD80. В иллюстративных вариантах осуществления антитело к анти-CD28 или его фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело к анти-CD8, такое как, но не ограничиваясь лишь им, анти-CD28 scFv. В другом иллюстративном варианте осуществления полипептид, способный связываться с CD28, представляет собой CD80 или фрагмент CD80, такой как внешний фрагмент CD80.

Антитела к анти-CD28 известны в данной области техники и могут включать в качестве неограничивающих примеров моноклональное антитело 9.3, антитело к IgG2a (д-р Джеффри Ледбеттер, Bristol Myers Squibb Corporation, Сизтл, штат Вашингтон), моноклональное антитело к KOLT-2, IgG1, 15E8, антитело к IgG1, 248,23,2, антитело к IgM и EX5.3D10, антитело к IgG2a.

В иллюстративном варианте осуществления элемент активации включает два полипептида, полипептид, способный связываться с CD3 и полипептид, способный связываться с CD28.

В некоторых вариантах осуществления полипептид, способный связываться с CD3 или CD28, представляет собой антитело, одноцепочечное моноклональное антитело или фрагмент антитела, например фрагмент одного цельного антитела. Соответственно, фрагмент антитела может представлять собой, например, вариабельный участок с одной цепью (scFv), антитело-связывающий (Fab) фрагмент антитела, одноцепочечный антиген-связывающий фрагмент (scFab), одноцепочечный антиген-связывающий фрагмент без цистеина (scFab-C), вариабельную область фрагмента (Fv), конструкции, специфичные для соседних эпитопов антигена (CRAb), или однодоменного антитела (VH или VL).

В некоторых вариантах осуществления активационный элемент слит с гетерологичной сигнальной последовательностью и/или последовательностью присоединения гетерологичной мембраны, обе из которых помогают нацеливать элемент активации на мембрану. Гетерологичная сигнальная последовательность нацеливает элемент активации на эндоплазматический ретикулум, при этом последовательность присоединения гетерологичной мембраны ковалентно присоединяется к одной или нескольким жирным кислотам (также известной как посттрансляционная модификация липидов), так что элементы активации, слитых с последовательностью присоединения гетерологичной мембраны, закреплены в липидных рафтах плазматической мембраны. В некоторых вариантах осуществления посттрансляционная модификация липидов может происходить посредством миристоилирования, пальмитоилирования или крепления ГИФ-якоря. Миристоилирование - это посттрансляционная модификация белка, которая соответствует ковалентной связи 14-углеродной насыщенной жирной кислоты, миристиновой кислоты, с N-концевым глицином эукариотического или вирусного белка. Пальмитоилирование - это пост-трансляционная модификация белка, которая соответствует ковалентной связи ацильной цепи C16 с цистеинами и реже - с остатками серина и треонина. Крепление ГИФ-якоря относится к присоединению гликозилфосфатидилинозитола или ГИФ-якоря к C-концу белка во время пост-трансляционной модификации.

В некоторых вариантах осуществления последовательность присоединения гетерологичной мембраны представляет собой последовательность присоединения ГФИ-якоря. Гетерологичная последовательность присоединения ГФИ-якоря может быть получена из любого известного ГФИ-заякоренного белка (рассмотрен в работе Ferguson MAJ, Kinoshita T, Hart GW. *Glycosylphosphatidylinositol Anchors* (Гликозилфосфатидилинозидные якори). В: Varki A, Cummings RD, Esko JD, и соавт., ред. *Essentials of Glycobiology*. 2-е издание. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Глава 11). В некоторых вариантах осуществления гетерологичная последовательность присоединения ГФИ-якоря представляет собой последовательность присоединения ГФИ-якоря от CD14, CD16, CD48, CD55 (DAF), CD59, CD80 и CD87. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная последовательность присоединения ГФИ-якоря выводится из CD16. В иллюстративных вариантах осуществления гетерологичная последовательность присоединения ГФИ-якоря получена из Fc-рецептора FcγRIIIb (CD16b) или фактора ускорения распада (DAF), иначе известного как комплемент фактора ускорения распада или CD55.

В некоторых вариантах осуществления один или оба элемента активации включают гетерологичную сигнальную последовательность, которая способствует прямой

экспрессии элемента активации на клеточную мембрану. Можно использовать любую сигнальную последовательность, которая активна в пакующей клеточной линии. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность представляет собой сигнальную последовательность DAF. В иллюстративных вариантах осуществления элемент активации слит с сигнальной последовательностью DAF на своем N-конце и последовательностью присоединения ГИФ-якоря на своем С-конце.

В иллюстративном варианте осуществления элемент активации включает scFvFc анти-CD3, слитый с последовательностью присоединения ГИФ-якоря, полученной из CD14 и CD80, слитых с последовательностью присоединения ГИФ-якоря, полученной из CD16b; и оба они экспрессируются на поверхности рекомбинантного ретровируса, представленного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления scFvFc анти-CD3 сливается с сигнальной последовательностью DAF на своем N-конце и последовательностью присоединения ГИФ-якоря, полученной из CD14 на своем С-конце, и CD80 сливается с сигнальной последовательностью DAF на своем N-конце и последовательностью присоединения ГИФ-якоря, полученной из CD16b на своем С-конце; и оба они экспрессируются на поверхности рекомбинантного ретровируса, представленного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность DAF включает аминокислотные остатки 1-30 DAF-белка.

МЕМБРАНОСВЯЗАННЫЕ ЦИТОКИНЫ

Некоторые варианты осуществления предложенных здесь способов и аспектов композиции включают мембраносвязанный цитокин или полинуклеотиды, кодирующие мембраносвязанный цитокин. Цитокинами обычно, но не всегда, являются секретируемые белки. Естественно секретируемые цитокины могут быть сконструированы в виде слитых белков, подлежащих связыванию с мембраной. Слитые полипептиды мембраносвязанных цитокинов включены в способы и композиции, раскрытые здесь, и также являются аспектом изобретения. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные ретровирусы имеют слитый полипептид мембраносвязанного цитокина на своей поверхности, который способен связывать Т-клетку и/или NK-клетку и способствовать ее пролиферации и/или выживаемости. Как правило, мембраносвязанные полипептиды включены в мембраны рекомбинантных ретровирусов, и когда клетка трансдуцируется рекомбинантным ретровирусом, слияние ретровирусных и мембранных клеток-хозяев приводит к тому, что полипептид связывается с мембраной трансдуцированной клетки.

В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид цитокинов включает IL-7, IL-15 или его активный фрагмент. Слитые полипептиды мембраносвязанного цитокина, как правило, представляют собой цитокин, слитый с гетерологичной сигнальной последовательностью и/или последовательностью присоединения гетерологичной мембраны. В некоторых вариантах осуществления последовательность присоединения гетерологичной мембраны представляет собой последовательность присоединения ГФИ-якоря. Гетерологичная последовательность присоединения ГФИ-якоря может быть получена из любого известного ГФИ-заякоренного белка (рассмотрен в работе Ferguson MAJ, Kinoshita T, Hart GW. *Glycosylphosphatidylinositol Anchors* (Гликозилфосфатидилинозитидные якори). В: Varki A, Cummings RD, Esko JD, и соавт., ред. *Essentials of Glycobiology*. 2-е издание. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Глава 11). В некоторых вариантах осуществления гетерологичная последовательность присоединения ГФИ-якоря представляет собой последовательность присоединения ГИФ-якоря от CD14, CD16, CD48, CD55 (DAF), CD59, CD80 и CD87. В

некоторых вариантах осуществления гетерологичная последовательность присоединения ГФИ-якоря выводится из CD16. В иллюстративном варианте осуществления гетерологичная последовательность присоединения ГФИ-якоря выводится из Fc-рецептора FcγRIIb (CD16b). В некоторых вариантах осуществления ГИФ-якорем является ГИФ-якорь DAF-фактора.

В иллюстративных вариантах осуществления мембраносвязанный цитокин представляет собой слитый полипептид цитокина, слитого с DAF. Известно, что DAF-фактор накапливается в липидных рафтах, которые внедряются в мембраны ретровирусов, почкованных из упаковывающих клеток. Соответственно, не ограничиваясь теорией, считается, что слитые белки DAF-фактора преимущественно ориентированы на части мембран упаковывающих клеток, которые станут частью рекомбинантной ретровирусной мембраны.

В неограничивающих иллюстративных вариантах осуществления слитый полипептид цитокинов представляет собой IL-7 или его активный фрагмент, слитый с DAF. В конкретном неограничивающем иллюстративном варианте осуществления слитый полипептид цитокина включает в установленном порядке следующее: сигнальную последовательность DAF (остатки 1-31 DAF-фактора), IL-7 без сигнальной последовательности и остатки 36-525 DAF-фактора.

КОНТРОЛЬНЫЙ ЭЛЕМЕНТ IN VIVO

Рибопереклюватели

Некоторые из предложенных здесь композиций и способов включают один или несколько рибопереклювателей или полинуклеотидов, которые включают один или несколько рибопереклювателей, которые сами образуют различные аспекты настоящего изобретения. Рибопереклюватели являются общей чертой бактерий для регулирования экспрессии генов и представляют собой средство для достижения контроля РНК биологических функций. Рибопереклюватели представляют собой полинуклеотиды, которые могут присутствовать в 5'-нетранслируемой области мРНК и позволяют управлять экспрессией гена посредством связывания небольшого молекулярного лиганда, который индуцирует или подавляет активность рибопереклювателя. Как правило, рибопереклюватель контролирует геномный продукт, участвующий в генерации небольшого молекулярного лиганда, формируя таким образом петлю обратной связи. Рибопереклюватели обычно действуют в цис-режиме, хотя были обнаружены рибопереклюватели, которые действуют в транс-режиме. Естественные рибовыключатели состоят из двух доменов: домена аптамера, который связывает лиганд через трехмерную складчатую структуру РНК и домен переключения функций, который индуцирует или подавляет активность в рибовыключателе, исходя из отсутствия или наличия лиганда. Таким образом, имеется два подтверждения чувствительности к лигандам, достигаемой рибовыключателями, представляющими состояния включения и выключения (Garst и соавт, 2011). Функциональный домен переключения может влиять на экспрессию полинуклеотида путем регулирования: входного участка внутренней рибосомы, доступности донора сплайсинга мРНК в конструкции ретровирусного гена, передачи, прекращения транскрипции, деградации транскрипции, экспрессии miРНК или экспрессии shРНК (Dambach и Winkler, 2009). Домен аптамера и функциональный домен переключения могут быть использованы в качестве модульных компонентов, позволяющих синтетическим РНК-устройствам управлять экспрессией генов либо в качестве нативных аптамеров, мутантных/оболочечных нативных аптамеров, либо полностью синтетическими аптамерами, которые были определены посредством скрининга случайных библиотек РНК (McKeague и соавт., 2016),

Семейство пуриновых рибовыключателей представляет собой одно из самых больших семейств с более чем 500 установленными последовательностями (Mandal и соавт. 2003, патент США 20080269258 и заявка WO 2006055351). Пуриновые рибовыключатели имеют сходную структуру, состоящую из трех сохраняемых спиральных элементов /
 5 стволых структур (P1, P2, P3) с промежуточными элементами петли/соединения (J1-2, L2, J2-3, L3, J3-1). Домены аптамеров семейства пуриновых рибовыключателей, естественно, различаются в зависимости от их степени аффинности/регуляции различными пуриновыми соединениями, такими как аденин, гуанин, аденозин, гуанозин, деоксиаденозин, дезоксигуанозин (РИС. 5) и т.д. за счет вариации последовательности
 10 (Kim и соавт. 2007).

В одном аспекте, представленном здесь, описан выделенный полинуклеотид для регулирования экспрессии целевого полинуклеотида, включающий: полинуклеотид, кодирующий целевой полинуклеотид, функционально связанный с промотором и рибопереключателем, при этом рибопереключитель включает: а.) домен аптамера,
 15 способный связывать аналог нуклеозида противовирусного препарата и имеющий меньшую степень связывания с гуанином или 2'-дезоксигуанозином относительно аналога нуклеозида противовирусного препарата; и б.) функциональный домен переключения, способный регулировать экспрессию целевого полинуклеотида, при этом связывание аналога нуклеозида с помощью домена аптамера индуцирует или
 20 подавляет регулятивную активность экспрессии функционального домена переключения, тем самым регулируя экспрессию гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления целевой полинуклеотид может представлять собой область кодирования полипептида, miRNA или shRNA. В неограничивающем примере рибопереключитель функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, miRNA или shRNA с
 25 активностью *in vivo*, например, полипептид эффективный при лечении заболевания. Например, в таком неограничивающем примере рибопереключитель функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей рецептор химерный антигенный рецептор. В неограничивающих иллюстративных примерах, представленных здесь, целевой полинуклеотид кодирует один или несколько спроектированных сигнальных
 30 полипептидов, включенных в различные другие аспекты настоящего изобретения. В этих неограничивающих иллюстративных примерах рибопереключитель и целевой полинуклеотид, кодирующий один или несколько спроектированных сигнальных полипептидов, можно найти в геноме упаковывающей клетки, рекомбинантном ретровирусе, Т-клетке и/или НК-клетке.

В некоторых вариантах осуществления длина домена аптамера может быть равна от 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 и 70 нуклеотидов на нижней границе диапазона до 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 и 100 нуклеотидов на верхней границе диапазона, например, длиной от 45 до 80 нуклеотидов, длиной от 45 до 60 нуклеотидов или длиной от 45 до 58 нуклеотидов. В иллюстративных вариантах осуществления аналогом
 40 нуклеозида противовирусного препарата может выступать фармацевтический лиганд-ацикловир (также известный как ацикловир и ациклогиданозин) или пенцикловир (РИС. 5). В некоторых вариантах осуществления домен аптамера может обладать большим связующим сродством с аналогом нуклеозида противовирусного препарата (например, минимум в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз больше), чем
 45 связующее сродство с нуклеотидом или нуклеотидом.

Контрольный элемент *in vivo* способствует увеличению трансдуцированных Т-клеток *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления увеличение зависит от наличия контрольного элемента. Однако в других вариантах увеличение трансдуцированных

Т-клеток может быть по меньшей мере частично обусловлено другими факторами, такими как присутствие интерлейкинов у пациента и связывание ASTR рецептора CAR на рекомбинантной Т-клетке с ее лигандом.

В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеозида противовирусного препарата, например ацикловира или пенцикловира, вводят пациенту до, во время и/или после выделения ЛПК из крови и до того, как Т-клетки и/или НК-клетки вступят во взаимодействие с рекомбинантным ретровирусом, содержащим контрольный элемент *in vivo*, который в иллюстративных неограничивающих примерах представляет собой рибопереключател, связывающийся с аналогом нуклеозида противовирусного препарата и регулирующий экспрессию одного или нескольких целевых полинуклеотидов. Один или несколько целевых полинуклеотидов могут кодировать один или несколько полипептидов, которые в неограничивающих иллюстративных примерах представляют собой один или несколько сконструированных сигнальных полипептидов, по меньшей мере один из которых кодирует лимфопролиферативный элемент. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеозида противовирусного препарата, например ацикловира или пенцикловира, вводят пациенту в течение 5, 10, 15, 30 и 60 минут при нижней границе диапазона и 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24, 48 или 72 часов при верхней границе диапазона, до выделения ЛПК из крови или до того, как Т-клетки и/или НК-клетки вступят во взаимодействие с рекомбинантным ретровирусом. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеозида противовирусного препарата, например ацикловира или пенцикловира, вводят пациенту в течение 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 или 24 часов при нижней границе диапазона и $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 21 или 28 дней при верхней границе диапазона, после выделения ЛПК из крови или после того, как Т-клетки и/или НК-клетки вступят во взаимодействие с рекомбинантным ретровирусом при способах, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеозида противовирусного препарата, например ацикловира или пенцикловира, вводят пациенту минимум через 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 или 24 часа или минимум $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 21 или 28 дней после выделения ЛПК из крови или после того, как Т-клетки и/или НК-клетки вступят во взаимодействие с рекомбинантным ретровирусом при способах, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеозида противовирусного препарата, например ацикловира или пенцикловира, вводят пациенту минимум через 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 30, 60, 90 или 120 дней / 5, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 120 месяцев или неопределенной период времени после повторной реинфузии ЛПК пациенту. В любом из вариантов осуществления, раскрытых в данном документе, аналог нуклеозида противовирусного препарата можно вводить до и/или во время повторной реинфузии ЛПК и/или после повторной реинфузии ЛПК. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеозида противовирусного препарата вводят до тех пор, пока у пациента не пропадут симптомы заболевания, с которым связано применение целевого полинуклеотида, или оно не будет полностью излечено.

В некоторых вариантах осуществления домен аптамера может предпочтительно связывать пенцикловир над ацикловиром или, в альтернативном варианте, с другим противовирусным веществом, благодаря чему может применяться сопутствующая противовирусная терапия без влияния на рибопереключател. В некоторых вариантах осуществления домен аптамера может связывать пенцикловир с большим связующим сродством (например, минимум в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз больше), чем у домена аптамера, связывающего ацикловир или другое противовирусное вещество. В некоторых вариантах осуществления домен аптамера

может предпочтительно связывать ацикловир над пенцикловиром или, в альтернативном варианте, с другим противовирусным веществом, благодаря чему может применяться сопутствующая противовирусная терапия без влияния на рибопереключатель. В некоторых вариантах осуществления домен аптамера может связывать ацикловир с

5 большим связующим сродством (например, минимум в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз больше), чем у домена аптамера, связывающего пенцикловир или другое противовирусное вещество. В некоторых вариантах осуществления пациенту могут быть даны пероральные пролекарственные формы пеницикловира (фамцикловир) и ацикловира (валацикловир).

10 В некоторых вариантах осуществления домен аптамера выделенного полинуклеотида может обладать по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательностей или быть идентичным любой из последовательностей (SEQ ID NO: 87-93) и сохраняет способность связывать ацикловир и восстановленную способность связываться с гуанином или 2'-дезоксигуанозином

15 относительно аналога нуклеозида противовирусного препарата, а также отличающийся тем, что домен аптамера сохраняет способность индуцировать или подавлять активность, регулирующую экспрессию домена функционального переключателя, когда он связан ацикловиром. В некоторых вариантах осуществления домен аптамера выделенного полинуклеотида может обладать по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%,

20 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательностей или быть идентичным домену аптамера SEQ ID NO: 94-100 и сохраняет способность связывать пенцикловир и восстановленную способность связываться с гуанином или 2'-дезоксигуанозином относительно аналога нуклеозида противовирусного препарата, а также отличающийся тем, что домен аптамера сохраняет способность индуцировать

25 или подавлять активность, регулирующую экспрессию домена функционального переключателя, когда он связан пенцикловиром. В некоторых вариантах осуществления область выделенного полинуклеотида или область рибопереключателя может обладать по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательностей или быть идентичной любой из

30 последовательностей (SEQ ID NO: 87-100).

В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК, содержащая область домена аптамера выделенного полинуклеотида, может обладать по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательностей или быть идентичной любой из последовательностей (SEQ ID NO:

35 108-221). В некоторых вариантах осуществления область выделенного полинуклеотида может обладать по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательностей или быть идентичной любой из последовательностей (SEQ ID NO: 108-221).

В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК, содержащая

40 область домена аптамера выделенного полинуклеотида, может обладать по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 91,84%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательностей или быть идентичной ПОСЛ. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК, содержащая область домена аптамера выделенного полинуклеотида, может обладать по меньшей мере 80%, 85%,

45 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,83%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательностей или быть идентичной ПОСЛ. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК, содержащая область домена аптамера выделенного полинуклеотида, может обладать по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%,

92%, 93%, 93,88%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательностей или быть идентичной ПОСЛ. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК, содержащая область домена аптамера выделенного полинуклеотида, может обладать по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,83%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательностей или быть идентичной ПОСЛ. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК, содержащая область домена аптамера выделенного полинуклеотида, может обладать по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 91,84%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,83%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательностей или быть идентичной ПОСЛ.

В некоторых вариантах осуществления область выделенного полинуклеотида может включать любую из консенсусных последовательностей ПОСЛ. В некоторых вариантах осуществления область выделенного полинуклеотида может обладать по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95,83%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательностей или быть идентичной любой из последовательностей (SEQ ID NO: 222-226).

В любом из вариантов осуществления, раскрытых здесь, выделенный полинуклеотид может сохранять способность связывать ацикловир и/или пенцикловир. В любом из вариантов осуществления, раскрытых здесь, выделенный полинуклеотид может быть обратным комплиментом любой из последовательностей ПОСЛ. 87-100 или ПОСЛ. В любом из вариантов осуществления, раскрытых здесь, выделенный полинуклеотид может быть транскрипционной или РНК-версией либо ДНК-последовательностей SEQ ID NO: 108-221, либо ДНК-последовательностей, комплементарных ПОСЛ. В любом из вариантов осуществления, раскрытых здесь, выделенный полинуклеотид может быть обратной транскрипцией или ДНК-версией любой из РНК-последовательностей SEQ ID NO: 87-100 или ДНК-цепи, комплементарной обратной транскрипции любой из РНК-последовательностей ПОСЛ.

В некоторых вариантах осуществления, представленных здесь, каркасы рибопереклюкателей могут использоваться для мутационного анализа или молекулярной эволюции. Рибопереклюкатели, выбранные для мутационного анализа или молекулярной эволюции, могут быть взяты из любого известного организма, например бактерий. В некоторых вариантах осуществления для молекулярной эволюции может быть использован рибопереклюкатель дезоксигуанозина типа I из *Mesoplasma florum*. В некоторых вариантах осуществления производный домен аптамера может составлять по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичным домену аптамера рибопереклюкателя дезоксигуанозина типа IA из *Mesoplasma florum* (SEQ ID NO: 237). В других вариантах осуществления может использоваться рибопереклюкатель xpt из *Bacillus subtilis*. В некоторых вариантах осуществления производный домен аптамера может составлять по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичным домену аптамера рибопереклюкателя xpt из *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO: 243).

Домены аптамеров могут быть использованы в качестве модульных компонентов и объединены с любым из функциональных доменов переключения для оказания воздействия на транскрипт РНК. В любом из вариантов осуществления, раскрытых здесь, рибовыключатель может влиять на транскрипт РНК путем регулирования любого из следующих действий: внутренний сайт посадки рибосомы (IRES), доступности донора сплайсинга до мРНК, передачи, прекращения транскрипции, деградация транскрипции, экспрессии miРНК или экспрессии shРНК. В некоторых вариантах осуществления функциональный домен переключения может управлять связыванием анти-IRES с IRES

(см., например, Ogawa, RNA (2011), 17: 478-488, описание которой включено в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки). В любом из вариантов осуществления, раскрытых здесь, присутствие или отсутствие лиганда малой молекулы может привести к тому, что рибопереклюатель повлияет на транскрипт РНК. В некоторых вариантах осуществления рибопереклюатель может включать рибозим. Рибопереклюатели с рибозимами могут ингибировать или усиливать деградацию транскрипции целевых полинуклеотидов в присутствии лиганда малой молекулы. В некоторых вариантах осуществления рибозим может быть классом рибозимов в виде пистолета, классом рибозимов в виде головки молотка, классом рибозимов скрученного вида, классом рибозимов в виде топорики или рибозимом HDV (дельта-вирус гепатита).

В любом из вариантов осуществления, раскрытых здесь, рибопереклюатель может располагаться в разных положениях относительно целевого полинуклеотида, как известно, обычно для рибопереклюателей. В некоторых вариантах осуществления рибопереклюатель может регулировать доступность донора сплайсинга до мРНК и располагаться перед целевым полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления рибопереклюатель может регулировать включение poly(A)-хвоста и располагаться после целевого полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления рибопереклюатель может регулировать анти-IRES и располагаться выше IRES. В неограничивающих иллюстративных вариантах осуществления изобретения рибовыключатель может располагаться в любом из этих положений относительно нуклеиновой кислоты, кодирующей один или несколько сконструированных сигнальных полипептидов, представленных здесь.

В некоторых вариантах осуществления рибовыключатель может выйти из равновесия при температурах выше 37,5°C, 38°C, 38,5°C, 39°C, 39,5°C или 40°C таким образом, что рибопереклюатель больше не реагирует на лиганд. В некоторых вариантах осуществления для выбора рибопереклюателей, выходящих из равновесия при температурах выше 37,5°C, 38°C, 38,5°C, 39°C, 39,5°C или 40°C, может применяться метод молекулярной эволюции.

В некоторых вариантах осуществления целевой полинуклеотид может кодировать miРНК, shРНК и/или полипептид, при этом целевой полинуклеотид функционально связан с промотором. В некоторых вариантах осуществления целевой полинуклеотид может кодировать лимфопролиферативный элемент. В некоторых вариантах осуществления целевой полинуклеотид может представлять собой miРНК или shРНК. В некоторых вариантах осуществления miРНК или shРНК могут усиливать действие пути STAT5 или ингибировать путь SOCS. В некоторых вариантах осуществления miРНК или shРНК могут нацеливать транскрипты от SOCS1, SMAD2, TGFb или PD-1. В некоторых вариантах осуществления в качестве miRNA выступает miR-155. В некоторых вариантах осуществления целевой полинуклеотид кодирует полипептид, и полипептид может содержать CAR-рецептор, включающий антигенспецифическую область нацеливания, трансмембранный домен и внутриклеточный активирующий домен.

В другом аспекте, представленном здесь, описан выделенный полинуклеотид для регулирования экспрессии целевого полинуклеотида, включающий: полинуклеотид, кодирующий целевой полинуклеотид, функционально связанный с промотором и рибопереклюателем, при этом рибопереклюатель включает: а.) домен аптамера, способный связывать аналог нуклеозида противовирусного препарата с аффинностью связывания по меньшей мере в два раза большей, чем у домена аптамера, связывающего гуанин или 2'-дезоксигуанозин; и б.) функциональный домен переключения, способный

регулировать экспрессию целевого полинуклеотида, при этом связывание аналога нуклеозида с помощью домена аптамера индуцирует или подавляет регулятивную активность экспрессии функционального домена переключения. В некоторых вариантах осуществления домен аптамера может связывать аналога нуклеозида противовирусного препарата с большим связующим сродством (минимум в 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз больше), чем у домена аптамера, связывающего гуанин или 2'-дезоксигуанозин. В некоторых вариантах осуществления длина домена аптамера может быть равна от 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 и 70 нуклеотидов на нижней границе диапазона до 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 и 100 нуклеотидов на верхней границе диапазона, например, длиной от 45 до 80 нуклеотидов или от 45 до 58 нуклеотидов. В иллюстративных вариантах осуществления аналогом нуклеозида противовирусного препарата может выступать фармацевтический лиганд-ацикловир (также известный как ацикловир и ациклогианозин) или пенцикловир. В некоторых вариантах осуществления домен аптамера может обладать большим связующим сродством с аналогом нуклеозида противовирусного препарата (например, минимум в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз больше), чем связующее сродство с нуклеозидом или нуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления связывание аналога нуклеозида противовирусного препарата доменом аптамера может индуцировать активность в рибопереключателе.

В некоторых вариантах осуществления домен аптамера быть специфичным для пенцикловира и не обладает реакционной способностью к ацикловиру или, в альтернативном варианте, другому противовирусному веществу, благодаря чему может применяться сопутствующая противовирусная терапия без влияния на рибопереключателе. В некоторых вариантах осуществления домен аптамера может связывать пенцикловир с большим связующим сродством (минимум в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз больше), чем у домена аптамера, связывающего ацикловир или другое противовирусное вещество. В некоторых вариантах осуществления домен аптамера быть специфичным для ацикловира и не обладает реакционной способностью к пенцикловиру или, в альтернативном варианте, другому противовирусному веществу, благодаря чему может применяться сопутствующая противовирусная терапия без влияния на рибопереключателе. В некоторых вариантах осуществления домен аптамера может связывать ацикловир с большим связующим сродством (минимум в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз больше), чем у домена аптамера, связывающего пенцикловир или другое противовирусное вещество. В некоторых вариантах осуществления пациенту могут быть даны пероральные пролекарственные формы пеницикловира (фамцикловира) и ацикловира (валацикловира). В некоторых вариантах осуществления производный домен аптамера может составлять по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичным домену аптамера рибопереключателе дезоксигуанозина типа IA из *Mesoplasma florum*. В некоторых вариантах осуществления производный домен аптамера может составлять по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичным домену аптамера рибопереключателе xpt из *Bacillus subtilis*. В любом из вариантов осуществления, раскрытых здесь, рибовыключатель может влиять на транскрипт РНК путем регулирования любого из следующих действий: внутренний сайт посадки рибосомы, доступности донора сплайсинга до мРНК в конструкции ретровирусного гена, передачи, прекращения транскрипции, деградация транскрипции, экспрессии miРНК или экспрессии shРНК. В некоторых вариантах осуществления функциональный домен переключения может управлять связыванием анти-IRES с IRES.

В любом из вариантов осуществления, раскрытых здесь, присутствие или отсутствие лиганда малой молекулы может привести к тому, что рибопереключатель повлияет на транскрипт РНК. В некоторых вариантах осуществления рибопереключатель может включать рибозим. Рибопереключатели с рибозимами могут ингибировать или усиливать деградацию транскрипции рассматриваемых генов в присутствии лиганда малой молекулы. В некоторых вариантах осуществления рибозим может быть классом рибозимов в виде пистолета, классом рибозимов в виде головки молотка, классом рибозимов скрученного вида, классом рибозимов в виде топорика или рибозимом HDV (дельта-вирус гепатита). В некоторых вариантах осуществления рибовыключатель может выйти из равновесия при температурах выше 37,5°C, 38°C, 38,5°C, 39°C, 39,5°C или 40°C таким образом, что рибопереключатель больше не реагирует на лиганд. В некоторых вариантах осуществления для выбора рибопереключателей, выходящих из равновесия при температурах выше 37,5°C, 38°C, 38,5°C, 39°C, 39,5°C или 40°C, может применяться метод молекулярной эволюции. В некоторых вариантах осуществления целевой полинуклеотид может кодировать miРНК, shРНК и/или полипептид, при этом целевой полинуклеотид функционально связан с промотором. В некоторых вариантах осуществления целевой полинуклеотид может кодировать лимфопролиферативный элемент. В некоторых вариантах осуществления целевым полинуклеотидом может выступать miРНК и, в некоторых случаях, miРНК может стимулировать путь STAT5 или ингибировать путь SOCS. В некоторых вариантах осуществления miРНК может нацеливать транскрипты от SOCS1, SMAD2, TGF β или PD-1. В таких вариантах осуществления в качестве miRNA выступает miR-155.

В некоторых вариантах осуществления целевой полинуклеотид кодирует полипептид, и полипептид может содержать CAR-рецептор, включающий антигенспецифическую область нацеливания, трансмембранный домен и внутриклеточный активирующий домен. Другие варианты осуществления CAR-рецептор описаны в других разделах настоящего документа.

В некоторых вариантах осуществления эволюция аптамеров может быть выполнена путем выбора аптамеров из рандомизированных нативных библиотек пуринового или гуанинового аптамера с использованием методов SELEX (систематическая эволюция лигандов методом экстенсивного обогащения), включая, но не ограничиваясь, те методы, которые используют оксид графена в процессе выбора и скрининга. В других вариантах осуществления методология случайного мутагенеза, такая как подверженная ошибкам ПЦР, может быть использована для разработки конструкций аптамера или конструкций рибопереключателя, где аптамер включен в контексте любого из описанных здесь действий рибоперекключателя посредством скрининга *in vitro* или в клетках млекопитающих. В других вариантах осуществления при эволюции рибоперекключателя могут быть использованы случайные библиотеки нуклеотидов. В любом из вариантов осуществления, раскрытых здесь, рибоперекключатели могут быть идентифицированы из данных скрининга таких библиотек *in vitro* или в клетках млекопитающих.

В некоторых вариантах осуществления оболочечный или полученный домен аптамера может иметь повышенное связывание с аналогами нативного лиганда и уменьшенное связывание с нативным лигандом. В некоторых вариантах осуществления домен аптамера может быть сконфигурирован так, чтобы иметь повышенное связывание с аналогами нативного лиганда и уменьшенное связывание с нативным лигандом. В некоторых вариантах осуществления домен аптамера может быть получен из семейства пуриновых рибоперекключателей. В некоторых вариантах осуществления нативный лиганд может быть нуклеозидом или нуклеотидом, и аналог может представлять собой

аналог нуклеозида или аналог нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеозида является противовирусным препаратом. В иллюстративных вариантах осуществления домены аптамера могут быть получены из 2'-дезоксигуанозина и гуаниновых каркасов рибопереключателей, а полученные домены аптамера могут демонстрировать восстановленное связывание с 2'-дезоксигуанозином и гуанином относительно рибопереключатателя дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления рибопереключателем может регулировать доступность донора сплайсинга до мРНК в конструкции ретровирусного гена, при этом ретровирусная конструкция управляет CAR-генами или другими представляющими интерес генами из обратной цепи под общим промотором или специфическим промотором Т-клеток. В других вариантах осуществления рибопереключателем может регулировать IRES в конструкции ретровирусного гена, при этом ретровирусная конструкция управляет трансляцией CAR-генов или других представляющих интерес генов. В других вариантах осуществления рибопереключателем может контролировать прекращение транскрипта РНК, miRNA или транскрипта гена или может контролировать трансляцию транскрипта. В других вариантах осуществления рибопереключателем аналога нуклеозида может быть интегрирован рибозимом для ингибирования или усиления деградации транскрипции CAR-генов или представляющих интерес других генов в присутствии аналога нуклеозида.

В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид для регулирования экспрессии целевого полинуклеотида, который включает полинуклеотид, кодирующий целевой полинуклеотид, функционально связанный с промотором и рибопереключателем, который связывает аналог антинуклеарного нуклеозида, представляет собой вектор молекулярного клонирования. Вектор молекулярного клонирования может быть любым типом вектора молекулярного клонирования, известного в данной области техники. В качестве неограничивающих примеров вектор может представлять собой плазмиду, вирус или ретровирус, любой из которых может быть вектором экспрессии. Такой вектор экспрессии может кодировать любой из целевых полинуклеотидов, указанных выше. Один или несколько участков ограничения и/или множественного клонирования могут быть включены в вектор молекулярного клонирования 5' или 3' предлагаемого здесь рибопереключатателя таким образом, что рибопереключателем был функционально связан с целевым полинуклеотидом, вставленным в участок ограничения и/или множественного клонирования.

Молекулярные шапероны

В одном аспекте, представленный в настоящем документе способ представляет собой способ генной модификации и увеличения лимфоцитов у испытуемого, включающий:

А. взаимодействие покоящихся Т-клеток и/или НК-клеток пациента *ex vivo*, как правило, без необходимости предварительной стимуляции *ex vivo* с рекомбинантными ретровирусами, включающими:

псевдотипирующий элемент на ее поверхности, который способен связываться с Т-клеткой и/или НК-клеткой и облегчает мембранное слияние с ним рекомбинантного ретровируса; и

полинуклеотид, содержащий одну или несколько единиц транскрипции, функционально связанных с промотором, активным в Т-клетках и/или НК-клетках, причем одна или несколько единиц транскрипции кодируют первый сконструированный сигнальный полипептид, регулируемый контрольным элементом *in vivo*, причем указанный первый сконструированный сигнальный полипептид включает лимфопролиферативный элемент и/или химерный антигенный рецептор;

при этом указанное взаимодействие облегчает трансдукцию по меньшей мере некоторых из покоящихся Т-клеток и/или НК-клеток посредством рекомбинантных ретровирусов, в результате чего получают генно-модифицированные Т-клетки и/или НК-клетки;

5 А. введение генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток пациенту; и

В. соединение генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток *in vivo*, которое связывает контрольный элемент *in vivo*, что позволяет повлиять на экспрессию первого сконструированного сигнального полипептида и способствовать увеличению лимфоцитов *in vivo*, тем самым генетически модифицируя и увеличивая лимфоциты

10 пациента.

В иллюстративных вариантах осуществления трансдукция проводится без стимуляции *ex vivo*. В иллюстративных вариантах осуществления соединение представляет собой молекулярный шаперон, такой как малый молекулярный шаперон малых молекул. В иллюстративных вариантах осуществления связывание молекулярного шаперона с

15 лимфопролиферативным элементом и/или CAR-компонентом увеличивает пролиферативную активность лимфопролиферативного элемента и/или CAR-компонента. Молекулярный шаперон может быть введен пациенту до сбора крови, во время взаимодействия и/или после того, как Т-клетки и/или НК-клетки будут введены пациенту. Некоторые варианты осуществления этого аспекта включают сбор крови у

20 испытуемого. В этих вариантах осуществления введение представляет собой повторное введение клеток, которые были собраны и генетически модифицированы перед повторным введением. Весь процесс в иллюстративных вариантах осуществления представляет собой более короткий процесс, чем предыдущие способы данной области техники, как и для других аспектов настоящего изобретения. Например, весь процесс

25 может быть завершен менее чем за 48 часов, менее чем за 24 часа или менее чем за 12 часов. Весь процесс в других вариантах осуществления может быть завершен через 2, 4, 6 или 8 часов на нижней границе диапазона и 12, 24, 36 или 48 часов на верхней границе диапазона.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способов и композиций, представленных здесь, контрольным элементом *in vivo* является молекулярным шапероном. По сравнению с другими вариантами осуществления настоящего изобретения с другими контрольными элементами *in vivo*, такими как

30 рибопереключател, которые обычно связывают соединение, влияют на экспрессию лимфопролиферативного элемента или другого компонента первого или второго сконструированного сигнального полипептида здесь, молекулярные шапероны

35 представляют собой соединения, которые являются *in vivo* и, как таковые, непосредственно влияют на активность, как правило, связывания с лимфопролиферативным элементом или другим компонентом первого или второго сконструированного сигнального полипептида в настоящем документе. В

40 иллюстративных примерах таких вариантов осуществления способов, которые включают введение молекулярных шаперонов, лимфопролиферативных элементов, мембраносвязанного цитокин и/или CAR-компонентов, может быть менее активным или неактивным лимфопролиферативным элементом, мембраносвязанным цитокином и/или CAR-компонентом, связанным молекулярным шапероном для увеличения его

45 активности. Таким образом, мишенью, связанной молекулярным шапероном, обычно является целевой полипептид. В некоторых вариантах осуществления, как указано, полипептид может быть первым и/или вторым сконструированным сигнальным полипептидом или его полипептидным компонентом, на активность которого влияет

связывание с молекулярным шапероном, который в иллюстративных вариантах осуществления представляет собой молекулярный шаперон малой молекулы. В некоторых вариантах осуществления полипептид может включать лимфопротролиферативный элемент, активность которого регулируется (в иллюстративных вариантах осуществления, регулируется молекулярным шапероном, предпочтительно молекулярным шапероном малой молекулы). Молекулярный шаперон в предлагаемых здесь способах может представлять собой соединение, которое связывается с мутантным лимфопротролиферативным элементом и/или неактивным CAR-компонентом, тем самым превращая их в активные.

В других вариантах осуществления лимфопротролиферативный элемент или другой сигнальный домен был мутирован, тем самым облегчая переход в плазматическую мембрану только в присутствии небольшого молекулярного синтетического шаперона. В других вариантах осуществления шаперон способствует стабильности лимфопротролиферативного элемента или другого сигнального домена или белка, а также полураспада в качестве потенцирующего фактора.

Следует понимать, что аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения включают многие из тех этапов и составов, которые подробно описаны здесь.

Соответственно, следует понимать, что учения по всему настоящему описанию, которые относятся к таким общим элементам, относятся к аспектам и вариантам осуществления, которые используют молекулярный шаперон в качестве контрольного элемента *in vivo*, обычно связывающего лимфопротролиферативный элемент или другую молекулу-мишень непосредственно, в дополнение к или вместо других контрольных элементов *in vivo*, представленных здесь, таких как рибопереключателы, которые обычно используют молекулу, такую как лекарственный препарат, который связывает рибопереключател.

В некоторых вариантах осуществления молекулярный шаперон представляет собой соединение, которое может регулировать субклеточную локализацию мишени, например, правильное складывание и передачу целевого белка, такого как лимфопротролиферативный элемент и/или CAR-компонент, из эндоплазматического ретикулума в плазматическую мембрану или продукт ее полураспада на поверхности. В других вариантах

осуществления молекулярный шаперон может способствовать функциональной конформации дисфункциональной мишени, выступая в качестве потенцирующего фактора. Примеры молекул, выступающих в качестве шаперонов или потенцирующих факторов в отношении естественных мутагенных белков, включают лумакафтор и ивакафтор. Эти белки действуют на мутантные варианты канала хлорида CFTR, такие как G551D или F508del. Ивакафтор потенцирует активность мутирующего ионного канала G551D или F508del, тогда как лумакафтор способствует стабилизации мутирующих каналов хлорида и последующему потенцированию ивакафтором. Такие зависимые от шаперонов белки могут быть получены из естественно функциональных белков и данных скрининга на функциональную активность только в присутствии

молекулярных шаперонов. Таким образом, такие белки активны только тогда, когда присутствует шаперон. Примеры таких молекул, которые могут быть подвергнуты скринингу на специфическую активность шаперона, включают антивиралы небольшой молекулы или противомикробные средства, которые не проявляют активности в отношении нормальных человеческих белков. Соответственно, в одном варианте

осуществления молекулярный шаперон, используемый в описанных здесь способах, представляет собой противомикробное или противомикробное соединение небольшой молекулы, которое не проявляет активности в отношении нормальных человеческих белков.

В некоторых вариантах осуществления генно-модифицированные лимфоциты могут быть подвергнуты воздействию и/или испытываемому может быть введен молекулярный шаперон. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят испытываемому до, во время и/или после выделения ЛПК из крови и до того, как Т-клетки и/или НК-клетки вступят во взаимодействие с рекомбинантным ретровирусом. Рекомбинантный ретровирус в таких вариантах осуществления включает менее активный или неактивный лимфопролиферативный элемент и/или CAR-компонент, который связывается с и регулируется соединением молекулярного шаперона.

Для любого из вариантов осуществления, представленных здесь в части модификации и увеличения лимфоцитов, которые могут быть частью способов адаптивной клеточной терапии, соединение вводят пациенту в течение 5, 10, 15, 30 и 60 минут при нижней границе диапазона и 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, или 24 часов при верхней границе диапазона, до выделения ЛПК из крови или до того, как Т-клетки и/или НК-клетки вступят во взаимодействие с рекомбинантным ретровирусом. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят пациенту в течение 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 или 24 часов при нижней границе диапазона и $\frac{1}{4}$, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 21 или 28 дней при верхней границе диапазона, после выделения ЛПК из крови или после того, как Т-клетки и/или НК-клетки вступят во взаимодействие с рекомбинантным ретровирусом при способах, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят пациенту минимум через 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 или 24 часа или минимум $\frac{1}{4}$, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 21 или 28 дней после выделения ЛПК из крови или после того, как Т-клетки и/или НК-клетки вступят во взаимодействие с рекомбинантным ретровирусом при способах, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят пациенту минимум через 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 30, 60, 90 или 120 дней / 5, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 120 месяцев или неопределенной период времени после повторной реинфузии ЛПК пациенту. В любом из вариантов осуществления, раскрытых в данном документе, соединение можно вводить до и/или во время повторной реинфузии ЛПК и/или после повторной реинфузии ЛПК.

Для любого из вариантов осуществления настоящего изобретения молекулярные шапероны отсутствуют в контрольных элементах *in vivo*, связанных соединениями, которые регулируют и/или активируют их. Молекулярные шапероны представляют собой соединения, предпочтительно соединения небольших молекул, которые являются контрольными элементами *in vivo* и регулируют активность лимфопролиферативных элементов и/или функциональных компонентов CAR.

ПАКУЮЩИЕ КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ/СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ РЕТРОИРУСОВ

В одном аспекте, представленном здесь, представлена система ретровирусной упаковки, включающая: клетку млекопитающего, содержащую: а) первый трансаактиватор, экспрессированный из конститутивного промотора и способный связывать первый лиганд и первый индуцируемый промотор для воздействия на экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, функционально связанной при этом в присутствии по сравнению с отсутствием первого лиганда; б) второй трансаактиватор, способный связывать второй лиганд и второй индуцибельный промотор и влияющий на экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, функционально связанной с ней, в присутствии по сравнению с отсутствием второго лиганда; и в) генофон с пакуемой РНК для ретровирусной частицы, причем первый трансаактиватор регулирует экспрессию второго трансаактиватора, а второй трансаактиватор регулирует экспрессию ретровирусных полипептидов, участвующих в вирусной упаковке, таких

как, например, gag-полипептид, pol-полипептид и/или псевдотипирующий элемент, и необязательно другие полипептиды, которые будут включены в рекомбинантный ретровирус или рекомбинантный, и, как полагают, являются токсичными для пакующих клеточных линий таких как, например, НЕК-293. В некоторых аспектах второй

5 трансаактиватор является цитотоксичным для пакующих клеточных линий. Элементы псевдотипирования обычно способны связываться с клеточной мембраной клетки-мишени и облегчают ее слияние, как это подробно описано здесь. Таким образом, не ограничиваясь теорией, система обеспечивает способность накапливать определенные полипептиды / белки, которые не ингибируют или не подавляют или, по-видимому, не

10 ингибируют или, как полагают, не ингибируют пролиферацию или выживание клеток млекопитающих, например, токсичных белков, в то время как культивирование популяции клеток млекопитающих в течение дней или неопределенного срока и контроль индукции полипептидов, которые желательны для ретровирусного продукта, но которые являются ингибирующими или могут ингибировать или, как сообщается, являются

15 ингибиторами выживания и/или пролиферации клетки млекопитающих, например токсичные полипептиды, до более позднего времени ближе к времени, когда будут продуцироваться и собираться ретровирусы. Геном упаковываемой РНК обычно кодируется полинуклеотидом, функционально связанным с промотором, иногда называемым здесь третьим промотором для удобства, причем указанный третий

20 промотор обычно индуцируется либо первым трансаактиватором, либо вторым трансаактиватором. В иллюстративных вариантах осуществления упакованный геном РНК кодируется полинуклеотидом, функционально связанным с третьим промотором, при этом указанный третий промотор индуцируем вторым трансаактиватором. Таким образом, геном РНК, пригодный для упаковки, может быть получен в более поздний

25 момент времени, ближе к тому, когда будет собираться ретровирус.

Специалисту в данной области будет понятно, что в системе упаковки ретровирусов могут использоваться многие различные трансаактиваторы, лиганды и индуцибельные промоторы. Такие индуцибельные промоторы могут быть выделены и получены из

30 многих организмов, например, эукариот и прокариотов. Модификация индуцибельных промоторов, полученных из первого организма для использования во втором организме, например, первый прокариот и второй эукариот, первый эукариот и второй прокариот и т.д., хорошо известна в данной области техники. Такие индуцируемые промоторы и системы, основанные на таких индуцибельных промоторах, но также включая

35 дополнительные контрольные белки, включают, но не ограничиваются ими, промоторы, регулируемые спиртом (например, промотор гена алкогольдегидрогеназы I (alcA), промоторы, реагирующие на белки транскрибирующего спирта (AlcR) и т.д.), промоторы, регулируемые тетрациклином (например, промоторные системы, включая TetActivators, TetON, TetOFF и т.д.), промоторы, регулируемые стероидами (например, промоторные системы глюкокортикоидов крысы, системы промоторов рецептора

40 эстрогена человека, системы промоторов ретиноидов, системы промоторов щитовидной железы, промоторные системы экдизона, промоторные системы мифепристона и т.д.), промоторы, регулируемые металлом (например, промоторные системы металлотионеина и т.д.), регулируемые патогенезом промоторы (например, промоторы, регулируемые салициловой кислотой, промоторы, регулируемые этиленом, промоторы, регулируемые

45 бензотиадиазолом, и т.д.), промоторы, регулируемые температурой (например, индуцируемые тепловым шоком промоторы (например, HSP-70, HSP-90, соевый тепловой ударный пробой и т.д.), промоторы с легким регулированием, синтетические индуцибельные промоторы и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления

может использоваться система, регулируемая мифепристоном. В некоторых вариантах осуществления может использоваться мифепристон-индуцируемая система с авторегуляторной петлей обратной связи. В некоторых вариантах осуществления регуляторный слитый белок GAL4 экспрессируется из одной конструкции, которая также содержит повторы терминалов транспозона и участки lox и FRT. В некоторых вариантах осуществления регуляторный слитый белок GAL4 контролирует экспрессию трансаактиватора обратного тетра (rtTA) и BiTRE. В некоторых вариантах осуществления другая конструкция с участками lox и FRT содержит активирующие GAL4 последовательности (UAS) и TATA-блок промотора Elb, управляющий репортером, таким как mCherry. В некоторых вариантах осуществления регуляторный слитый белок GAL4 связывается с активирующими последовательностями GAL4-upstream (UAS) как в промоторе, контролирующем экспрессию регуляторного слитого белка GAL4, так и в промоторе, контролирующем экспрессию целевого полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления мифепристон, доксициклин и пуромидин будут использоваться для индукции и отбора пакующей клеточной линии.

В некоторых вариантах осуществления один или оба трансаактиватора могут быть разделены на два или более полипептида. В некоторых вариантах осуществления два или более полипептида могут включать домен связывания ДНК и домен активации, способный стимулировать транскрипцию на отдельных полипептидах. Такой «домен активации» не следует путать с «элементом активации», таким как полипептид, который связывает CD3, способный активировать Т-клетку и/или NK-клетку и, как правило, активирует такую Т-клетку и/или NK клетку при взаимодействии с ней, как это подробно описано здесь. Отдельные полипептиды могут дополнительно включать слияния с полипептидами, способными к димеризации посредством добавления лиганда. В некоторых вариантах осуществления домен активации может быть доменом активации p65 или его функциональным фрагментом. В иллюстративных вариантах осуществления упаковочных систем поданному изобретению ДНК-связывающим доменом может быть ДНК-связывающий домен из ZFHD1 или его функционального фрагмента. В некоторых вариантах осуществления один полипептид может быть слиянием с FKBP или функциональными мутантами и/или их фрагментами или несколькими FKBP, а другой полипептид может быть слиянием с FRB-доменом mTOR или функциональными мутагенами и/или их фрагментами, а лиганд может быть рапамицином или функциональным рапалогом. В некоторых вариантах осуществления FRB содержит мутации K2095P, T2098L и/или W2101F. В некоторых вариантах осуществления отдельными полипептидами могут быть FKBP или их функциональные фрагменты, а также кальциневрин А или его функциональные фрагменты, а димеризатором может быть FK506. В некоторых вариантах осуществления отдельными полипептидами могут быть FKBP или их функциональные фрагменты, а также CyP-Fas или его функциональные фрагменты, а димеризатором может быть FKCsA. В некоторых вариантах осуществления отдельными полипептидами могут быть GAI или их функциональные фрагменты, а также GID1 или его функциональные фрагменты, а димеризатором может быть гиббереллин. В некоторых вариантах осуществления отдельными полипептидами могут быть Snap-маркер и Halo-маркер или их функциональные фрагменты, а димеризатором может быть HaXS. В некоторых вариантах осуществления отдельные полипептиды могут включать один и тот же полипептид. Например, ДНК-связывающий домен и домен активации могут быть экспрессированы в виде слитых белков с FKBP или GyrB, а димеризатором может быть FK1012 или кумермицин, соответственно. В некоторых вариантах осуществления индуцибельный промотор может представлять собой

последовательность ДНК, при этом обычно связывается ДНК-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления индуцибельный промотор может изменяться от последовательности ДНК, при этом обычно связывается ДНК-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления любой трансактиватор может представлять собой *rtTA*, лиганд может быть тетрациклином или доксициклином, а индуцибельным промотором может быть TRE. В иллюстративных вариантах осуществления первый трансактиватор представляет собой домен активации *p65*, слитый с *FRB*, и ДНК-связывающий домен *ZFHD1*, слитый с тремя полипептидами *FKBP*, а первым лигандом является рапамицин. В дополнительных иллюстративных вариантах осуществления второй трансактиватор может представлять собой *rtTA*, второй лиганд может быть тетрациклином или доксициклином, а индуцибельным промотором может быть TRE.

В некоторых вариантах осуществления первый трансактиватор может регулировать экспрессию элемента для управления ядерным экспортом транскриптов, содержащих консенсусную последовательность, такая как HIV Rev, а консенсусная

последовательность может быть элементом ответа Rev. В иллюстративных вариантах осуществления клеткой-мишенью является Т-клетка

В некоторых вариантах осуществления элементом псевдотипирования является полипептид ретровирусной оболочки. Элемент псевдотипирования обычно включает связывающий полипептид и фузогенный полипептид для связывания и облегчения мембранного слияния клетки-мишени и вирусных мембран, как более подробно описано здесь. В некоторых вариантах осуществления элемент псевдотипирования представляет собой оболочечный белок эндогенного вируса кошачьих (RD114), онкоретровирусный амфотропный оболочечный белок, онкоретровирусный экотропный оболочечный белок и/или оболочечный белок везикулярного вируса стоматита (VSV-G). В иллюстративных

вариантах осуществления элемент псевдотипирования включает связывающий полипептид и фузогенный полипептид, полученный из разных белков, как более подробно описано в настоящем документе. Например, в иллюстративном варианте осуществления, особенно в тех случаях, когда клетка-мишень является Т-клеткой и/или НК-клеткой, связывающий полипептид представляет собой гемагглютининовый (H)

полипептид вируса кори (такой как штамм Эдмонстона вируса кори) или вариант его делеции цитоплазматического домена, а другой фузогенный полипептид представляет собой слитый (F) полипептид вируса кори (такой как штамм Эдмонстона вируса кори) или его вариант делеции цитоплазматического домена. В некоторых вариантах осуществления фузогенный полипептид может включать множество элементов,

выраженных в виде одного полипептида. В некоторых вариантах осуществления связывающий полипептид и фузогенный полипептид могут быть переведены из одного и того же транскрипта, но переведены из отдельных участков связывания рибосомы, или полипептид расщеплен после трансдукции с использованием сигнала расщепления пептида или последовательности рибосомного проскальзывания, как описано здесь в другом разделе, генерируют связывающий полипептид и фузогенный полипептид. В некоторых вариантах осуществления, где связывающий полипептид представляет собой полипептид вируса кори H или его делецию цитоплазматического домена, а фузогенный полипептид представляет собой полипептид вируса кори F или его делецию цитоплазматического домена, перевод полипептидов F и H из отдельного участка

связывания рибосомы приводит к увеличению количества полипептида F по сравнению с полипептидом H. В некоторых вариантах осуществления соотношение полипептидов F (или их делеций цитоплазматического домена) к полипептидам H (или их делеций цитоплазматического домена) составляет по меньшей мере 2:1, по меньшей мере 3:1,

по меньшей мере 4:1, по меньшей мере 5:1, по меньшей мере 6:1, по меньшей мере 7:1 или по меньшей мере 8:1.

В некоторых вариантах осуществления первый трансактиватор способен регулировать экспрессию элемента активации, способного связываться с и активировать клетку-мишень, такую как Т-клетка. Любой из описанных здесь элементов активации может быть экспрессирован. Например, в данных вариантах осуществления элемент активации может содержать: а) мембраносвязанный полипептид, способный связываться с и активировать CD3; и/или б) мембраносвязанный полипептид, способный связываться с и активировать CD28. В некоторых вариантах осуществления мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD28, представляет собой CD80, CD86 или его функциональные фрагменты, такие как внеклеточный домен CD80.

В некоторых вариантах осуществления второй трансактиватор может регулировать экспрессию РНК, которая кодирует один или несколько полипептидов-мишеней, в том числе в качестве неограничивающего примера, любой из инженерных сигнальных полипептидов, описанных здесь. Следует отметить, что предполагается, что аспект ретровирусной упаковки и способ получения рекомбинантного аспекта ретровируса не ограничиваются образованием рекомбинантных ретровирусов для трансдукции Т-клеток и/или НК-клеток, а скорее для любого типа клеток, которые могут быть трансдуцированы рекомбинантными ретровирусами. РНК в некоторых иллюстративных вариантах осуществления включает противоположную ориентацию (например, кодирование на противоположной нити и в противоположной ориентации), ретровирусные компоненты, такие как gag и pol. Например, РНК может включать 5'-3'элементы: 5'длинный концевой повтор или его активный усеченный фрагмент; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент упаковки ретровирусной цис-действующей РНК; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый и необязательно второй целевой полипептид, такой как, но не ограничиваясь ими, инженерный сигнальный полипептид (ы), который может быть удален от промотора, который в некоторых вариантах осуществления называется «четвертым» промотором только для удобства; промотор, который активен в клетке-мишени; и 3'-длинный концевой повтор или его активный усеченный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления РНК может включать центральный полипуриновый тракт (сРРТ)/элемент центральной последовательности терминации (CTS). В некоторых вариантах осуществления элемент упаковки ретровирусов cis-действующей РНК может быть HIV Psi. В некоторых вариантах осуществления элемент упаковки ретровирусов cis-действующей РНК может быть элементом ответа Rev. Сконструированный сигнальный полипептид в иллюстративных вариантах осуществления представляет собой один или несколько сконструированных сигнальных полипептидов, описанных в настоящем изобретении.

Следует понимать, что номер промотора, такой как первый, второй, третий, четвертый и т.д. промотор, приведен только для удобства. Промотор, называемый «четвертым» промоутером, не следует учитывать, поскольку не существуют какие-либо дополнительные промоторы, такие как первый, второй или третий промотор, если только такие другие промоторы не будут явно указаны.

В некоторых вариантах осуществления сконструированный сигнальный полипептид может включать первый лимфопротеративный элемент. Подходящие лимфопротеративные элементы описаны в других разделах. В качестве неограничивающего примера лимфопротеративный элемент может быть выражен в виде слияния с доменом распознавания, таким как eTag, как это указано в настоящем

изобретении. В некоторых вариантах осуществления геном упаковываемой РНК может дополнительно включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй сконструированный полипептид, включающий химерный антигенный рецептор, кодирующий любой вариант осуществления CAR, представленный в настоящем изобретении. Например, второй сконструированный полипептид может включать первую антигенспецифическую область для нацеливания, первый трансмембранный домен и первый внутриклеточный активирующий домен. Примеры антигенспецифических областей для нацеливания, трансмембранных доменов и внутриклеточных активирующих доменов описаны в других разделах настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления, где клетка-мишень является Т-клеткой, промотор, активный в клетке-мишени, активен в Т-клетке, как это описано в других разделах настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления геном упаковываемой РНК может дополнительно включать рибопереключател, как это описано в других разделах. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая сконструированный сигнальный полипептид, может иметь обратную ориентацию. В других вариантах осуществления геном упаковываемой РНК может дополнительно включать рибовыключатель, и, необязательно, рибовыключатель может иметь обратную ориентацию. В любом из раскрытых здесь вариантов осуществления полинуклеотид, включающий любой из элементов, может включать участок связывания праймера. В иллюстративных вариантах осуществления блокаторы транскрипции или последовательности polyA могут быть размещены вблизи генов для предотвращения или уменьшения нерегулируемой транскрипции. В любом из вариантов осуществления, раскрытых здесь, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая V_{prx}, может быть на второй или необязательной третьей транскрипционной единице или на дополнительной транскрипционной единице, которая функционально связана с первым индуцибельным промотором.

В другом аспекте, представленном здесь, представлен способ получения рекомбинантного ретровируса, включающий: культивирование популяции упаковочных клеток для накопления первого трансаактиватора, в котором упаковочные клетки включают первый трансаактиватор, экспрессированный из конститутивного промотора, причем первый трансаактиватор способен связывание первого лиганда и первого индуцибельного промотора для воздействия на экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, функционально связанной с ней, в присутствии по сравнению с отсутствием первого лиганда, причем экспрессия второго трансаактиватора регулируется первым трансаактиватором; инкубирование популяции упаковочных ячеек, включая накопленный первый трансаактиватор, в присутствии первого лиганда для накопления второго трансаактиватора, причем второй трансаактиватор способен связывать второй лиганд и второй индуцибельный промотор для воздействия на экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, функционально связанной с ней в присутствии по сравнению с отсутствием второго лиганда; и инкубирование популяции упаковочных клеток, включая накопленный второй трансаактиватор, в присутствии второго лиганда, тем самым индуцируя экспрессию ретровирусных полипептидов, участвующих в вирусной упаковке, таких как, например, gag-полипептид, pol-полипептид и/или элемент псевдотипирования, и, возможно, другие полипептиды, которые, как полагают, ингибируют пролиферацию или выживаемость клеток млекопитающих, которые будут включены в рекомбинантный ретровирус или рекомбинантный ретровирус, тем самым создавая рекомбинантный ретровирус. В иллюстративных

вариантах осуществления геном РНК с пакуемой кодировкой кодируется полинуклеотидом, функционально связанным с промотором, иногда называемым для удобства в качестве «третьего» промотора, в котором указанный третий промотор является либо конститутивно активным, либо индуцируемым либо первым трансаактиватором, либо, в иллюстративных вариантах осуществления, второй трансаактиватор, тем самым создавая рекомбинантный ретровирус. Элементы псевдотипирования обычно способны связываться с клеточной мембраной клетки-мишени и облегчают слияние мембраны-мишени-мишени с рекомбинантной ретровирусной мембраной. Элементами псевдотипирования могут быть любые огибающие белки, известные в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления белок огибающей может представлять собой белок оболочки вируса везикулярного стоматита (VSV-G), белок оболочки эндогенного вируса кошек (RD114), онкоретровирусный амфотропный огибающий белок и/или онкоретровирусный протеин экотропной оболочки. Специалисту в данной области техники будет понятно, что в способе получения рекомбинантного ретровируса можно использовать множество различных трансаактиваторов, лигандов и индуцибельных промоторов. Подходящие трансаактиваторы, лиганды и индуцируемые промоторы описаны в другом месте здесь, включая выше. Специалист в данной области техники будет также понимать, что приведенные выше учения, относящиеся к аспекту системы ретровирусной упаковки, относятся также к способу рекомбинантного ретровируса, а также к обратному.

В некоторых вариантах осуществления первый трансаактиватор может регулировать экспрессию элемента для управления ядерным экспортом транскриптов, содержащих консенсусную последовательность, например, Rev Rev, а консенсусная последовательность может быть элементом Rev Response (RRE). В иллюстративных вариантах осуществления целевая ячейка обычно представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления HIV RRE и полинуклеотидная область, кодирующая HIV Rev, могут быть заменены RRE HIV-2 и полинуклеотидной областью, кодирующей HIV-2 Rev, соответственно. В некоторых вариантах осуществления HIV RRE и полинуклеотидная область, кодирующая HIV Rev, могут быть заменены SIV RRE и полинуклеотидной областью, кодирующей SIV Rev, соответственно. В некоторых вариантах осуществления RRE HIV и полинуклеотидная область, кодирующая HIV Rev, могут быть заменены RemREs и полинуклеотидной областью, кодирующей бетаретровирус Rem, соответственно. В некоторых вариантах осуществления HIV RRE и полинуклеотидная область, кодирующая HIV Rev, могут быть заменены дельтаретровирусом RexRRE и полинуклеотидной областью, кодирующей дельтаретровирус Rex соответственно. В некоторых вариантах осуществления Rev-подобный белок не требуется, и RRE могут быть заменены *cys*-действующими элементами РНК, такими как конститутивный транспортный элемент (СТЕ).

В некоторых вариантах осуществления элемент псевдотипирования представляет собой вирусный огибающий белок. Элемент псевдотипирования обычно включает связывающий полипептид и фузогенный полипептид для связывания и облегчения мембранного слияния вирусных и целевых клеточных мембран. В некоторых вариантах осуществления элемент псевдотипирования может представлять собой оболочечный белок эндогенного вируса кошачьих (RD114), онкоретровирусный амфотропный оболочечный белок, онкоретровирусный экотропной оболочечный белок и/или оболочечный белок везикулярного вируса стоматита (VSV-G). В иллюстративных вариантах осуществления элемент псевдотипирования включает связывающий полипептид и фузогенный полипептид, полученный из разных белков, как более

подробно описано в настоящем документе. Например, в иллюстративном варианте осуществления, особенно когда клеткой-мишенью является Т-клетка и/или NK-клетка, вариант делеции цитоплазматического домена полипептида вируса кори Н, а фузогенный полипептид может быть вариантом делеции цитоплазматического домена полипептида вируса кори F. В некоторых вариантах осуществления фузогенный полипептид может включать множество элементов, выраженных в виде одного полипептида. В некоторых вариантах осуществления связывающий полипептид и фузогенный полипептид могут быть переведены из одного и того же транскрипта и переведены из отдельных участков связывания рибосомы, или полипептид может быть расщеплен после трансдукции с использованием сигнала расщепления пептида или последовательности рибосомного проскальзывания, как описано здесь в другом разделе, генерируют связывающий полипептид и фузогенный полипептид. В некоторых вариантах осуществления перевод связывающего полипептида и фузогенного полипептида из отдельных участков связывания рибосом приводит к увеличению количества фузогенного полипептида по сравнению со связывающим полипептидом. В некоторых вариантах осуществления отношение фузогенного полипептида к связывающему полипептиду составляет по меньшей мере 2:1, по меньшей мере 3:1, по меньшей мере 4:1, по меньшей мере 5:1, по меньшей мере 6:1, по меньшей мере 7:1 или по меньшей мере 8:1.

В некоторых вариантах осуществления первый трансактиватор способен регулировать экспрессию элемента активации, способного связываться с и активировать клетку-мишень, такую как Т-клетка. В данных вариантах осуществления элемент активации может содержать: а) мембраносвязанный полипептид aa, способный связываться с и активировать CD3; и/или мембраносвязанный полипептид, способный связываться с и активировать CD28. В некоторых вариантах осуществления мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD28, представляет собой CD80, CD86 или его функциональные фрагменты. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный ретровирус может включать активационный элемент на ретровирусной мембране и ретровирусную РНК в нуклеокапсиде, тем самым создавая рекомбинантный ретровирус.

В некоторых вариантах осуществления второй трансактиватор может регулировать экспрессию РНК, включающей 5'-3' элементы: 5'-длинный концевой повтор или его активный усеченный фрагмент; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент упаковки ретровирусной *cys*-действующей РНК; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый целевой полипептид и необязательный второй целевой полипептид, в качестве неограничивающего примера, один или два спроектированных сигнальных полипептида; промотор, который активен в клетке-мишени; и 3'-длинный концевой повтор или его активный усеченный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления РНК может включать элемент *cPPT/CTS*. В некоторых вариантах осуществления РНК может включать участок связывания праймера. В некоторых вариантах осуществления элемент упаковки ретровирусов *cis*-действующей РНК может быть HIV Psi. В некоторых вариантах осуществления элемент упаковки ретровирусов *cis*-действующей РНК может быть элементом ответа Rev. В любом из вариантов осуществления, раскрытых здесь, ретровирусные компоненты на РНК, включая RRE и Psi, могут быть расположены в любом положении, как это должно быть понятно квалифицированному специалисту. Сконструированный сигнальный полипептид в иллюстративных вариантах осуществления представляет собой один или несколько сконструированных сигнальных полипептидов, описанных в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления сконструированный сигнальный полипептид может включать первый лимфопротеративный элемент. Подходящие лимфопротеративные элементы описаны в других разделах. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления лимфопротеративный элемент является мутагеном рецептора IL-7, слитым с доменом распознавания, таким как eTag. В некоторых вариантах осуществления геном упаковываемой РНК может дополнительно включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй сконструированный полипептид, включающий химерный антигенный рецептор, кодирующий любой вариант осуществления CAR, представленный в настоящем изобретении. Например, второй сконструированный полипептид может включать первую антигенспецифическую область для нацеливания, первый трансмембранный домен и первый внутриклеточный активирующий домен.

Примеры антигенспецифических областей для нацеливания, трансмембранных доменов и внутриклеточных активирующих доменов описаны в других разделах настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления, где клетка-мишень является Т-клеткой, промотор, активный в клетке-мишени, активен в Т-клетке, как это описано в других разделах настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления геном упаковываемой РНК может дополнительно включать рибопереклюатель, как это описано в других разделах. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая сконструированный сигнальный полипептид, может иметь обратную ориентацию. В других вариантах осуществления геном упаковываемой РНК может дополнительно включать рибовыключатель, и, необязательно, рибовыключатель может иметь обратную ориентацию. В любом из раскрытых здесь вариантов осуществления полинуклеотид, включающий любой из элементов, может включать участок связывания праймера. В иллюстративных вариантах осуществления блокаторы транскрипции или последовательности polyA могут быть размещены вблизи генов для предотвращения или уменьшения нерегулируемой транскрипции. В любом из вариантов осуществления, раскрытых здесь, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая V_{px}, может быть на второй или необязательной третьей транскрипционной единице или на дополнительной транскрипционной единице, которая функционально связана с первым индукцибельным промотором.

В некоторых вариантах осуществления упаковочной системы или способах для создания ретровирусных аспектов кодируемая РНК может включать в себя интрон, который может быть транскрибирован, например, из того же промотора для экспрессии целевого полипептида (ов). Такой интрон может кодировать 1, 2, 3 или 4 miRNA в определенных иллюстративных вариантах осуществления. В этих и других вариантах осуществления упаковочной системы или способах для создания ретровирусных аспектов геном РНК в упаковке составляет 11000 КБ или менее, а в некоторых случаях - 10000 КБ или менее.

В некоторых вариантах осуществления первый трансаактиватор может влиять на экспрессию одного или нескольких полипептидов, которые являются нетоксичными. В некоторых вариантах осуществления второй трансаактиватор может влиять на экспрессию одного или нескольких полипептидов, которые являются токсичными. Например, первый трансаактиватор может индуцировать экспрессию ретровирусных белков Rev и V_{px} в дополнение к полипептидам, которые будут перенесены в клеточную мембрану упаковочной клетки, а второй трансаактиватор может индуцировать экспрессию ретровирусных белков GAG, POL, MV(Ed)-FA30 и либо MV(Ed)-HA18, либо

MV(Ed)-HΔ24 и экспрессию лентивирусного генома. В некоторых вариантах осуществления первый трансаактиватор может влиять на экспрессию одного или нескольких полипептидов, которые являются токсичными и/или второй трансаактиватор может влиять на экспрессию одного или нескольких полипептидов, которые являются

5 нетоксичными.

В другом аспекте, представленном здесь, представлена упаковочная ячейка для млекопитающих, включающая: а) первую транскрипционную единицу в геноме упаковочной клетки млекопитающего, включая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый трансаактиватор, причем указанная первая

10 транскрипционная единица функционально связана с конститутивным промотором и где указанный трансаактиватор способен связывать первый индуцируемый промотор и влияет на экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, функционально связанной с ней, в присутствии по сравнению с отсутствием первого лиганда и где указанный первый трансаактиватор способен связывать указанный первый лиганд; б)

15 вторую и необязательную третью транскрипционную единицу в геноме упаковки для млекопитающих, включая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ретровирусный белок REV, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй трансаактиватор, способный связывать второй индуцибельный промотор и влияющий на экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, функционально

20 связанной с ней в присутствии по сравнению с отсутствием второго лиганда, причем второй трансаактиватор способен связывать второй лиганд и где вторая и необязательная третьи транскрипционные звенья функционально связаны с первым индуцибельным промотором; с) четвертую и необязательную пятую транскрипционную единицу в геноме упаковки для млекопитающих, включая последовательность нуклеиновой

25 кислоты, кодирующую ретровирусный полипептид gag и ретровирусный полипептид полипептида, и связывающий полипептид и фузогенный полипептид, которые способны связываться и облегчая слияние мембраны целевой клетки и ретровирусной мембраны, причем четвертая и необязательная пятая транскрипционная единица функционально связаны со вторым индуцибельным промотором; и d) шестой блок транскрипции в

30 геноме упаковочной клетки млекопитающего, включающий от 5' до 3', 5'-LTR или его активный усеченный фрагмент, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ретровирусный *cys*-действующий РНК-упаковочный элемент, элемент *cPPT* / *CTS*, обратное дополнение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей инженерный сигнальный полипептид, интрон, промотор, который активен в клетке-

35 мишени, и 3'-LTR или его активный усеченный фрагмент, где шестой блок транскрипции функционально связан со вторым индуцибельным промотором.

В другом аспекте, представленном здесь, представлен способ получения рекомбинантного ретровируса, включающий: 1.) культивирование популяции упаковочных клеток для накопления первого трансаактиватора, в котором упаковочные

40 клетки включают: а) первую транскрипционную единицу в геноме упаковки для млекопитающих, включая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый трансаактиватор, причем указанный первый блок транскрипции функционально связан с конститутивным промотором и где указанный трансаактиватор способен связывать первый индуцируемый промотор и влияет на экспрессию последовательности

45 нуклеиновой кислоты, функционально связанной с ней, в присутствии по сравнению с отсутствием первого лиганда и где указанный первый трансаактиватор способен связывание указанного первого лиганда; б) вторую и необязательную третью транскрипционную единицу в геноме упаковки для млекопитающих, включая

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ретровирусный белок REV, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй трансактиватор, способный связывать второй индуцибельный промотор и влияющий на экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, функционально связанная с ней в присутствии

5 по сравнению с отсутствием второго лиганда, причем второй трансактиватор способен связывать второй лиганд и где вторая и необязательная третья транскрипционные звенья функционально связаны с первым индуцибельным промотором; с) четвертую и необязательную пятую транскрипционную единицу в геноме упаковки для

10 млекопитающих, включая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ретровирусный полипептид gag и ретровирусный полипептид полипептида, и связывающий полипептид и фузогенный полипептид, которые способны связываться и облегчая слияние ретровирусной мембраны с мембраной клетки-мишени, причем четвертая и необязательная пятая транскрипционная единица функционально связаны со вторым индуцибельным промотором; и d) шестой блок транскрипции в геноме

15 упаковки для млекопитающих, включающий от 5' до 3', 5'LTR или его активный усеченный фрагмент, сайт связывания праймера (PBS), последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ретровирусный *cys*-действующий РНК-упаковочный элемент, элемент *cPPT* / *CTS*, обратное дополнение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей инженерный сигнальный полипептид, интрон, промотор клетки-мишени,

20 который активен в клетке-мишени, 3'-LTR или активный усеченный фрагмент, где пятый блок транскрипции функционально связан со вторым индуцибельным промотором; и 2.) инкубацию популяции упаковочных клеток, включая первый трансактиватор, в присутствии первого лиганда для накопления второго трансактиватора и ретровирусного белка REV; и 3.) инкубацию популяции упаковочных клеток, включая

25 второй трансактиватор и ретровирусный белок REV, в присутствии второго лиганда, тем самым индуцируя экспрессию ретровирусного полипептида-кляпа, ретровирусного полипептида полипептида, связывающего полипептида, фузогенного полипептида и ретровирусную РНК, включающую от 5' до 3', 5-LTR или ее активный фрагмент, PBS, ретровирусный *cys*-действующий РНК-упаковочный элемент, обратный комплемент

30 последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей инженерный сигнальный полипептид, промотор клетки-мишени, и 3'-LTR или его активный усеченный фрагмент, где рекомбинантные ретровирусы образуются и высвобождаются из упаковочных клеток, а рекомбинантные ретровирусы включают связывающий полипептид и/или фузогенный полипептид на ретровирусной мембране и ретровирусной РНК в пределах

35 нуклеокапсид, тем самым делая рекомбинантные ретровирусы.

В одном аспекте, представленном здесь, система ретровирусной упаковки может включать в себя клетку млекопитающего, включающую: 1.) первый трансактиватор, экспрессируемый из конститутивного промотора и способный связывать первый лиганд и первый индуцируемый промотор для воздействия на экспрессию последовательности

40 нуклеиновой кислоты, функционально связанной с ней, в присутствии по сравнению с отсутствием первого лиганда; 2.) второй трансактиватор, способный связывать второй лиганд и второй индуцибельный промотор и влияющий на экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, функционально связанной с ней, в присутствии по сравнению с отсутствием второго лиганда; и 3.) упакованный геном

45 РНК для ретровирусной частицы, причем первый трансактиватор регулирует экспрессию второго трансактиватора, HIV REV, ILF GPI DAF и элемента активации, а второй трансактиватор регулирует экспрессию gag-полипептида, полипептид полипептида, ретровирусный *cys*-действующий упаковочный элемент РНК и один или несколько

полипептидов оболочки. В иллюстративных вариантах осуществления первый трансактиватор может быть FRB-доменом, слитым с доменом активации р65, и одним или несколькими доменами FKBP, слитыми с ДНК-связывающим доменом ZFHD1, первым лигандом может быть рапамицин, а первым индуцибельным промотором может
 5 быть один или более ZFHD1 участок связывания. В иллюстративных вариантах осуществления второй трансактиватор может представлять собой белок rtTA, вторым лигандом может быть тетрациклин или доксициклин, а второй индуцибельный промотор может быть промотором TRE или двунаправленным промотором TRE. В иллюстративных вариантах осуществления элемент упаковки ретровирусной sys-
 10 активирующей РНК может быть HIV Psi. В иллюстративном введении один или несколько оболочечных белков включают варианты делеции цитоплазматических доменов полипептидов вируса кори F и H. В иллюстративных вариантах осуществления блокаторы транскрипции или последовательности polyA могут быть размещены вблизи генов для предотвращения или уменьшения нерегулируемой транскрипции. В некоторых
 15 вариантах осуществления может быть использован индуцируемый рапамицин-доксициклин лентивирусный геном с рибосомахом (SEQ ID NO: 83). В некоторых вариантах осуществления можно использовать индуцируемый рапамицин-доксициклин GAG POL ENV (SEQ ID NO: 84). В некоторых вариантах осуществления можно использовать активатор, способный индуцировать рапамицин TET, (SEQ ID NO: 85).
 20 В некоторых вариантах осуществления может быть использован индуцируемый рапамицин индуктор REV srcVpx (SEQ ID NO: 86).

Некоторые аспекты настоящего раскрытия включают или представляют собой клетки в иллюстративных примерах клетки млекопитающих, которые используются в качестве упаковочных клеток для создания ретровирусов, таких как лентивирусы, для
 25 трансдукции Т-клеток и/или НК-клеток. Любой из множества клеток может быть выбран для производства вируса *in vitro*, такого как перенаправленный ретровирус, согласно изобретению. Обычно используются эукариотические клетки, особенно клетки млекопитающих, включая клетки человека, обезьян, собак, кошек, лошадей и грызунов. В иллюстративных примерах клетки являются клетками человека. В дополнительных
 30 иллюстративных вариантах осуществления клетки воспроизводятся бесконечно и поэтому бессмертны. Примеры клеток, которые могут быть преимущественно использованы в настоящем изобретении, включают клетки NIH 3T3, клетки COS, клетки почки мыши Madin-Darby, эмбриональные клетки 293Т человека и любые клетки, полученные из таких клеток, такие как gpnlslacZ фNX клетки, которые получены из
 35 293Т клетки. Могут быть использованы сильно трансфицируемые клетки, такие как клетки эмбриональной почки 293Т человека. Под «сильно трансфективным» подразумевается, что по меньшей мере около 50%, более предпочтительно по меньшей мере около 70% и наиболее предпочтительно по меньшей мере около 80% клеток могут экспрессировать гены введенной ДНК.

40 Подходящие клетки млекопитающих включают первичные клетки и иммортализованные клеточные линии. Подходящие клеточные линии млекопитающих включают клеточные линии человека, линии клеток приматов человека, клеточные линии грызунов (например, мышь, крыса) и тому подобное. Подходящие клеточные линии млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, клетки HeLa (например,
 45 Американская коллекция клеточных культур (ATCC) №CCL-2), клетки CHO (например, ATCC №CRL9618, CCL61, CRL9096), 293 клетки (например, ATCC №CRL-1573), клетки Vero, клетки NIH 3T3 (например, ATCC №CRL-1658), клетки Huh-7, BHKcells (например, ATCC №CCL10), клетки PC12 (ATCC №CRL1721), Клетки COS, клетки COS-7 (ATCC

№. CRL1651), клетки RAT1, мышинные L-клетки (ATCC №CCL1.3), клетки эмбриональной почки человека (НЕК) человека (ATCC №CRL1573), клетки HLНepG2, Hut-78, Jurkat, HL-60, НК-клеточные линии (например, NKL, NK92 и YTS) и тому подобное.

В любом из вариантов осуществления, раскрытых здесь, способы получения рекомбинантного ретровируса могут включать в себя выращивание упаковочных клеток млекопитающих до 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% слияний или до 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% пиковой плотности клеток, а затем расщепление или разбавление клеток.

В некоторых вариантах осуществления реактор с мешалкой может использоваться для выращивания клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки могут быть разделены по меньшей мере примерно 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:15 или 1:20, используя способы, которые будут понятны квалифицированному специалисту. В некоторых вариантах осуществления клетки могут быть разбавлены до 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% максимальной плотности клеток. В некоторых вариантах осуществления после расщепления или разбавления клеток клетки можно выращивать в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 или 16 часов или 1, 2, 3, 4, 5, 6, или 7 дней до добавления первого лиганда. В некоторых вариантах осуществления клетки выращивают в присутствии первого лиганда в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21 или 28 дней при наличии первого лиганда, который в иллюстративных вариантах может быть рапамицином или рапалогом. В некоторых вариантах осуществления может быть добавлен второй лиганд, и клетки могут быть выращены по меньшей мере в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21 или 28 дней, которые в иллюстративных вариантах осуществления могут быть тетрациклином или доксициклином. Условия культивирования будут зависеть от используемых клеток и лигандов, а также способов, известных в данной области техники. Конкретный пример условий культивирования и индуцирования клеток НЕК293S показан в примере 8.

Как раскрыто здесь, рекомбинантные ретровирусы являются обычным инструментом доставки генов (Miller, Nature (1992) 357: 455-460). Способность рекомбинантных ретровирусов доставлять незаписанную последовательность нуклеиновой кислоты в широкий диапазон соматических клеток грызунов, приматов и человека делает рекомбинантные ретровирусы хорошо подходящими для переноса генов в клетку. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный ретровирус может быть получен из рода Alpharetrovirus, рода Betaretrovirus, рода Gammaretrovirus, рода Deltaretrovirus, рода Epsilonretrovirus, рода Lentivirus или рода Spumavirus. Существует множество ретровирусов, пригодных для использования в описанных здесь способах. Например, вирус мышинной лейкемии (MLV), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус инфекционной анемии лошадей (EIAV), вирус опухоли молочной железы мыши (MMTV), вирус саркомы Rous (RSV), вирус саркомы Fujinami (FuSV), лейкоз молони Moloney (Mo-MLV), вируса остеосаркомы мыши FBR (FBR MSV), вируса саркомы мыши Moloney (Mo-MSV), вируса лейкемии Avelson (A-MLV), вируса миелоцитоматоза птиц-29 (MC29) и вируса эритробластоза птиц (AEV). Подробный список ретровирусов можно найти в Coffin et al («Retroviruses» 1997 Cold Spring Harbor Laboratory Press Eds: J M Coffin, S M Hughes, H E Varmus pp. 758-763). Сведения о геномной структуре некоторых ретровирусов можно найти в данной области. В качестве примера, подробности о ВИЧ можно найти в банке генов NCBI (то есть в отношении доступа к геному №AF033819).

В иллюстративных вариантах осуществления рекомбинантный ретровирус может быть получен из рода Lentivirus. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный ретровирус может быть получен из ВИЧ, SIV или FIV. В дальнейших иллюстративных

вариантах осуществления рекомбинантный ретровирус может быть получен из вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) в гене *Lentivirus*. Лентивирусы представляют собой сложные ретровирусы, которые помимо общих ретровирусных генов *gag*, *pol* и *env* содержат другие гены с регуляторной или структурной функцией. Более высокая сложность позволяет лентивирусу модулировать его жизненный цикл, как при латентной инфекции. Типичным лентивирусом является вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), этиологический агент СПИДа. *In vivo* ВИЧ-клетка может инфицировать терминально дифференцированные клетки, которые редко делятся, такие как лимфоциты и макрофаги.

В иллюстративных вариантах осуществления рекомбинантные ретровирусы, представленные здесь, содержат полипептид Vpx. Полипептид Vpx может быть экспрессирован в линии упаковывающих клеток после интеграции кодирующей Vpx нуклеиновой кислоты в ее геном, например, в виде клетки мембраносвязанного белка, который вводится в ретровирусную мембрану (Durand и соавт, J. Virol. (2013) 87: 234-242). Ретровирусную мембраносвязанную Vpx можно сконструировать с помощью последовательности обработки вирусной протеазы, так что свободный Vpx высвобождается после включения в вирусную частицу. Таковым примером слияния Vpx с этой функциональностью является Src-Flag-Vpx, который включает мембранный целевой домен (MGSSKSKPKDP) (SEQ ID NO: 227) из первых 11 аминокислот c-Src с последующим расщеплением вирусной протеазы домена KARVLAEA (SEQ ID NO: 228), а затем маркера Flag Vpx.

Не ограничиваясь теорией, полипептиды Vpx помогают в трансдукции покоящихся клеток, стимулируя эффективность процесса обратной транскрипции, деградируя рестрикционный фактор SAMHD1. Соответственно, предполагается, что в предлагаемых здесь способах, где Vpx присутствует в рекомбинантном ретровирусе, используемом для трансдукции Т-клеток и/или NK-клеток, Vpx высвобождается в цитоплазму покоящейся Т-клетки или покоящейся NK-клетки при трансдукции клетки рекомбинантным ретровирусом, который содержит Vpx. Vpx затем расщепляет SAMHD1, что вызывает увеличение свободных dNTP, что, в свою очередь, стимулирует обратную транскрипцию ретровирусного генома

ВЕЛИЧИНА РЕТРОВИРУСНОГО ГЕНОМА

В способах и композициях, представленных здесь, рекомбинантные ретровирусные геномы, в неограничивающих иллюстративных примерах, лентививные геномы, имеют ограничение на количество полинуклеотидов, которые могут быть упакованы в вирусную частицу. В некоторых вариантах осуществления, представленных здесь, полипептиды, кодируемые полинуклеотидной кодирующей областью, могут быть усечениями или другими делециями, которые сохраняют функциональную активность, так что область, кодирующая полинуклеотид, кодируется меньшим количеством нуклеотидов, чем полинуклеотидная кодирующая область для полипептида дикого типа. В некоторых вариантах осуществления полипептиды, кодируемые полинуклеотидной кодирующей областью, могут представлять собой гибридные полипептиды, которые могут быть экспрессированы из одного промотора. В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид может иметь сигнал расщепления для генерирования двух или более функциональных полипептидов из одного слитого полипептида и одного промотора. Кроме того, некоторые функции, которые не требуются после первоначальной трансверсии *ex vivo*, не включаются в ретровирусный геном, а скорее присутствуют на поверхности вируса или ретровируса через мембрану упаковочной клетки. Эти различные стратегии используются здесь для максимизации функциональных элементов, которые упакованы в ретровирус.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный ретровирусный геном, который должен быть упакован, может составлять от 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000 и 8000 нуклеотидов на нижнем конце диапазона и 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 и 11000 нуклеотидов на верхнем конце диапазона. Ретровирусный геном, который должен быть упакован, включает в себя одну или несколько полинуклеотидных областей, кодирующих первый и второй инженерный сигнальный полипептид, как подробно описано здесь. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный ретровирусный геном, который должен быть упакован, может составлять менее 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 или 11000 нуклеотидов. Функции, обсуждаемые здесь в другом разделе, которые могут быть упакованы, включают требуемые ретровирусные последовательности для ретровирусной сборки и упаковки, такие как ретровирусные области *rev*, *gag* и *pol*, а также 5'LTR и 3'LTR или их активный усеченный фрагмент, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент упаковки ретровирусной *cys*-действующей РНК, и элемент *cPPT* / *CTS*. Кроме того, в иллюстративных вариантах изобретения рекомбинантный вирус или ретровирус в этом случае могут включать в себя некоторые из них или более или все из следующих вариантов в обратной ориентации этих ретровирусных функциональных областей: одну или несколько полинуклеотидных областей, кодирующих первый и второй инженерный сигнальный полипептид, при по меньшей мере один из которых включает в себя лимфопролиферативный элемент и может дополнительно включать *ASTR*; второй модифицированный сигнальный полипептид, который может включать в себя химерный антиген-рецептор, элемент управления *in vivo*, такой как рибосомаха, который обычно регулирует экспрессию первого и/или второго инженерного сигнального полипептида; домен распознавания, интрон, промотор, который активен в клетке-мишени, такой как Т-клетка, сигнал расщепления 2A и/или *IRES*.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ РЕТРОИРУСЫ

Рекомбинантные ретровирусы описаны в способах и композициях, представленных здесь, например, для трансдукции Т-клеток и/или НК-клеток для получения генно-модифицированных Т-клеток и/или НК-клеток. Рекомбинантные ретровирусы сами по себе являются аспектами настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные ретровирусы являются некомпетентными репликациями, что означает, что ретровирус не может реплицироваться, как только он покидает упаковочную ячейку. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантными ретровирусами могут быть аденовирусы, адено-ассоциированные вирусы, герпесвирусы, цитомегаловирусы, поксвирусы, вирусы *avіroх*, вирусы гриппа, вирус везикулярного стоматита (*VSV*) или вирус *Sindbis*. Специалисту в данной области будет понятно, как модифицировать описанные здесь способы для использования с различными ретровирусами. Например, в некоторых вариантах осуществления *ВИЧ RRE* и полинуклеотидная область, кодирующая *HIV Rev*, могут быть заменены N-концевыми *RGG*-связывающими монетами *RNA* и полинуклеотидной областью, кодирующей *ICP27*. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная область, кодирующая *HIV Rev*, может быть заменена одной или несколькими полинуклеотидными областями, кодирующими аденовирус *E1 B 55-kDa* и *E4 Orf6*.

Соответственно, представленный здесь в некоторых вариантах осуществления представляет собой рекомбинантный ретровирус, который включает (i) элемент псевдотипирования, способный связываться с Т-клеткой и/или НК-клеткой и облегчая мембранное слияние рекомбинантного ретровируса с ним; (ii) полинуклеотид, имеющий одну или несколько единиц транскрипции, функционально связанных с промотором,

активным в Т-клетках и/или НК-клетках, причем одна или несколько транскрипционных единиц кодируют первый сконструированный сигнальный полипептид, имеющий химерный антиген-рецептор, который включает антигенспецифическую область нацеливания, трансмембранный домен и внутриклеточный активирующий домен, и
 5 второй сконструированный сигнальный полипептид, который включает в себя лимфопролиферативный элемент; где экспрессия первого сконструированного сигнального полипептида и/или второго инженерного сигнального полипептида регулируется элементом управления *in vivo*; и (iii) активационный элемент на его поверхности, причем активирующий элемент способен связываться с Т-клеткой и/или
 10 НК-клеткой и не кодируется полинуклеотидом в рекомбинантном ретровирусе. В некоторых вариантах осуществления активный в Т-клетках и/или НК-клетках не активен в линии упаковочных клеток. В любом из вариантов осуществления, раскрытых здесь, любой из первого и второго инженерных сигнальных полипептидов может иметь рецептор химерного антигена, а другой сконструированный сигнальный полипептид
 15 может иметь лимфопролиферативный элемент.

ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ Т-КЛЕТКИ И НК-КЛЕТКИ

В вариантах осуществления способов и композиций здесь производятся генетически модифицированные лимфоциты, которые сами по себе являются отдельным аспектом изобретения. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные
 20 лимфоциты представляют собой лимфоциты, такие как Т-клетки и/или НК-клетки, которые были генетически модифицированы, чтобы экспрессировать первый сконструированный сигнальный полипептид, содержащий лимфопролиферативный элемент и/или второй инженерный сигнальный полипептид, содержащий химерный антиген-рецептор, который включает специфическую для антигена область нацеливания
 25 (ASTR), трансмембранный домен и внутриклеточный активирующий домен.

В способах и композициях, раскрытых здесь, экспрессия одного или обоих инженерных сигнальных полипептидов обычно регулируется контрольным элементом *in vivo*, а в некоторых вариантах осуществления контрольный элемент *in vivo* представляет собой полинуклеотид, содержащий рибосвитч. В некоторых вариантах
 30 осуществления рибосвитч способен связывать аналог нуклеозида и, когда присутствует нуклеозидный аналог, экспрессируется один или оба инженерных сигнальных полипептида.

Генетически модифицированные лимфоциты, описанные здесь, могут также иметь полипептиды, экспрессируемые на их поверхности, такие как один или несколько
 35 полипептидов, которые функционируют как активирующий элемент, один или несколько полипептидов, которые функционируют как псевдотипирующий элемент, и/или один или несколько полипептидов слияния, которые включают цитокин. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные лимфоциты имеют активирующий элемент на их поверхности. Активационный элемент может иметь
 40 связанный с мембраной полипептид, способный связываться с CD3; и/или связанный с мембраной полипептид, способный связываться с CD28. В некоторых вариантах осуществления элемент активации представляет собой анти-CD3 scFvFc, слитый с гетерологичной последовательностью присоединения ГИФ-якоря и/или CD80, слитый с гетерологичной последовательностью присоединения ГИФ-якоря. В некоторых
 45 вариантах осуществления генетически модифицированные лимфоциты имеют на своей поверхности псевдотипирующий элемент. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные лимфоциты имеют слитый полипептид на их поверхности, где слитый полипептид представляет собой цитокин, ковалентно

присоединенный к DAF. В некоторых вариантах осуществления в качестве цитокина выступает IL-7 или IL-15. В некоторых вариантах осуществления в качестве цитокина выступает IL-7. В некоторых вариантах осуществления цитокин не имеет своей сигнальной последовательности. В иллюстративных вариантах осуществления цитокин вводится в DAF за его сигнальной последовательностью.

5 НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Настоящее раскрытие содержит кодирующие нуклеиновые кислоты полипептиды настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой ДНК, включая, например, рекомбинантный вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой РНК, например, синтезированную *in vitro* РНК.

В некоторых случаях нуклеиновая кислота обеспечивает получение полипептида настоящего изобретения, например, в клетке млекопитающего. В других случаях исследуемая нуклеиновая кислота обеспечивает амплификацию нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид настоящего изобретения.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид по настоящему изобретению, может быть функционально связана с контрольным элементом транскрипции, например промотором и энхансером, и т.д.

Подходящие промоторные и энхансерные элементы известны в данной области техники. Для экспрессии в бактериальной клетке подходящие промоторы включают, но не ограничиваются ими, *lacI*, *lacZ*, T3, T7, *gpt*, лямбда Р и *trc*. Для экспрессии в эукариотической клетке подходящие промоторы включают, но не ограничиваются ими, промотор гена легкой и/или тяжелой цепи иммуноглобулина и энхансер; немедленный ранний промотор цитомегаловируса; промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса; ранние и поздние промоторы SV40; промотор, присутствующий в длинных концевых повторах от ретровируса; промотор мышинной металлотионеин-1; и различные известные в данной области тканеспецифические промоторы.

Подходящие обратимые промоторы, включая обратимые индуцибельные промоторы, известны в данной области. Такие обратимые промоторы могут быть выделены и получены из многих организмов, например эукариот и прокариотов. Модификация обратимых промоторов, полученных из первого организма для использования во втором организме, например, первый прокариот, и второй эукариот, первый эукариот и второй прокариот и т.д., хорошо известна в данной области техники. Такие обратимые промоторы и системы, основанные на таких обратимых промоторах, но также включающие дополнительные контрольные белки, включают, но не ограничиваются ими, промоторы, регулируемые алкоголем (например, промотор гена алкогольдегидрогеназы I (*alcA*), промоторы, реагирующие на белки транскрибирующего спирта (*AlcR*) и т.д.), промоторы, регулируемые тетрациклином (например, промоторные системы, включая TetActivators, TetON, TetOFF и т.д.), промоторы, регулируемые стероидами (например, промоторные системы глюкокортикоидов крысы, системы промоторов рецептора эстрогена человека, системы промоторов ретиноидов, системы промоторов щитовидной железы, промоторные системы экдизона, промоторные системы мифепристона и т.д.), промоторы, регулируемые металлом (например, промоторные системы металлотионеина и т.д.), регулируемые по патогенезу промоторы (например, промоторы, регулируемые салициловой кислотой, промоторы, регулируемые этиленом, промоторы, регулируемые бензотиадиазолом, и т.д.), промоторы, регулируемые температурой (например, индуцируемые тепловым шоком промоторы (например, HSP-70, HSP-90, тепловой удар сои р робот и т.д.), промоторы с легким

регулированием, синтетические индуцибельные промоторы и тому подобное.

В некоторых случаях локус или конструкция или трансгенный ген, содержащий подходящий промотор, необратимо переключаются посредством индукции индуцируемой системы. Подходящие системы для индукции необратимого переключателя хорошо известны в данной области, например, индукция необратимого переключателя может использовать рекомбинацию, опосредованную Cre-lox (см., Например, Fuhrmann-Benzakein и др., PNAS (2000) 28: e99, раскрытие которой включено в настоящее описание посредством ссылки). Любая подходящая комбинация рекомбиназы, эндонуклеазы, лигазы, сайтов рекомбинации и т.д., Известная в данной области, может быть использована для создания необратимого переключаемого промотора. Способы, механизмы и требования для осуществления рекомбинации, специфичной для сайта, описанной в другом месте здесь, находят применение при создании необратимо коммутируемых промоторов и хорошо известны в данной области, см., например, Grindley и соавт. (2006) Annual Review of Biochemistry, 567-605 и работу Tropp (2012) Molecular Biology (Jones & Bartlett Publishers, Садбери, штат Массачусетс), описание которых дано в данном документе посредством ссылки.

В некоторых случаях промотор представляет собой специфический для CD8 промотор, специфичный для CD4 промотор, специфический для нейтрофила промотор или NK-специфический промотор. Например, можно использовать промотор гена CD4; см., например, Salmon и соавт. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7739; и Marodon и соавт. (2003) Blood 101:3416. В качестве другого примера может быть использован промотор гена CD8. Специфическая экспрессия NK-клеток может быть достигнута с помощью промотора Neri (p46); см., например, Eckelhart и соавт. (2011) Blood 117:1565.

В некоторых вариантах осуществления, например, для экспрессии в дрожжевой клетке подходящим промотором является конститутивный промотор, такой как промотор ADH1, промотор PGK1, промотор ENO, промотор PYK.1 и тому подобное; или регулируемый промотор, такой как промотор GALI, промотор GALIO, промотор ADH2, промотор PHO5, промотор CUP1, промотор GAL7, промотор MET25, промотор MET3, промотор CYC1, промотор HIS3, промотор ADHI, промотор PGK, промотор GAPDH, промотор ADC1, промотор TRP1, промотор URA3, промотор LEU2, промотор ENO, промотор TPI и AOX1 (например, для использования в *Pichia*). Выбор подходящего вектора и промотора находится на уровне обычного специалиста в данной области.

Подходящие промоторы для использования в прокариотических клетках-хозяевах включают, но не ограничиваются ими, промотор РНК-полимеразы бактериофага T7; промотор trp; промотор lac-оперона; гибридный промотор, например гибридный промотор lac / tac, гибридный промотор tac / trc, промотор trp / lac, промотор T7 / lac; промотор trc; промотор tac и тому подобное; промотор araBAD; промоторы, регулируемые *in vivo*, такие как промотор ssaG или связанный с ним промотор (см., например, публикацию US N 20040131637), промотор pagC (Pulkkinen and Miller, J. Bacterial, 1991: 173(1): 86-93; Alpuche-Aranda и соавт., PNAS, 1992; 89(21): 10079-83), промотор nirB (Harborne и соавт. (1992) Mol. Micro. 6:2805-2813) и тому подобное (см., например, Dunstan и соавт. (1999) Infect. Immun. 67:5133-5141; McKelvie и соавт. (2004) Vaccine 22:3243-3255; и Chatfield и соавт. (1992) Biotechnol. 888-892); промотор sigma70, например, консенсусный промотор sigma70 (см., например, Gencank Accession №. AX798980, AX798961 и AX798183); стабильный фазовый промотор, например, промотор dps, промотор sprv и тому подобное; промотор, полученный из островка патогенности SPI-2 (см., например, W096 / 17951); промотор actA (см., например, Shetron-Rama и соавт. (2002) Infect. Immun. 70:1087-1096); промотор rpsM (см., например, Valdivia and Falkow

(1996). *Mal. Microbial.* 22:367); tet-промотор (см., например, Hillen, W. and Wissmann, A. (1989) В работе Saenger, W. and Heinemann, U. (ред.), *Topics in Molecular and Structural Biology, Protein-Nucleic Acid Interaction*. Macmillan, Лондон, Великобритания, Том 10, стр. 143-162); SP6-промотор (см., например, Melton и соавт. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12: 7035); и т.п. Подходящие сильные промоторы для использования в прокариотах, таких как *Escherichia coli*, включают, но не ограничиваются ими, Trc, Tac, T5, T7 и Р-лямбда. Неограничивающие примеры операторов для использования в бактериальных клетках-хозяевах включают оператора промотора лактозы (LacI-репрессорный белок изменяет конформацию при взаимодействии с лактозой, тем самым предотвращая связывание белка-репрессора LacI с оператором), оператор промотора триптофана (при объединении с триптофаном, репрессорным белком TrpR имеет конформацию, которая связывает с оператором, а в отсутствие триптофана протеин-репрессор TrpR имеет конформацию, которая не связывается с оператором), и оператор-промотор tac (см., например, deBoer и соавт. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 80:21-25).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид раскрытия, может присутствовать в векторе экспрессии и/или клонирующем векторе. Нуклеотидные последовательности, кодирующие два отдельных полипептида, могут быть клонированы в одинаковых или отдельных векторах. Вектор экспрессии может включать в себя селективный маркер, источник репликации и другие функции, которые обеспечивают репликацию и/или поддержание вектора. Подходящие экспрессирующие векторы включают, например, плазмиды, вирусные векторы и тому подобное.

Специалистам в данной области известно большое количество подходящих векторов и промоторов; многие из них коммерчески доступны для создания рекомбинантных конструкций объекта. В качестве примера приводятся следующие бактериальные векторы: pBs, фагскрипт, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, La Jolla, CA, USA); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 и pRIT5 (Pharmacia, Уппсала, Швеция). В качестве примера приводятся следующие эукариотические векторы: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG и pSVL (Pharmacia).

Экспрессирующие векторы обычно имеют удобные сайты рестрикции, расположенные вблизи промоторной последовательности, для обеспечения введения последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих гетерологичные белки. Может присутствовать селективный маркер, действующий в узле выражения. Подходящие экспрессирующие векторы включают, но не ограничиваются ими, вирусные векторы (например, вирусные векторы на основе вируса осповакцины, полиовирус, аденовирус (см., Например, Li et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 2543 2549, 1994; Borrás et al., *Gene Ther* 6: 515 524, 1999, Li и Davidson, *PNAS* 92: 7700 7704, 1995, Sakamoto et al., *Hum Gene Ther* 5: 1088 1097, 1999, WO 94/12649, WO 93/03769, WO 93 / 19191, WO 94/28938, WO 95/11984 и WO 95/00655), адено-ассоциированный вирус (см., например, АН и соавт., *Hum Gene Ther* 9:81 86, 1998, Flarmery и соавт., *PNAS* 94: 6916 6921, 1997; Bennett и соавт., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 2857 2863, 1997; Jomary и соавт., *Gene Ther* 4: 683 690, 1997, Rolling и соавт., *Hum Gene Ther* 10: 641 648, 1999; Ali и соавт., *Hum Mol Genet* 5: 591 594, 1996; Srivastava в WO 93/09239, Samulski и соавт., *J. Vir.* (1989) 63:3822-3828; Mendelson и соавт., *Virol.* (1988) 166:154-165; и Flotte и соавт., *PNAS* (1993) 90: 10613-10617); SV40; Вирус простого герпеса; гамма-ретровирус; вируса иммунодефицита человека (см., например, Miyoshi et al., *PNAS* 94: 10319 23, 1997; Takahashi et al., *J Virol* 73:7812 7816, 1999); ретровирусный вектор (например, вирус лейкемии, вирус некроза селезенки и векторы, полученные из ретровирусов, таких как вирус Саркомы Руса, вирус саркомы Harvey,

вирус птичьего лейкоза, вирус иммунодефицита человека, вирус миелопролиферативной саркомы и вирус опухоли молочной железы); и тому подобное.

Как отмечено выше, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид настоящего изобретения, в некоторых вариантах осуществления будет представлять собой РНК, например, синтезированную *in vitro* РНК. Способы синтеза *in vitro* РНК известны в данной области техники; любой известный способ может быть использован для синтеза РНК, включая нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид по настоящему изобретению. Способы введения РНК в клетку-хозяин известны в данной области техники. См., например, Zhao и соавт. (2010) Cancer Res. 15:9053. Введение РНК, включающей нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид по настоящему изобретению в клетку-хозяин, может быть проведено *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Например, клетка-хозяин (например, НК-клетка, цитотоксический Т-лимфоцит и т.д.) может быть электропорирована *in vitro* или *ex vivo* с РНК, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид по настоящему изобретению.

КЛЕТКИ

В настоящем изобретении представлены линии клеток млекопитающих, которые продуцируют рекомбинантные ретровирусы, которые генетически модифицируют клетки-мишени млекопитающих и клетки-мишени в целом.

Подходящие клетки млекопитающих включают первичные клетки и immortalized клеточные линии. Подходящие клеточные линии млекопитающих включают клеточные линии человека, линии клеток приматов человека, клеточные линии грызунов (например, мышь, крыса) и тому подобное. Подходящие клеточные линии млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, клетки HeLa (например, Американская коллекция клеточных культур (ATCC) №CCL-2), клетки CHO (например, ATCC №CRL9618, CCL61, CRL9096), 293 клетки (например, ATCC №CRL-1573), клетки Vero, клетки NIH 3T3 (например, ATCC №CRL-1658), клетки Huh-7, ВНК-клетки (например, ATCC №CCL10), клетки PC12 (ATCC №CRL1721), Клетки COS, клетки COS-7 (ATCC №CRL1651), клетки RAT1, мышинные L-клетки (ATCC №CCL1.3), клетки эмбриональной почки человека (HEK) человека (ATCC №CRL1573), клетки HLNepG2, Hut-78, Jurkat, HL-60, НК-клеточные линии (например, NKL, NK92 и YTS) и тому подобное.

В некоторых случаях клетка не является immortalized клеточной линией, а представляет собой клетку (например, первичную клетку), полученную от человека или клетки *ex vivo*. Например, в некоторых случаях клетка является иммунной клеткой, полученной от человека. В качестве другого примера, клетка представляет собой стволовую клетку или клетку-предшественник, полученную от человека.

СПОСОБЫ АКТИВАЦИИ ИММУННОЙ КЛЕТКИ

Настоящее изобретение относится к способам активации иммунной клетки *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*. Способы обычно включают взаимодействие иммунной клетки (*in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*) с одним или несколькими антигенами-мишенями, где иммунная клетка генетически модифицирована, чтобы получить ограниченное микроокружением CAR по данному изобретению. В присутствии одного или нескольких целевых антигенов ограниченная микроокружением АВ активирует иммунную клетку, тем самым создавая активированную иммунную клетку. Иммунные клетки включают, например, цитотоксический Т-лимфоцит, НК-клетку, CD4⁺ Т-клетку, Т-регуляторную (Treg) клетку, γδ Т-клетку, НК-Т-клетку, нейтрофилы и т.д.

Взаимодействие с генетически модифицированной иммунной клеткой (например, Т-

лимфоцитом, NK-клеткой) с одним или несколькими антигенами-мишенями может увеличить продуцирование цитокина иммунной клеткой по меньшей мере на 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20% %, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 2,5 раза, по меньшей мере около 5 по меньшей мере примерно в 10 раз или более чем в 10 раз по сравнению с количеством цитокина, продуцируемого иммунной клеткой, в отсутствие одного или более целевых антигенов. Цитокины, продуцирование которых может быть увеличено, включают, но не ограничиваются ими, IL-2 и IFN- γ .

Взаимодействие с генетически модифицированной цитотоксической клеткой (например, цитотоксическим Т-лимфоцитом) с ААР может увеличить цитотоксическую активность цитотоксической клетки, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 2,5 раза, по меньшей мере примерно в 5 раз, по меньшей мере примерно в 10 раз, или более чем в 10 раз, по сравнению с цитотоксической активностью цитотоксической клетки в отсутствие одного или более целевых антигенов.

Взаимодействие с генетически модифицированной цитотоксической клеткой (например, цитотоксическим Т-лимфоцитом) с одним или несколькими целевыми антигенами может увеличить цитотоксическую активность цитотоксической клетки, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 2,5 раза, по меньшей мере примерно в 5 раз, по меньшей мере примерно в 10 раз или более чем в 10 раз по сравнению с цитотоксической активностью цитотоксической клетки в отсутствие одного или более целевых антигенов.

В других вариантах осуществления, например, в зависимости от иммунной клетки хозяина, взаимодействие генетически модифицированной клетки-хозяина с антигеном может увеличивать или уменьшать клеточную пролиферацию, выживаемость клеток, гибель клеток и тому подобное.

СПОСОБ ОБРАЗОВАНИЯ ОГРАНИЧЕННОЙ АНТИГЕНСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ОБЛАСТИ НАЦЕЛИВАНИЯ НА МИКРООКРУЖЕНИЕ

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие домены (также называемые здесь «антигенспецифическими областями для нацеливания» или «ASTR») CAR конститутивно связывают их родственные антигены. В других вариантах осуществления ASTR могут быть ограничены микроокружением, предпочтительно или только связыванием их родственного антигена в определенных аберрантных условиях, таких как те, которые существуют в микроокружении опухоли, как это более подробно описано в данном изобретении. Ограниченные микроокружением ASTR, связывающиеся преимущественно или исключительно в аберрантных условиях микроокружения опухоли, могут обеспечить снижение побочных эффектов опухоли, поскольку связывание с антигеном в нормальных физиологических условиях в некоторых ситуациях снижается до уровней ниже обнаружения с помощью иммунологических анализов. В некоторых аспектах предоставленные здесь CAR включают ограниченную микроокружением ASTR, которая специфически связывается с целевым белком, при этом ASTR представляет собой scFv-фрагмент, который включает переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи.

Некоторые иллюстративные варианты раскрытых здесь аспектов, например способы, клетки, линии клеток, ретровирусы, полинуклеотиды или векторы, описанные в настоящем изобретении, содержат CAR, которые включают области, подверженные воздействию микроокружения, специфичные для антигена.

Соответственно, в одном аспекте, представленном в настоящем документе, присутствует химерный антигенный рецептор для связывания антигена клетки-мишени, содержащий:

а) ограниченную антигенспецифическую область нацеливания с микроокружением, которая демонстрирует увеличение связывания с антигеном клетки-мишени в аберрантном состоянии по сравнению с нормальной физиологической средой, в которой антигенспецифическая область нацеливания связывается с клеткой-мишенью;

б) трансмембранный домен; и

с) внутриклеточный активирующий домен.

В другом аспекте, представленном в настоящем документе, присутствует химерный антигенный рецептор для связывания антигена клетки-мишени, содержащий:

а) по меньшей мере одну ограниченную антигенспецифическую область нацеливания с микроокружением, выбранную путем пэннинга библиотеки полипептидов и обладающую увеличенной активностью в ходе анализа на связывание антигена клетки-мишени в аберрантном состоянии по сравнению с нормальным физиологическим состоянием;

б) трансмембранный домен; и

с) внутриклеточный активирующий домен.

В некоторых вариантах осуществления любого раскрытого здесь аспекта любой из химерных антигенных рецепторов может быть ограничен микроокружением, так что они проявляют увеличение активности связывания в аберрантном состоянии по сравнению с нормальным физиологическим состоянием. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления любого раскрытого здесь аспекта ограниченная микроокружением ASTR определяется по данным из исходной библиотеки полипептидов без учета библиотеки мутирующих/оболочечных элементов до скрининга/эволюции и/или без мутирования во время или между необязательными повторными раундами скрининга. Иллюстративные трансмембранные домены и внутриклеточные активирующие домены могут быть любыми из описанных здесь доменов для CAR.

В другом аспекте, представленный в настоящем документе способ представляет собой способ выборки ограниченной ASTR с микроокружением, включающий пэннинг библиотеки идентификации полипептидов посредством:

а. проведения анализа полипептидов из библиотеки идентификации полипептидов на связывание антигена клетки-мишени в нормальном физиологическом состоянии и анализу на связывание антигена клетки-мишени в аберрантном состоянии; и

б. выбора полипептида, проявляющего увеличение активности связывания антигена клетки-мишени в аберрантном состоянии по сравнению с физиологическим состоянием, тем самым выбирая ограниченную антигенспецифическую область нацеливания на микроокружение.

В другом аспекте, представленный в настоящем документе способ представляет собой способ выделения ограниченной ASTR на микроокружение, включающий пэннинг библиотеки полипептидов посредством:

взаимодействия библиотеки полипептидов в аберрантных условиях с целевым антигеном, связанным с твердым носителем, при этом клоны, экспрессирующие полипептиды, связывающие антиген клетки-мишени, остаются связанными с твердым

носителем через антиген клетки-мишени;

инкубирования твердых носителей со связанными полипептидами в физиологических условиях; и

сбора клонов, которые элюируются из твердого носителя в физиологических условиях, тем самым выделяя ограниченную антигенспецифическую область нацеливания на микроокружение.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления любого раскрытого здесь аспекта ограниченная микроокружением антигенспецифическая область определяется по данным скрининга исходной библиотеки полипептидов без учета мутирующих/оболочечных элементов до скрининга и/или без мутирования/оболочечивания во время или между необязательными повторными раундами скрининга или пэннинга.

Нормальные физиологические условия могут включать температуры, pH, осмотическое давление, осмоляльность, окислительный стресс и концентрацию электролита, которые будут рассматриваться в нормальном диапазоне в месте введения, или в ткани, или органе в месте действия, до предмета. Аберрантным условием является то, что отклоняется от обычно приемлемого диапазона для этого условия. В одном аспекте ограниченная антигенспецифическая область нацеливания с микроокружением (то есть полипептид) практически неактивна в нормальных условиях, но активна при других условиях, чем нормальные, на уровне, который равен или лучше, чем при нормальных условиях. Например, в одном аспекте ограниченная антигенспецифическая целевая область микроокружения практически неактивна при температуре тела, но активна при более низких температурах. В другом аспекте ограниченная антигенспецифическая целевая область микроокружения обратимо или необратимо инактивируется при нормальных условиях. В еще одном аспекте ограниченная антигенспецифическая область нацеливания на микроокружение является терапевтическим белком. В другом аспекте ограниченная антигенспецифическая область нацеливания на микроокружение используется в качестве лекарственного средства или терапевтического агента. В еще одном аспекте ограниченная антигенспецифическая область нацеливания с микроокружением более или менее активна в высокоокисленной крови, такой как, например, после прохождения через легкие или в средах с более низким pH, обнаруженных в почках.

В некоторых вариантах осуществления проводится один раунд отбора, чтобы получить ограниченную антигенспецифическую область нацеливания с микроокружением. В некоторых вариантах осуществления способ скрининга или панорамирования повторяют после идентификации свободных полипептидов, которые связывают антиген в аберрантных условиях и не связываются в физиологических условиях, или клетки, экспрессирующие тестируемый полипептид, который обладает этими свойствами, или фаг, покрытый тестируемым полипептидом, который имеет такие свойства в начальном или предыдущем раунде. В некоторых методах фаг, который собирается, используется для заражения клеток, которые также могут быть инфицированы вспомогательным фагом, чтобы усилить собранный фаг. В других методах, где тестируются полипептиды на поверхности клеток, собранные клетки можно выращивать для «амплификации» полипептидов, экспрессируемых клетками, путем амплификации полинуклеотидов в клетках, которые кодируют полипептиды. В некоторых вариантах осуществления амплификацию проводят путем выращивания клеток, которые экспрессируют идентифицированные полипептиды, не выполняя процесс мутации полинуклеотидов, кодирующих идентифицированные полипептиды между раундами. Таким образом, полипептиды, которые были собраны в предыдущем

раунде, обогащены амплифицирующими клетками, которые содержат полинуклеотиды, кодирующие эти собранные полипептиды.

Метод панорамирования или скрининга может выполняться один раз или повторяться от 1 до 1000 раз. В иллюстративных вариантах осуществления панорамирование повторяется от 1 до 20 раз или от 2 до 10 раз или от 2 до 5 раз.

В других методах ограниченные микроокружениями ASTR против представляющего интерес антигена (то есть целевого антигена) выполняются с использованием одного или нескольких раундов мутации/эволюции между раундами панорамирования. В одном способе белок дикого типа идентифицируют, например, путем создания библиотеки полипептидов или белков и скрининга полипептидной или белковой библиотеки для полипептида или белка с желаемой аффинностью связывания с целевым антигеном. В некоторых вариантах осуществления, где белки дикого типа представляют собой антитела, антитела дикого типа могут быть обнаружены путем генерирования и скрининга библиотек поликлональных или моноклональных антител, включая библиотеки идентификации антител к фаговым, например, библиотеки антител фагового генотипа антител.

Развитые ASTR могут быть получены путем воздействия белка дикого типа или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок дикого типа, на процесс мутагенеза с целью получения популяции мутантных полипептидов, которая может быть подвергнута скринингу для идентификации мутантного ASTR с повышенной активностью (например, усиленной аффинностью связывания с целевым антигеном) в среде опухоли и/или в условиях суррогатного анализа опухоли *in vitro* по сравнению с нормальной физиологической средой. Примеры таких способов приведены в WO 2016033331 («КОНДИЦИОНАЛЬНО АКТИВНЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ДЛЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ Т-КЛЕТОК») или в патенте США №8709755, оба включены в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте. Этот способ получения ограниченного микроокружениями антитела настоящим включен в настоящее описание посредством ссылки во всей его полноте.

В других вариантах осуществления микроокружения, ограниченные антигенспецифическими полипептидами (т.е. нацеливающие области, например антитела), можно идентифицировать путем скрининга исходной библиотеки полипептидов в аберрантных и физиологических условиях и идентификации тестового полипептида из исходной библиотеки полипептидов, которая связывается преимущественно или исключительно под аберрантным против физиологических условий. В некоторых примерах идентифицированные и выделенные микроокружения ограничивают антигенспецифические полипептиды (то есть нацеливающие области, например антитела), идентифицированные из исходной полипептидной библиотеки на начальном экране библиотеки полипептидов, связывают их родственный антиген преимущественно или исключительно под аберрантными или физиологическими условиями. В таких случаях не проводятся раунды мутаций/эволюции. Соответственно, способ в иллюстративных вариантах осуществления выполняется без мутирования полинуклеотидов, кодирующих изолированную область микроинъекции, ограниченную антигенспецифическим участком нацеливания, между раундами скрининга (например, раундами панорамирования) или выполнялся только для одного анализа связывания в аберрантных и физиологических условиях для выделения и идентификации микроокружения ограничивает антигенспецифический полипептид (т.е. направленную область, например антитело). Способ может быть осуществлен путем культивирования, амплификации с высокой точностью и/или разбавляющих полинуклеотидов, кодирующих

специфические для антигена участки нацеливания, или организмы-хозяева, в том числе, между раундами скрининга и/или панорамирования без каких-либо мутаций/эволюции. Кроме того, способ может быть выполнен без повторения скрининга и/или панорамирования и может быть выполнен без мутации/эволюции полинуклеотида, кодирующего изолированную область микроокружения, ограниченную антигенспецифическим целевым областью, после того, как микроокружение ограничивает антигенспецифический полипептид (т.е. область мишени, например антитело).

Анализы для использования в способах, представленных здесь для обнаружения связывания полипептида с родственным связывающим партнером, включают в себя анализы на основе клеток и, в частности, анализы, выполненные с использованием систем отображения поверхности клеток, таких как системы отображения поверхности клеток млекопитающих. В иллюстративном способе нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид или библиотеку вариантов полипептидов, включая библиотеку модифицированных полипептидов, могут быть введены в вектор, подходящий для экспрессии в клетках, такой как клетки млекопитающих. Затем клетки трансфицируют вектором, и полипептид(ы) экспрессируется клетками. Библиотека клеток, содержащих поверхностно-выраженные полипептиды, может взаимодействовать с раствором, содержащим растворимый или связанный с поверхностью связующий партнер.

Активность связывания может быть обнаружена с использованием любого анализа, который может обнаруживать связывание с поверхностью клеток. Активность также может быть оценена путем оценки функциональной активности полипептида или полипептида. Любой клеточный анализ, известный специалисту в данной области, предназначен для использования в предложенных здесь способах, включая анализы клеточной пролиферации, анализы клеточной гибели, проточную цитометрию, методы разделения клеток, сортировку активированных флуоресценции клеток (FACS), фазовую микроскопию, флуоресцентную микроскопию, рецептор анализы связывания, анализы клеточной передачи, анализы иммуноцитохимии и репортерного гена. В некоторых примерах анализы анализируют с помощью флуоресцентной активации клеток (FACS).

Полипептиды или белки могут быть экспрессированы клетками млекопитающих в виде секретируемых, растворимых молекул, молекул клеточной поверхности или внутриклеточных антител. В иллюстративном способе клетки могут быть трансфицированы библиотекой белков в условиях, при которых большинство или все клетки отображают член библиотеки белка, закрепленный на поверхности клетки.

Необязательно, можно использовать систему экспрессии, в которой большинство трансфектантов клеток млекопитающих имеют только одну плазмиду, интегрированную в свой геном. Поэтому большинство (то есть, по меньшей мере, около 70% или около 80% или около 90%) трансфектантов экспрессируют одну или несколько молекул одного полипептида. Это можно проверить, например, путем выделения и культивирования отдельных трансфектантов; и усиление и секвенирование выраженных последовательностей, чтобы определить, имеют ли они одну последовательность.

В некоторых примерах способов, представленных здесь, полипептиды представляют собой антитела, отображаемые на поверхности клеток млекопитающих. Любое антитело, описанное здесь, может быть экспрессировано на поверхности клеток млекопитающих, включая полноразмерные двухвалентные функциональные антитела, такие как антитела IgG. Антитело может представлять собой фрагмент, например фрагменты Fab или scFv-фрагменты. Антитела могут включать область Fc, такую как scFv-Fc или полноразмерное антитело, которое содержит две тяжелые и две легкие цепи. Специалист в данной области

может выбрать подходящий фрагмент антитела. Например, ScFv-Fcs и полноразмерные антитела, полученные в клетках млекопитающих, могут иметь несколько преимуществ перед фрагментами scFv или Fab.

5 Твердые носители, которые могут быть использованы в анализах связывания, представленных здесь, включают любой носитель, который способен прикрепляться с партнером по связыванию полипептида, такого как лиганд, рецептор или антиген. Как правило, для обеспечения высокопроизводительного скрининга родственный связывающий партнер прикрепляется к твердой подложке. Примеры носителей для использования в качестве твердых носителей в предлагаемых способах включают, но
10 не ограничиваются ими, стекло, полистирол, полипропилен, полиэтилен, декстран, нейлон, амилозы, природные и модифицированные целлюлозы, полиакриламида, агарозы и магнитные твердые носители, такие как твердые подложки, которые включают магнетит. Твердая подложка может представлять собой один или несколько шариков или частиц, микросфер, поверхность трубки или пластины, фильтрующую мембрану и
15 другие твердые подложки, известные в данной области техники. Примеры твердых систем поддержки включают, но не ограничиваются ими, плоскую поверхность, выполненную, например, из стекла, кремния, металла, нейлона, целлюлозы, пластика или композита, включая многослойные пластины или мембраны; или может быть в виде шарика, такого как силикагель, контролируемое пористое стекло, магнитный или
20 целлюлозный гранулы. В некоторых вариантах осуществления ограниченный антигенспецифический полипептид (т.е. область мишени, например антитело), ограниченный микроокружением (т.е. область мишени, например антитело), идентифицируют и выделяют путем биопэннинга отображения фагов или отображения поверхности дрожжей (Colby et al., «Сопrotивление спроектированного антитела на
25 поверхности дрожжей», Meth. Энзим. 388, 26 (2004)) с антителом (например, гуманизированным антителом) с иммобилизованным целевым антигеном. Например, либо наивная гуманизированная библиотека антител, либо библиотека синтетической гуманизированной антитела может быть подвергнута пэннингу с использованием методов отображения фагов или способов отображения поверхности дрожжей. В
30 некоторых вариантах осуществления начальный процесс отображения фагов фаговые клоны могут быть перенесены на вектор млекопитающих и использованы для скрининга поверхности клеток млекопитающих (см., Например, Yoon et al., BMC Biotechnology 12: 62; 1472-6750 (2012)). Примерный способ осуществления отображения фага для выделения ограниченного антигенспецифического целевого региона с микроокружением
35 представлен в примере 2.

Ограниченный микроокружением ASTR, определенный с использованием способов, представленных здесь, может быть антителом, антигеном, лигандом, рецептор-связывающим доменом лиганда, рецептором, лиганд-связывающим доменом рецептора или аффинностью. В вариантах осуществления, где ограниченный микроокружением
40 ASTR является антителом, он может представлять собой полноразмерное антитело, одноцепочечное антитело, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, фрагмент (Fab')₂-фрагмент, Fv-фрагмент и двухвалентное одноцепочечное антитело или диатело. В некоторых вариантах осуществления ограниченный микроокружением ASTR представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент. Такой одноцепочечный переменный
45 фрагмент может иметь тяжелые и легкие цепи, разделенные линкером, где линкер имеет длину от 6 до 100 аминокислот. В некоторых вариантах тяжелая цепь позиционируется N-концевой к легкой цепи на рецепторе химерного антигена. В других вариантах осуществления легкая цепь позиционируется N-образной к тяжелой цепи. Ограниченный

микроокружением ASTR может быть биспецифическим ASTR.

Ограниченные микроокружением ASTR, идентифицированные с использованием способов, представленных здесь, обычно представляют собой полипептиды и более конкретно полипептидные антитела, а в иллюстративных вариантах - одноцепочечные антитела. Эти полипептиды могут связываться с их родственными антигенами с более высоким или низким сродством в условиях аберрантов по сравнению с нормальными условиями, но в иллюстративных вариантах осуществления связывают с более высоким сродством в аберрантных условиях, чем нормальные. В некоторых вариантах осуществления эти полипептиды могут связываться с их родственным антигеном с 10%, 20%, 25%, 50%, 75%, 90%, 95% или 99% большей аффинностью в аберрантных условиях, чем физиологические (то есть нормальные) состояния. В некоторых вариантах осуществления ASTR, идентифицирующие применяемые здесь способы, не связываются с их родственными антигенами в нормальных физиологических условиях до любого обнаруживаемого уровня выше фоновых уровней, полученных с использованием отрицательных контролей, таких как антитела с отрицательным контролем.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая ограниченный микроокружением ASTR, выделенный по способу, представленному здесь, может быть определена путем секвенирования нуклеотидов собранной клетки, экспрессирующей ограниченный антигенспецифический нацеливание на микроокружение. Затем эту информацию о нуклеотидной последовательности можно использовать для создания биологического химерного антигенного рецептора (MRB-CAR) с микроокружением, создавая полинуклеотид, который кодирует полипептид, содержащий ограниченную микроокружением область антигенспецифического нацеливания, трансмембранный домен и внутриклеточный активирующий домен. Ограниченные антигенспецифические области нацеливания с микроокружением могут быть клонированы в систему экспрессии CAR, которая может быть использована для генерации рекомбинантных лентивирусов, которые включают CAR в их геноме, а затем рекомбинантные лентивирусы могут быть использованы для трансляции Т-клеток для тестирования CAR-опосредованного опухолевого антигена, экспрессирующего клеточное уничтожение мишени в опухолеселективной среде по сравнению с физиологическими состояниями.

УСЛОВИЯ ДЛЯ УСЛОВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

В предлагаемых здесь способах активность одного или нескольких полипептидов, таких как, например, одноцепочечные антитела, подвергается скринингу или тестированию в двух разных наборах условий, которые имитируют состояние или условия в двух разных физиологических средах, таких как, например, болезненного микроокружения и нормального физиологического состояния нехарактерного микроокружения. Обычно условия представляют собой условия, которые могут быть смоделированы или воспроизведены *in vitro*. Набор условий может включать одно или несколько условий для имитации микроокружения, связанного с заболеванием. Болезнь может изменить внутриклеточный и внеклеточный гомеостаз. Например, большое микроокружение может имитировать одно или несколько состояний в микроокружении опухоли или микроокружении рака. Как правило, разница или различия в активности в двух наборах условий могут приводить к условной активности молекулы. Таким образом, молекула, которая проявляет большую активность при первом наборе условий (например, имитирующие условия в микроокружении опухоли) по сравнению со вторым набором условий (например, имитируя условия в нормальной или нехарактерной среде), идентифицируется как молекула-кандидат, которая ограничена микроокружением.

Два набора условий могут быть выбраны для изменения одного или нескольких

параметров, которые различаются в двух физиологических средах, например, описанных здесь или известных специалисту в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, химические условия, биологические условия или физические условия. Параметры, которые могут изменяться между двумя наборами условий, могут включать одно или несколько условий, выбранных из давления, температуры, pH, ионной силы, осмотического давления, осмоляльности, окислительного стресса, мутности, воздействия света (в том числе ультрафиолетового, инфракрасного или видимого света), концентрация одного или нескольких растворенных веществ, таких как электролиты, концентрация глюкозы, концентрация гиалуронана, концентрация молочной кислоты или лактата, концентрация альбумина, уровни аденозина, уровни R-2-гидроксиглутарата, концентрация пирувата, концентрация кислород и/или присутствие окислителей, восстановителей или сопутствующих факторов. Путем изменения электролитной и буферной систем в калибровочных растворах физиологические условия, такие как pH, буферная емкость, ионная среда, температура, концентрация глюкозы и ионная сила, могут быть скорректированы с учетом физиологических условий, которые должны быть имитированы. Набор условий, которые имитируют нормальную физиологическую среду, можно выбрать так, чтобы отличаться от набора условий, которые имитируют болезненное микроокружение, такое как микроокружение опухоли, одним или несколькими описанными здесь условиями.

Например, как обсуждается ниже, различные параметры микроокружения опухоли отличаются по сравнению с неопухолевым микроокружением, включая, но не ограничиваясь ими, концентрацию кислорода, давление, наличие кофакторов, pH, концентрацию гиалуронана, концентрацию лактата, концентрацию альбумина, уровни аденозина, уровни R-2-гидроксиглутарата и концентрация пирувата. Любой из этих параметров может быть повторен *in vitro* для моделирования одного или нескольких состояний, существующих в опухолевой или раковой среде, по сравнению с условиями, которые существуют в неопухолевой или нормальной среде. Нормальные физиологические условия, которые могут быть смоделированы, включают среды, обнаруженные в здоровой или незанятой ткани, в любом месте тела, таком как желудочный трактат, кожу, сосудистая сеть, кровь и внеклеточный матрикс. Как правило, в анализах здесь физиологические условия могут быть смоделированы *in vitro* посредством выбора буфера, который используется для оценки активности белка. Например, любое одно или несколько состояний болезненного микроокружения (например, микроокружение опухоли) и нехарактерная среда могут быть смоделированы различиями в буфере анализа, используемом для оценки активности в анализе. Следовательно, в способах здесь для идентификации полипептида, ограниченного микроокружением, компонент или компоненты или характеристика или характеристики буфера для анализа изменяются или становятся разными в первом анализе для проверки активности в первом состоянии и во втором анализе для испытания активности при втором условии. Например, как обсуждалось здесь, различные параметры микроокружения опухоли различны по сравнению с неопухолевой средой, включая, но не ограничиваясь ими, кислород, давление, наличие кофакторов, pH, концентрацию гиалуронана (таких как увеличение или уменьшение гиалуронана концентрация концентрации лактата (например, повышенная или пониженная концентрация лактата), концентрация альбумина (например, повышенная или уменьшенная концентрация альбумина), уровни аденозина (такие как повышенный или пониженный уровень аденозина), уровни R-2-гидроксиглутарата (такие как увеличение или уменьшение уровней R-2-гидроксиглутарата) и концентрации пирувата (включая увеличение или

уменьшение концентрации пирувата). Более конкретно, условия в микроокружении опухоли могут включать более низкий pH, более высокие концентрации гиалуронана, более высокие концентрации лактата и пирувата, более высокие концентрации альбумина, повышенные уровни аденозина, повышенные уровни R-2-гидроксиглутарата, гипоксию, более низкую концентрацию глюкозы, и немного более высокая температура по сравнению с неопухолевым микроокружением. Например, ограниченное микроокружением ASTR практически неактивен при нормальной температуре тела, но активен при более высокой температуре в микроокружении опухоли. В еще одном аспекте ограниченное микроокружением антитело менее активно в нормальной кислородсодержащей крови, но более активно в менее насыщенной кислородом среде, которая существует в опухоли. В еще одном аспекте ограниченное микроокружением антитело менее активно при нормальном физиологическом pH 7,2-7,8, но более активно при кислом pH 5,8-7,0 или 6,0-6,8, которое существует в микроокружении опухоли. Например, ограниченное микроокружением антитело более активно при pH 6,7, чем при pH 7,4. Существуют и другие условия в микроокружении опухоли, известные специалисту в данной области, который также может быть использован в качестве условия в настоящем изобретении, при котором условно активные ASTR имеют различные аффинности связывания. Условия анализа *in vitro*, которые имитируют такие *in vivo* условия опухоли, упоминаются здесь как условия суррогатного анализа опухоли *in vitro*.

Любое одно или несколько из этих условий могут быть смоделированы *in vitro* посредством выбора конкретного буфера для анализа. Состав буфера для анализа, который имитирует пораженную микроокружение, можно выбрать так, чтобы он был идентичен составу буфера для анализа, который имитирует нормальную среду, за исключением одного или нескольких состояний, известных или описанных здесь, которые изменяются в пораженном микроокружении. Кроме того, при скрининге или идентификации активности одного или нескольких полипептидов в двух разных наборах условий, как правило, единственные условия, которые варьируются в анализе, относятся к буферным условиям, имитирующим микроокружение *in vivo*. Другие условия анализа, такие как время, температура и условия инкубации, могут быть одинаковыми для обоих наборов условий. Как правило, один и тот же базовый буфер используется в совокупности условий, которые имитируют болезненную микроокружение и условия, которые имитируют нормальное микроокружение, но конструкция буферной композиции может быть разной в одном или нескольких параметрах, таких как pH, кислород, давление, наличие кофакторов, pH, концентрация гиалуронана (например, повышенная или пониженная концентрация гиалуронана), концентрация лактата (например, повышенная или пониженная концентрация лактата), концентрация альбумина (такая как повышенная или пониженная концентрация гиалуронана) и/или концентрация пирувата (включая увеличение или уменьшение концентрации пирувата). В условиях, которые имитируют заболевание микроокружения и условия, которые имитируют нормальное микроокружение, любой базовый буфер, известный специалисту в данной области, который может быть использован.

СПОСОБЫ ГЕНЕРИРОВАНИЯ ОГРАНИЧЕННОЙ КЛЕТКИ МИКРОСРЕДЫ

Настоящее изобретение описывает способ генерирования ограниченной микроокружением клетки. Этот способ обычно включает генетическую модификацию клетки млекопитающего экспрессирующим вектором (например, плазмидой или ретровирусом) или РНК (например, транскрибируемую *in vitro* РНК), включая нуклеотидные последовательности, кодирующие ограниченные микроокружениями

CAR по настоящему изобретению. Генетически модифицированная клетка представляет собой микроокружение, ограниченное в присутствии одного или нескольких целевых антигенов. Генетическая модификация может быть выполнена *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*. Клетка может быть иммунной клеткой (например, Т-лимфоцитом, Т-хелперной клеткой или НК-клеткой), стволовыми клетками, клеткой-предшественником и т.д.

В некоторых случаях генетическая модификация выполняется *ex vivo*. Например, Т-лимфоцит, стволовая клетка, Т-хелперная клетка или НК-клетка получают от индивидуума; и клетка, полученная от индивидуума, генетически модифицирована, чтобы выразить CAR настоящего изобретения. Генетически модифицированная клетка представляет собой микроокружение, ограниченное наличием одного или нескольких целевых антигенов. В некоторых случаях генетически модифицированная клетка активируется *ex vivo*. В других случаях генетически модифицированная клетка вводится человеку (например, человеку, у которого была получена клетка); а генетически модифицированная клетка активируется *in vivo*. Например, когда один или несколько целевых антигенов присутствуют на поверхности клетки у индивидуума, нет необходимости вводить антиген. Генетически модифицированная клетка взаимодействует с антигеном, присутствующим на поверхности клетки у индивидуума, и активируется генетически модифицированная клетка. Например, когда генетически модифицированная клетка представляет собой Т-лимфоцит, генетически модифицированная клетка может проявлять цитотоксичность по отношению к клетке, которая экспрессирует один или более целевых антигенов на своей поверхности, к которым привязывается CAR.

СПОСОБЫ ПЕРЕХОДНОГО СОКРАЩЕНИЯ ОПУХОЛЕВОЙ МИКРОЭНЕРГЕТИКИ ЦЕЛЕВОГО СВЯЗЫВАНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО К CAR-T

Приведенный здесь способ является способом временного уменьшения связывающего мишень CAR-T опухолевого микроокружения с помощью фармакологической модификации сосудистого и тканевого pH. Микрофотографически контролируемые scFvs в CAR-T-клетках обеспечивают дополнительный уровень защиты от токсичности опухоли мишени, требуя местных условий окружающей среды опухоли, чтобы активировать Т-клетки. Несмотря на привлекательность некоторых методов лечения моноклональными антителами, приемная клеточная терапия может создавать локальные среды, которые временно разрешают их цели CAR-T. Например, CAR-T-клетки, активированные в местных тканях, могут дополнительно снизить локальный pH в зависимости от цитоплазматических доменов, присутствующих в конструкции CAR. В других случаях синдром высвобождения цитокинов и другая заболеваемость, связанная с приемной клеточной терапией, могут привести к потере бикарбонатной буферной способности крови, что приводит к лактоацидозу. Установлено, что приемная клеточная терапия, вводимая внутривенным вливанием, приводит к временному легочному влечению. Для некоторых клеточных терапий скорость инфузии требует постоянного мониторинга растворенного кислорода (Fischer et al. Stem Cells Dev. 2009 Jun; 18(5): 683-691). Степень легочного захвата зависит от размера клетки, состояния активации, дозы клеток и скорости инфузии. Cruz и соавт. (Cytotherapy. 2010 Oct; 12(6): 743-749) сообщают о неблагоприятных результатах более 300 вливаний Т-клеток, при которых низкие дозы и медленная инфузия могут уменьшить легочную задержку. Однако с некоторыми высокоэффективными CAR-T клетками мишени присутствуют на низких уровнях даже на эндотелии легких, такие как Her2 (Morgan и соавт. Mol Ther. 2010 Apr; 18(4): 843-851), может привести к немедленной токсичности, которую нельзя контролировать, и

приводит к быстрому ухудшению состояния пациента из-за первоначальной высокой концентрации клеток CAR-T в легких после инфузии и наличия Т-клеточной мишени в этих тканях. В других случаях присутствие Т-клеточных мишеней в других нецелевых тканях, таких как желчный протоки, может создавать на мишени токсические опухоли, которые нельзя контролировать (Lamers Mol Ther. 2013 апр., 21 (4): 904-12) и приводят к сильной токсичности органов перед тем, как другие агенты, такие как стероиды или элитопы элиминации клеток, могут быть использованы. В то время как венозная и артериальная плазмы обладают сильной буферной способностью против ацидоза, у пациентов с раком, получающим приемную клеточную терапию, могут возникать заболевания респираторного ацидоза, шока, метаболического ацидоза и ишемического ацидоза.

В некоторых вариантах осуществления предлагаются способы для временного увеличения сосудистого pH в определенных условиях для снижения аффинности микрофотографически контролируемых scFv для их антигенов. Сдвиг pH в 0.4U может снизить сродство некоторых scFvs более чем в 10 раз. В некоторых вариантах осуществления терапевтический контроль pH может быть достигнут с помощью путей IV или перорального введения. В некоторых вариантах осуществления инактивация аффинности связывания может быть достигнута с использованием бикарбоната. В других вариантах осуществления Tris-гидроксиметилметиномметан (также известный как трометамин, трометамол и ТНАМ) и Carbicarb™ (и эквимоларный гипертонический раствор бикарбоната натрия и карбоната натрия) используются для повышения pH крови в достаточном количестве для облегчения выделения на опухоль токсичность. В других вариантах осуществления ингибиторы протонного насоса с малой молекулой также могут быть использованы для повышения pH крови и/или pH ткани в достаточном количестве, чтобы облегчить мишень от токсичности опухоли. Ингибиторы протонного насоса включают, но не ограничиваются ими, эзомепразол (Nexium), эзомепразол и напроксен (Vimovo), лансопразол (Prevacid), омепразол (Prilosec и Zegerid) и рабепразол (Aciphex). Введение ингибиторов протонного насоса можно эффективно использовать в течение более длительных периодов времени, чтобы модулировать аффинность связывания доменного домена антигена с его родственными антигеном в течение дней, недель, месяцев или лет. В других вариантах осуществления аффинность антигенсвязывающего домена для его родственного антигена также может быть модулирована путем изменения pH крови и/или pH ткани, контролируя транскрипцию, трансляцию, экспрессию мембраны и стабильность транспортеров и насосов. Примерами таких транспортеров и насосов для модуляции pH являются, но не ограничиваются ими, протонные насосы, члены семейства обменных проб протонов натрия (NHE), семейства транспортеров бикарбоната (BCT) и семейства монокарбоксилатных транспортеров. В некоторых вариантах осуществления бикарбонат, ТНАМ или Caricarb™ можно вводить до или одновременно с инфузией пациентов CAR-T-клеток, экспрессирующих контролируемые pH scFv. Такое лечение облегчит непосредственную цитотоксичность, которая в противном случае связана с временной легочной задержкой вливаний CAR-T-клеток.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

В некоторых вариантах осуществления, предложенные здесь способы для настоящего изобретения включают ингибирование экспрессии одного или нескольких эндогенных генов, экспрессируемых в Т-клетках и/или НК-клетках. Представленные здесь способы иллюстрируют способность сделать рекомбинантные ретровирусы, которые экспрессируют miRNA или shRNA, например, которые могут быть использованы для

таких методов. Фактически, способы, представленные здесь, иллюстрируют, что такая miРНК или shРНК может быть кодирована внутри интронов, включая, например, интрон Ef1a. Это использует настоящее изобретение способов максимизации функциональных элементов, которые могут быть включены в упаковочный ретровирусный геном, чтобы преодолеть недостатки предшествующих учений и максимизировать эффективность таких рекомбинантных ретровирусов в терапии приемных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 miРНК в иллюстративных вариантах осуществления между 2 и 5, например 4 miРНК, которые связывают нуклеиновые кислоты, кодирующие одно или несколько из следующих целевые эндогенные Т-клеточные экспрессируемые гены, могут быть включены в рекомбинантный ретровирусный геном и доставлены в Т-клетки и/или НК-клетки с использованием способов, представленных здесь. Фактически, как описано здесь, 1, 2, 3 или 4 miРНК могут быть доставлены в один интрон, такой как интрон EF1a. Целевые эндогенные гены, экспрессируемые на Т-клетках, могут включать следующее: с неограничивающим ожидаемым преимуществом такой инактивации в круглых скобках: PD-1 (предотвращение инактивации); CTLA4 (предотвращение инактивации); TCRa (безопасность - предотвращение аутоиммунных заболеваний); TCRb (безопасность - предотвращение аутоиммунных заболеваний); CD3Z (безопасность - предотвращение аутоиммунных заболеваний); SOCS (предотвращение инактивации); SMAD2 (предотвращение инактивации); miR-155 (активировать активацию); IFN-гамма (уменьшение CRS); cCBL (продление сигнализации); TRAIL2 (предотвращение смерти); PP2A (продление сигнализации); ABCG1 (увеличение содержания микродомена холестерина путем ограничения клиренса холестерина).

В некоторых вариантах осуществления miРНК против генов-мишеней с аналогичными ожидаемыми утилитами может быть объединена. В других вариантах осуществления miРНК против генов-мишеней с дополнительными утилитами может быть объединена. В некоторых вариантах осуществления комбинации могут включать в себя CD3Z, PD1, SOCS1 и/или IFN-гамма.

МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ

В настоящем изобретении описаны различные методы лечения с использованием CAR. CAR настоящего изобретения, когда он присутствует в Т-лимфоците или НК-клетке, может опосредовать цитотоксичность по отношению к клетке-мишени. CAR настоящего изобретения связывается с антигеном, присутствующим в клетке-мишени, тем самым опосредуя убийство клетки-мишени Т-лимфоцитом или НК-клеткой, генетически модифицированной для получения CAR. АСТР CAR связывается с антигеном, присутствующим на поверхности клетки-мишени.

Настоящее изобретение относится к способам убийства или ингибирования роста клетки-мишени с использованием взаимодействия с цитотоксической иммунной эффекторной клеткой (например, цитотоксической Т-клеткой или НК-клеткой), которая генетически модифицирована для получения субъекта CAR, так что Т-лимфоцит или НК-клетка распознает антиген, присутствующий на поверхности клетки-мишени, и опосредует уничтожение клетки-мишени.

Настоящее раскрытие представляет собой способ лечения заболевания или расстройства у индивидуума, имеющего заболевание или расстройство, причем способ включает: а. введение вектора экспрессии, включающего полинуклеотидную последовательность, кодирующую CAR, в периферические клетки крови, полученные от субъекта, для получения генно-инженерной цитотоксической клетки; и б. введение

в организм генетически модифицированной цитотоксической клетки.

ПАЦИЕНТЫ, ПОДХОДЯЩИЕ ДЛЯ ДАННОЙ ТЕРАПИИ

Для лечения описанными здесь способами и композициями подходят разнообразные испытуемые. Подходящие испытуемые включают любого человекообразного существа, например человекообразного или человекообразного животного, у которого присутствует заболевание или расстройство/было диагностировано заболевание или расстройство, имеется риск развития заболевания или расстройства, у которого было заболевание или расстройство и который подвергается риску рецидива заболевания или расстройства, которое лечилось веществом против такого заболевания или расстройства и не реагировало на такое лечение, или которое было обработано агентом против заболевания или расстройства, но рецидивировало после первоначального ответа к такому лечению.

Испытуемыми, подходящими для лечения иммуномодулирующим методом, являются люди с аутоиммунным расстройством; лица, являющиеся реципиентами трансплантатов органов или тканей; и тому подобное; лица, страдающие иммунодефицитом; и лица, инфицированные патогеном.

Следующие неограничивающие примеры приведены исключительно в качестве иллюстрации примерных вариантов осуществления и никоим образом не ограничивают объем и цель настоящего изобретения. Кроме того, следует понимать, что любые изобретения, раскрытые или заявленные здесь, охватывают все варианты, комбинации и перестановки одного или нескольких описанных признаков. Одна или несколько функций могут быть явно исключены из формулы изобретения, даже если конкретное исключение явно не указано здесь. Следует также понимать, что описание реагента для использования в способе должно быть синонимом (и обеспечивать поддержку) этого способа, включающего использование такого реагента, в соответствии с конкретными способами, описанными здесь, или другими способами, известными специалисту в данной области техники. Кроме того, в тех случаях, когда в описании и/или заявке раскрыт способ, в способе можно использовать любой один или несколько реагентов, описанных здесь, если только специалист в данной области не поймет иначе.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Генерация рибопереключателей, специфически реагирующих на аналогов нуклеозид противовирусных препаратов.

В данном примере описан способ скрининга библиотек на основе естественных структурных рибопереключателей, которые связывают гуанозин и дезоксигуанозин. Такие рибопереключатели использовались в качестве каркасных последовательностей для разработки направленных библиотек для выбора аптамеров, которые специфически связываются с аналогом нуклеозида лиганда. Ранее для демонстрации связи естественных рибопереключателей с их нативными лигандами использовался метод изотермической титрационной калориметрии. Дополнительные испытания показали, что дезоксигуанозиновый переключатель также слабо взаимодействует с аналогами нуклеозида ацикловира и пенцикловира, что приводит к изменению конструкции данной последовательности в новую библиотеку. Одноцепочечные области рибопереключатателя были нацелены на мутацию, а также были выбраны вариантные последовательности, которые специфически реагировали на ацикловир или пенцикловир.

Материалы

Компоненты выбора (гуанин, гуанозин, дезоксигуанозин, ацикловир и пенцикловир) были заказаны у компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, штат Миссури). Ацикловир выступал исходной мишенью, в то время как пенцикловир выступал аналитом особого

интереса, используемым на последних раундах, а гуанин, гуанозин и дезоксигуанозин использовали в качестве контр-мишеней. Оксид графена (GrO), используемый в качестве разделительной среды, был закуплен у компании Angstrom Materials (Дейтон, штат Огайо). ГЭПЭС (рН 7,3) и $MgCl_2$ были закуплены у компании Amersco LLC (Солон, штат Огайо). KCl был закуплен у компании Teknova (Холлистер, штат Калифорния). Отборный буферный раствор был приготовлен при 5X (1X - 50 мМ ГЭПЭС, 100 мМ KCl, 20 мМ $MgCl_2$, рН 7,3). Для выполнения предварительного анализа и скрининга аптамеров в воде, свободной от нуклеазы, были восстановлены мишени, контр-мишени и олигоны. Для всех мишеней были приготовлены аликвоты, которые хранились при температуре $-20^{\circ}C$ для достижения максимального срока годности.

Генерация библиотеки аптамеров

Исходный шаблон библиотеки аптамеров синтезирован компанией IBA GmbH (Геттинген, Германия) в качестве обратного комплемента последовательностей на РИС. 14. На РИС. 14 нуклеотиды в боксах являются одноцепочечными в известных последовательностях, причем для обеспечения лучшего связывания с аналогами исходных мишеней «мутации» вводятся во время синтеза. Для нуклеотидов внутри боксов, выделенных сплошными линиями, допускаются мутации по типу замены; для нуклеотидов внутри боксов, выделенных пунктирными линиями, допускаются мутации по типу замены, а также вставки или делеции. Праймеры были синтезированы компанией IDT (Коралвилл, штат Айова) в виде одноцепочечной ДНК. Праймер T7 (SEQ ID NO: 240) объединяли с шаблонными последовательностями библиотеки для увеличения праймера ДНК-полимеразой Taq титана (Clontech, Маунтин-Вью, штат Калифорния). Материал, увеличенный праймером, транскрибировали с использованием набора транскрипции амплификации Ampliscribe T7 с высоким выходом (Epicenter, Мадисон, штат Висконсин), а затем очищали на электрофорезе в 10% полиакриламидном геле в условиях денатурации (ПААГ) с использованием 8 М мочевины перед использованием в селекции. Во время селекции библиотеку транскрибировали с обратной последовательностью с использованием обратной транскриптазы Superscript IV (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния) и обратного праймера (SEQ ID NO: 241). а также усиливали с использованием ДНК-полимеразы Taq титана (Clontech, Маунтин-Вью, штат Калифорния). Аптамер с SEQ ID NO: 248 демонстрировал изменение петли J2-3 от -3 до -1 и разность $\sim 2.25 \times 10^{10}$. Аптамер с SEQ ID NO: 250 демонстрировал изменение петли J2-3 от 0 до +5 и разность $\sim 9.38 \times 10^{14}$. Два олигонуклеотида (SEQ ID NO: 249 и 250) смешивали в соотношении 1:4160 для получения эквимольного разнообразия в объединенном пуле библиотек с общей разностью $\sim 9,38 \times 10^{13}$.

Скрининг библиотеки

Скрининг библиотеки проводился с использованием метода оксиген-систематической эволюции графена лигандов методом экспериментального обогащения (GO-SELEX) (РИС. 15) (Park и соавт., 2012), принимая во внимание преимущество π - π -взаимодействия, которое придает графеновому оксиду высокую степень сродства к одноцепочечным нуклеиновым кислотам (Zeng и соавт., 2015). Цель состояла в том, чтобы выбрать последовательности, которые не взаимодействовали с буфером выбора IX или с контр-мишенями (гуанин, гуанозин и дезоксигуанозин), но связывались с положительным целевым ацикловиром.

Для каждого раунда определенное количество библиотеки сначала перестраивали в буфере выбора 1X (5-минутная денатурация при $90^{\circ}C$, 5 минут при $4^{\circ}C$, затем при комнатной температуре). Затем контр-мишени добавляли в "перевернутые" библиотеки

и инкубировали в течение 30 минут при температуре 37°C. Исключением из этого были раунды 1 и 2, в которых контр-мишени были краткосрочно (<1 минуты) включены, с целью оказания поддержки при загрузке библиотеки в GrO. После того, как библиотека взаимодействовала с контр-мишенями и компонентами буфера, несвязанная библиотека
 5 была загружена в GrO (масса, равная 100-кратной массе библиотеки в начале раунда) в течение 10-минутной инкубации при температуре 37°C. Затем раствор центрифугировали со скоростью 7000 x g для осаждения GrO. Супернатант, содержащий последовательности, связанные с контр-мишенями и/или буферным раствором, был удален. Затем осадок дважды промывали 200 мкл 1X селективного буферного раствора,
 10 центрифугировали со скоростью 7000 об/мин x 1 г, и после каждой промывки удаляли супернатант. Затем добавляли раствор, содержащий положительную мишень, и позволяли элюировать библиотеку от GrO в условиях, указанных в Таблице 1, в течение до 60 минут при температуре 37°C, что в основном позволяло мишени конкурировать с оксидом графена для связывания библиотеки. Последовательности, которые сильнее
 15 связывались с мишенью, десорбировались от оксида графена и оставались связанными с мишенью в конце инкубации. Конечный этап центрифугирования отделял высвобожденный материал, расположенный в супернатанте, из библиотеки, не отвечающей требованиям, которая оставалась связанной с оксидом графена.

После положительного отбора восстановленную РНК, очищенную с использованием
 20 10%-ной денатурирующей ПААГ с 8 М мочевины, затем определяли количественно с использованием показания спектрофотометра (Таблица 1), транскрибируемого Superscript IV с обратной транскрипцией и амплифицировали с использованием PCR с ДНК-полимеразой маркера титана. Продукты амплификации транскрибировались в РНК для целей следующего раунда отбора.

В ходе отбора были использованы три уровня жесткости (Таблица 1). Первые два раунда отбора не включали скрининг в отношении контр-мишеней, чтобы максимально усилить загрузку библиотеки на GrO. Кроме того, большой избыток ацикловира использовался в положительных инкубациях, чтобы максимально усилить
 восстановление библиотеки, таким образом, обозначить с низкой строгостью.

Результаты инкубации контр-мишеней вводились после восстановления библиотеки
 30 как условия средней жесткости. Отношение ацикловира к библиотеке также уменьшилось в течение этих трех раундов, позволяя увеличить конкуренцию библиотек в отношении привязки к мишени. После того, как было достигнуто более 10% восстановления, были реализованы заключительные раунды отбора высокой жесткости. Соотношение контр-
 35 мишень/библиотека оставалось высоким, а положительное соотношение мишень/библиотека было доведено до значения 1:1, в то время как положительное время инкубации сократилось, позволяя выбрать более быстрые последовательности связывания. После того, как восстановление библиотеки составило более 10% после более чем двух раундов при условиях высокой жесткости, проводились параллельные
 40 оценки.

Поколение (жесткость)	LibraGusX- мишени (30-мин инкуб.)	Библиотека(+) мишень	(+) Время инкубации (мин)	Степень извлечения (%)
G0/R1 (низкая)	1:1000*	1:1000	60	0.43
G1/R2 (низкая)	1:1000*	1:1000	60	2.00
G2/R3 (средняя)	1:1000	1:500	60	3.60
G3/R4 (средняя)	1:1000	1:100	60	8.73
G4/R5 (средняя)	1:1000	1:10	60	10.20
G5/R6 (высокая)	1:1000	1:1	60	12.00
G6/R7 (высокая)	1:1000	1:1	60	8.60
G7/R8 (высокая)	1:1000	1:1	60	9.72
G8/R9 (высокая)	1:1000	1:1	30	20.08
G9/R10 (высокая)	1:1000	1:1	30	10.62
G10(-)† (параллель 1)	-	-	30	3.74
G10(X)‡ (параллель 1)	1:40	-	30	3.60
G10(+)† (параллель 1)	-	1:4	30	14.14
G10(P)‡ (параллель 1)	-	1:4	30	5.46
G11(-)† (параллель 2)	-	-	30	4.60
G11(X)‡ (параллель 2)	1:40	-	30	5.26
G11(+)† (параллель 2)	-	1:2	30	9.34
G11(P)‡ (параллель 2)	-	1:4	30	6.32

Таблица 1. Условия отбора и оценки. Условия, используемые для каждого раунда отбора или инкубации, с восстановлением в виде соотношения восстановленного образца и входной библиотеки для каждого раунда. Пополнение библиотеки отслеживалось в ходе отбора. * Контр-мишени, используемые для нагрузки, а не для увеличения времени инкубации. † Инкубация с предварительной загрузкой проводится с использованием объединенных контр-мишеней. ‡ Инкубация с предварительной загрузкой проводится с использованием положительного целевого ацикловира. Это было сделано для минимизации восстановления перекрестно-реактивных видов. В данной таблице используются следующие сокращения: «X-мишени» - контр-мишени; «(+) мишень» - ациклоvir или пенциклоvir; «(+) период инкубации (минуты)» - время, в течение которого «Библиотека: (+) мишень» была инкубирована с использованием GrO. G0 - это поколение 0 и т.д.; R1 - раунд 1 и т.д. Для параллельной оценки (параллель 1 и параллель 2) инкубации выполнялись с использованием следующих веществ: только 1X селективного буферного раствора, (X) контр-мишеней в 1X селективном буферном растворе, (+)

Для двух параллельных оценок библиотека, подлежащая оценке, была разделена на четыре равных объема для подготовки и пересворачивания белков, как указано выше (РИС. 16). Для каждого условия 50 пмоль библиотеки объединяли с буфером выбора 1X, фокусировали (при 90°C в течение 5 минут, при 4°C в течение 5 минут) и затем инкубировали в 200 мкл 10 мкМ комбинированных контр-мишеней 10 в буфере выбора 1X в течение 30 минут при 37°C. Затем эти образцы загружали для установления объема оксида графена, равного 100-кратной массе библиотеки в образце, и инкубировали в течение 10 минут при 37°C, а затем дважды промывали 200 мкл буфера выбора 1X, как и раньше. Затем загруженные образцы оксида графена инкубировали параллельно с 200 мкл соответствующего условия оценки (только буфер выбора 1X, 10 мкМ объединенных контр-мишеней, 1 мкМ пенцикловира, 1 мкМ ацикловира для первой параллельной оценки или 0,5 мкМ ацикловира для второй параллельной оценки, в Таблице 1 эти условия показаны как: (-); (X); (P); (+); и (+), соответственно) в буфере выбора 1X в течение 30 минут при 37°C. Конечный этап центрифугирования отделяет десорбированную чувствительную библиотеку от нечувствительной библиотеки, связанной с оксидом графена. Библиотеки ответов определяли количественно с использованием спектрофотометрического показания (Таблица 1), проверяли с использованием 10% денатурирующего ПААГ с 8 М мочевины и подготавливали для

второй параллельной оценки. Такая последующая оценка продолжала использовать контр-мишени для инкубации с предварительной загрузкой положительной выборки, но использовала положительный целевой ацикловир для каждой предварительной инкубации образцов. Это было сделано для сведения к минимуму представления перекрестно-реактивных последовательностей в данном образце (то есть ответа на контр-мишени в положительном образце, ответа на ацикловир в отрицательных, контр-мишенях или образцах пенцикловира). Материал, полученный после второй параллельной оценки, определяли количественно с использованием спектрофотометрического показания (Таблица 1), подтверждали с использованием 10% денатурирующей ПААГ с 8 М мочевины и получали для определения последовательностей с помощью обратной транскрипции и PCR для получения двухцепочечной ДНК.

Установка последовательности

Изначальная библиотека была подвержена более 10 раундам отбора и параллельной оценки на основе GrO (Таблица 1). Процесс GO-SELEX предназначен для обогащения последовательностей в течение нескольких раундов отбора, которые связываются с заданными мишенями, представляющими интерес, и удаления последовательностей, которые связываются с нецелевыми соединениями или компонентами буфера. В результате ожидается, что популяции, подлежащие определению последовательностей, содержат несколько копий потенциальных кандидатных генов аптамера.

Система Illumina MiSeq (Сан-Диего, Калифорния) была применена для определения последовательности библиотек аптамеров после параллельной оценки методом одностороннего считывания. Глубокое упорядочение и последующий анализ данных уменьшают большое количество скрининговых циклов, которые требует традиционная система SELEX, что может привести к ошибкам и смещениям в результате процесса скрининга (Schütze и соавт., 2011). Пять образцов были секвенированы: библиотека окончательного поколения, которая ответила на ацикловир, библиотека окончательного поколения, которая ответила на контр-мишени, библиотека окончательного поколения, которая ответила на буфер выбора 1X (отрицательное условие), библиотека предпоследнего поколения, которая ответила на ацикловир, и библиотека окончательного поколения, которая ответила на дополнительную интересующую мишень, пенцикловир. Из этих наборов данных были построены семейства последовательностей с 95% однородностью (сходство последовательностей с учетом мутаций, делеций и вставки) для идентификации кандидатных генов аптамера. Из библиотеки было получено 1711535 необработанных последовательностей (124600 уникальных последовательностей), которые ответили на ацикловир и 2074832 необработанных последовательностей (110149 уникальных последовательностей) из библиотеки, которая ответила на пенцикловир.

Выбор кандидатного гена аптамера

Строение семейства последовательностей сосредоточено в основном на сходстве последовательностей. Это означает, что частота последовательности в положительной целевой популяции учитывалась, но больший акцент был сделан на степени вариации между аналогичными последовательностями, причем 95%-ная однородность была минимальным требованием (100%-ное совпадение по всей последовательности не обязательно для присоединения семейства, может быть несовместимо, вставлено или удалено до 2 баз). Поэтому можно ожидать, что семейства с наибольшим числом членов будут высоко оценивать кандидатных генов аптамера. После того как семейства построены, можно учесть относительное присутствие семейства в данной популяции

семейства, которые часто встречаются в популяциях с отрицательной и контр-мишенью, считаются более слабыми кандидатами, поскольку они демонстрируют степень неспецифического взаимодействия при связывании с компонентами буфера или контр-мишени. Кроме того, семейства демонстрирующие высокий уровень обогащения (т.е. большее соотношение между конечной положительной популяцией и предпоследней положительной популяцией), повышают свою кандидатуру, поскольку коэффициент обогащения связан с привязкой к кандидату относительно остальной части популяции (Levay и соавт., 2015; Wang и соавт., 2014). В этих условиях несколько потенциальных семейств оказались сильными кандидатами на связывание ацикловира (Таблица 2) и пенцикловира.

Номер последовательности семейства кандидата гена	ПОС Л. №%	Последовательность	Длина	% идентичности	
				Консенсус	дикого типа
582-1	108	ACAGCTTAGCGTAATGGCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	100	80,77
582-2	109	ACAGCTTAGGATAATGGCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	95,92	80,77
582-3	110	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTCACAGACT	49	95,92	80,77
582-4	111	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTGACAGACT	49	95,92	80,77
582-5	112	ACAGCATAGCATAATGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	95,92	82,69

582-6	113	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	95,92	80,77
582-7	114	ACAGCTAGCGTAATGGCTACTGACGC CGTCCAAACCTATTTACAGACT	48	97,96	80,77
582-8	115	ACAGCTTAGCATTATGGCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	95,92	80,77
582-9	116	ACAGTTAGCATAATGGCTACTGACGC CGTCCAAACCTATTTACAGACT	48	95,92	82,69
582-10	117	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	95,92	80,77
582-11	118	ACAGCTTAGCTTAATGGCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	97,96	80,77
582-12	119	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	95,92	80,77
582-13	120	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	95,92	80,77
582-14	121	ACAGCTTAGCATAATGGATACTGACG CCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	95,92	80,77
582-15	122	ACAGCTTAGCATTGTGGCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	93,88	78,85
582-16	123	ACAGGTTAGCATAATGGCTACCGAC GCCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	93,88	82,69
582-17	124	ACAGCTTAGCGTAATGGCTACTGACG CCGCCAAACCTATTTACAGACT	49	97,96	82,69
582-18	125	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	93,88	80,77
582-19	126	ACAGCCTAGCATAAGGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	93,88	82,69
582-20	127	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGAGG CCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	95,92	80,77
582-21	128	ACAGCTTACCTTAATGGCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	95,92	78,85
582-22	129	ACAGCTTAGCATAATGGCTACCGACG CTGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	93,88	78,85
582-23	130	ACAGCTTAGCGTAATGGCTACTGGCG CCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	97,96	78,85
582-24	131	ACAGCTTAGCATACTGGCTACTGACG CCGCCAAACCTATTTACAGACT	49	93,88	82,69
582-25	132	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGACG CCGTCTAACCTATTTACAGACT	49	95,92	80,77
582-26	133	ACAGGTTAGCATAATGCCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	93,88	82,69

582-27	134	ACAGCTTAGCATAATTGCTACTGACG CCGTTCAAACCTATTTACAGACT	49	93,88	82,69
582-28	135	ACAGCTTAGCATAAAGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	95,92	80,77
582-29	136	ACAGCTTAGCGTAATGGCTACTGACG CCGTCTAAACCTATTTCCAGACT	49	95,92	80,77
582-30	137	ACAGGTTAGCATAATGGCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTTAGAGACT	49	93,88	86,54
582-31	138	ACAGGGTAGCGTAATGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	95,92	84,62
582-32	139	ACAGCGTAGCATAATGGCTACTGAC GCCGTTCAAACCTATTTACAGACT	49	93,88	86,54
582-33	140	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	93,88	78,85
582-34	141	ACAGCGTAGCATAGTGGCTACTGAC GCCGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	93,88	82,69
582-35	142	ACAGCTTAGTGTAATGGCTACTGACG CTGTCCAAACCTATTTACAGACT	49	95,92	76,92
582-36	143	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGACG GCGTTCAAACCTATTTACAGACT	49	93,88	82,69
582-37	144	ACAGGTTAGCATAATGGCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTTATAGACT	49	93,88	84,62
582-38	145	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTGTCGACT	48	91,84	80,77
582-39	146	ACAGCTTAGCATAATGGCTACTGACG CCGTCCAAACCTATTTACGACT	48	95,92	80,77
582 консенсусная последовательность	222	ACAGNNTASBDTWVDKSMTACYGRS GSBGYYYWAAMYHATKBHBNAGACT Если N в позиции 5 может быть равно C, G или означать отсутствие нуклеотида, N в позиции 6 может быть равно A, C, G, T или означать отсутствие нуклеотида, а N в позиции 45 может быть равно A или означать отсутствие нуклеотида.	49	-	-
769-1	147	ACAGGTCAGCATAATGTGCTAGTGCG CCTTCAAACCTATTTAGAGACT	48	100	82,69
769-2	148	ACAGGTCAGCATAATGTGCTAGTGCG CCCTCAAACCTATTTAGAGACT	48	97,92	80,77
769-3	149	ACAGGTTAGCATAATGTGCTATTGCG CCTTCAAACCTATTTAGAGACT	48	95,83	84,62
769-4	150	ACAGGTCAGCATAATGTGCTAGTGCG CATTCAAACCTATTTAGAGACT	48	97,92	80,77

769-5	151	ACAGGTTAGCATAATGTGCTAGTGCG CCTTCAAACCTATTTGAGACT	48	95,83	84,62
769-6	152	ACAGGTTATCATAATGTGCTAGTGCG CCTTCAAACCTATTTAGAGACT	48	95,83	82,69
769-7	153	ACAGGTTAGCATGATGTGCTAGTGCG CCTTCAAACCTATTTAGAGACT	48	95,83	82,69
769-8	154	ACAGGTTAGCATAATGGGCTAGTGC GCCTCAAACCTATTTAGAGACT	48	95,83	86,54
769-9	155	ACAGGTCAGCAAAATGTGCAAGTGC GCCTCAAACCTATTTAGAGACT	48	95,83	78,85
769-10	156	ACAGGTCAGCATAATGTGCTAGTGCG CCTTCAAACCTATCTGGAGACT	48	95,83	82,69
769-11	157	ACAGCTTAGCATAATGTGCTAGTGCG CCTTCAAACCTATTTAGAGACT	48	95,83	82,69
769-12	158	ACAGGTCAGCATAATGTGCTAGTGCG CCTTCAAACCTATTTACAGACT	48	97,92	80,77
769-13	159	ACAGGTCAGCATAATGTGCTAGTGCG CCTTCAAACATATTTAGAGACT	48	97,92	80,77
769-14	160	ACAGGGTAGCATAATGTGCTAGTGC GCCTCAAACCTATTTAGAGACT	48	95,83	86,54
769-15	161	ACAGGTTAGCATAATGTGCTAGTGCG CCCTCAAACCTATTTAGAGACT	48	95,83	82,69
769-16	162	ACAGGTTAGCATAATGTGCCAGTGCG CCTTCAAACCTATTTAGAGACT	48	95,83	82,69
769-17	163	ACAGGTCAGCATAATGGGCTAGTGC GCCTCAAACCTATTTAGAGACT	48	97,92	84,62
769 консенсу сн ая последоват ельность	223	ACAGSKYAKCAWRATGKGCHAKTGC GCMYTCAAACMTATYTDSAGACT	48	-	-
795-1	164	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTGCAGACT	49	100	83,02
795-2	165	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTACAGACT	49	97,96	81,13
795-3	166	ACAGCGAAGCATAATGGCTTCTGAC GCCCTCAAACCCTATTTGCAGACT	49	97,96	81,13
795-4	167	ACAGCCAAGCATACTGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTGCAGACT	49	95,92	79,25
795-5	168	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCCCGAAACCCTATTTGCAGACT	49	97,96	81,13
795-6	169	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GGCCTCAAACCCTATTTGCAGACT	49	97,96	80,77

795-7	170	ACAGCGAGGCATAATGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTGCAGACT	49	97,96	81,13
795-8	171	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCTTCAAACCCTATTTGCAGACT	49	97,96	84,91
795-9	172	ACAGCGAAGCATAATGGCTACAGAC GCCCTCAAACCTATTTGCAGACT	49	95,92	80,77
795-10	173	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTGAGACT	48	97,96	83,02
795-11	174	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTGCGACT	48	93,88	76,92
795-12	175	ACAGCCAAGCATAATGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTGCAGACT	49	97,96	81,13
795-13	176	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTGGCGACT	49	95,92	83,02
795-14	177	ACAGCGAAGCATAATGTCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTGCAGACT	49	97,96	81,13
795-15	178	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCGTCAAACCCTATTTGTAGACT	49	95,92	83,02
795-16	179	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCCTCAAACCTATTTGCAGACT	49	97,96	83,02
795-17	180	ACAGGTAGCATAATGGCTACTGACG CCCTCAAACCCTATTTGCAGACT	48	95,92	84,91
795-18	181	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTCTAGACT	49	95,92	81,13
795-19	182	ACAGCGAAGCATAATGGCTACTGAC GCCCTCAAACCCTATTTGTAGACT	49	97,96	83,02
795 консенсу сн ая последоват ельность	224	ACAGNSWRGCATAMTGKCTWCWGA CGSCBKCAAAMCYTANTTVNMGACT Если N в позиции 5 может быть равно C, G или означать отсутствие нуклеотида, N в позиции 40 может быть равно T или означать отсутствие нуклеотида, а N в позиции 44 может быть равно C, G, T или означать отсутствие нуклеотида.	49	-	-
935-1	183	ACAGGGTAGCATAATGGGCTACTTG ACGCCTTCACCTATTTGTAGACT	48	100	86,79
935-2	184	ACAGGGTAGCATAATGGGCTACTTG ACGCCTTCACCTATTTGAGACT	47	97,92	86,79
935-3	185	ACAGGGTAGCATAATGGGCTACTTTA CGCCTTCACCTATTTGTAGACT	48	97,92	84,62
935-4	186	ACAGGGTAGCATAATGGGCTACTTG ACGCCTTCACCTATTTCTAGACT	48	97,92	84,91

935-5	187	ACAGGGTAGCATAATGGGCTACTTG ACGCCTTCACCTATTTGGAGACT	48	97,92	88,68
935-6	188	ACAGGGTAGCATAAGTGGGCTACTTG ACGCCTTCACCTATTTGTAGACT	48	97,92	84,91
935-7	189	ACAGGGTAGCATGATGGGCTACTTG ACGCCTTCACCTATTTGTAGACT	48	97,92	84,91
935-8	190	ACAGGGTAGCATAATGGGCTACTTG ACGCCTTCACCTATTAGTAGACT	48	97,92	84,91
935-9	191	ACAGGGTAGCATAATGGGCTATTTGA CGCCTTCACCTATTTGTAGACT	48	97,92	84,91
935-10	192	ACAGGGTAGCATAATGGGCTACTTGC CGCCTTCACCTATTTGTAGACT	48	97,92	86,54
935-11	193	ACAGTGTAGCATAATGGGCTACTTGA CGCCTTCACCTATTTGTAGACT	48	95,83	83,02
935-12	194	ACAGGGTAGCATAATGGGCTACTTG ACGCTTTCACCTTTTTGTAGACT	48	95,83	83,02
935-13	195	ACAGGGTAGCATAAGGGGCTACTTG ACGCCTTCACCTATTTGTAGACT	48	97,92	84,91
935-14	196	ACAGGGTAGCATAATGGGCTACTTG ACGCCTCCACCTATTTGTAGACT	48	95,83	81,13
935-15	197	ACAGGGTAGCATAATGGGCTACTTGT CGCCTTCACCTATTTGTAGACT	48	97,92	84,62
935 консенсу сн ая последоват ельность	225	ACAGKGTGCGCATRRKKGRCTAYTTKH CGCYTYCACCTWTTWSNAGACT Если N в позиции 43 может быть равно G, T или означать отсутствие нуклеотида.	48	-	-
946-1	198	ACAGCGTAGCATAATGGGCTGCAGA CGCCGTCAAACCTATTTGCAGACT	49	100	84,62
946-2	199	ACAGCGTAGCATAATGGGCTGCAGA CGCAGTCAAACCTATTTGCAGACT	49	97,96	82,69
946-3	200	ACATGTAGCATAATGGGCTACTGACG CCGTCAAACCTATTTGCAGACT	48	91,84	86,54
946-4	201	ACAGCGTAGCATAGTGGGCTGCAGA CGCCGTCAAACCTATTTGCAGACT	49	97,96	82,69
946-5	202	ACAGTGTAGCATAATGGGCTGCAGA CGCCTTCAAACCTATTTGGAGACT	49	93,88	88,46
946-6	203	ACAGTGTAGCATAATGGGCTGCTGAC GCCGTCAAACCTATTTGAAGACT	49	93,88	86,54
946-7	204	ACAGCGTAGCATAATGGGCTACAGG CGCCGTCAAACCTATTTGCAGACT	49	95,92	84,62
946-8	205	ACAGCGTAGCATAATGGGCTACTGG CGCCGTCAAACCTATTTGCAGACT	49	93,88	86,54

5	946-9	206	ACAGCGTAGCATAATGGGCTGCAGACGCCGTCAAACCTATTTGAGACT	48	97,96	84,62
	946-10	207	ACAGGTAGCATAATGGGCTGCAGACGCCGTCAAACCTATTTGCAGACT	48	97,96	84,62
	946-11	208	ACAGGTAGCATAATGGGCTGCTGACGCCGTCAAACCTATTTACAGACT	48	93,88	84,62
	946-12	209	ACAGCGTAGCATATTTGGGCTGCAGACGCCGTCAAACCTATTTGCAGACT	49	97,96	82,69
	946-13	210	ACAGCGTAGCATAATGGGCTGCAGACGCCTTCAAACCTATTTGGAGACT	49	95,92	88,46
10	946-14	211	ACAGTGTAGCATAATGGGCTGCAGACGCCGTCAAACCTATTTGAGACT	48	95,92	84,62
	946-15	212	ACAGCGTAGCATAATGGGCTGCTGACGCCGTCAAACCTATTTGGAGACT	49	95,92	88,46
	946-16	213	ACAGCGTAGCATAATGGGCTGCAGACGCCGTCAAACCTATTTACAGACT	49	97,96	82,69
15	946-17	214	ACAGCGTAGCATAATGGGCTGCTGACGCCGTCAAACCTATTTGCAGACT	49	97,96	86,54
	946-18	215	ACAGGGTAGCATAATGGGCTGCAGACGCCGTCAAACCTATTTGGAGACT	49	95,92	88,46
	946-19	216	ACAGCGTAGCATAATGGGCTACAGACGCCGTCAAACCTATTTGCAGACT	49	97,96	86,54
20	946-20	217	ACAGCGTCGCATAATGGGCTGCAGACGCCGTCAAATCTATTTGCAGACT	49	95,92	80,77
	946-21	218	ACAGCGTAGCATAATGGGCTTCAGACGCCGTCAAACCTATTTGCAGACT	49	97,96	84,62
	946-22	219	ACATGTAGCATAATGGGCTGCAGACGCCGTCAAACCTATTTGGAGACT	48	93,88	84,62
25	946 консенсусная последовательность	226	ACANNGTMGCATADTGGGCTDCWGR CGCMKTCAAAYCTATTTNAGACT Если N в позиции 4 может быть равно G или означать отсутствие нуклеотида, N в позиции 5 может быть равно C, G, T или означать отсутствие нуклеотида, а N в позиции 44 может быть равно A, C, G или означать отсутствие нуклеотида.	49	-	-
30	961-1	220		47		82,69
	996-1	221		46		76,92

ДНК-последовательности, соответствующие нестебельным участкам рибопереключател, связывающих ацикловир-связывающие РНК. В процессе скрининга были идентифицированы семь семейств: 582, 769, 795, 935, 946, 961 и 996 от 1 до 39 последовательности в каждом семействе. Процент идентичности для каждой последовательности в семействе сравнивали с наиболее распространенной последовательностью в каждом семействе (582-1, 769-1, 795-1, 935-1, 946-1, 961-1 и 996-1). Процент идентичности для каждой последовательности в семействе также сравнивался с последовательностью дикого типа.

Положительный целевой ацикловир продуцировал семь сильных кандидатов (SEQ ID NO: 87-93, последовательности РНК, включая области стебля), соответствующие 582-1 (SEQ ID NO: 108), 769-1 (SEQ ID NO: 147), 795-1 (SEQ ID NO: 164), 935-1 (SEQ ID NO: 183), 946-1 (SEQ ID NO: 198), 961-1 (SEQ ID NO: 220) и 996-1 (SEQ ID NO: 221), каждый из которых обозначен как F1A (РИС. 17). Эти последовательности были наиболее распространенными последовательностями в каждом семействе

(последовательности ДНК всех членов каждой семьи: 582 (SEQ ID NO: 108-146); 769 (SEQ ID NO: 147-163); 795 (SEQ ID NO: 164-182); 935 (SEQ ID NO: 183-197); 946 (SEQ ID NO: 198-219); 961 (SEQ ID NO: 220); и 996 (SEQ ID NO: 221)). Консенсусные

последовательности показывают все возможные замены или промежутки в каждом
 5 положении нуклеотидов для каждого семейства (SEQ ID NO: 222-226). Поскольку целью
 было выявить аптамеров из библиотеки на основе РНК, которая, как известно,
 связывается с дезоксигуанозином, сильные кандидаты должны иметь минимальное
 присутствие в популяции встречаемых целей. Кандидаты F1A-795, F1A-935 и F1A-946
 10 очень хорошо соответствовали этому критерию, так как они не были обнаружены в
 популяции встречаемых целей. F1A-996 и F1A-961 считаются лучшими кандидатами в
 этом отношении, хотя они в определенной степени проявляются в популяции встречаемых
 целей. Кроме того, кандидаты должны отображаться минимально в отрицательной
 популяции, так как эти последовательности десорбируются из GrO без влияния
 ацикловира и могут представлять ложные срабатывания. F1A-935 и F1A-946 выполнялись
 15 идеально по этому критерию, так как они не были обнаружены в отрицательной
 популяции. Кандидат F1A-769 был минимально обнаружен в отрицательной популяции,
 а кандидаты F1A-961, F1A-795 и F1A-996 выполнялись менее хорошо. Коэффициент
 обогащения был конечным условием для рассмотрения, при этом F1A-935, F1A-946 и
 F1A-769 выполнялись адекватно. Кандидат F1A-582 был включен, поскольку он показал
 20 наибольший коэффициент обогащения, хотя он не соответствовал другим критериям.
 Остальные кандидаты мало отвечали этим четырем критериям, но демонстрировали
 приемлемые характеристики.

Дополнительный целевой пенцикловир вырабатывал семь сильных кандидатов (SEQ
 ID NO: 94-100), каждый из которых обозначался как F1P (РИС. 18). Как и прежде, целью
 25 было выявить аптамеров из библиотеки на основе РНК, которая, как известно,
 связывается с дезоксигуанозином, расходящаяся от библиотек, обогащенных для
 связывания с ацикловиrom (ацикловир) после 10 раунда. Сильные кандидаты должны
 были иметь минимальное присутствие в популяции ацикловира и встречаемых мишеней,
 чтобы минимизировать перекрестную реактивность. Кандидат F1P-923 встретил первый
 30 критерий, кандидат F1P-710 встретил второй критерий, а кандидат F1P-584 удовлетворил
 оба критерия до степени. Кандидат F1P-584 также продемонстрировал умеренную
 благоприятность для пенцикловира в отрицательном состоянии, а также умеренное
 обогащение по сравнению с ответом предыдущего поколения на ацикловир. Остальные
 кандидаты продемонстрировали либо минимальное одобрение пенцикловира по
 35 ацикловиру, либо минимальное благоприятствование пенцикловиру по встречаемым
 мишеням (F1P-837 и F1P-932, F1P-991 и F1P-718 соответственно). Эти четыре кандидата
 продемонстрировали некоторую благоприятность для пенцикловира над отрицательным
 условием, которое сводит к минимуму вероятность ложного положительного результата,
 хотя этот критерий не столь значителен, если кандидат не демонстрирует
 40 избирательности для пенцикловира над его аналогами. Коэффициент обогащения был
 конечным условием для рассмотрения, при этом F1P-923, F1P-932 и F1P-584 выполнялись
 адекватно.

Была проведена качественная оценка ПААГ для выбранных аптамеров.

Индивидуально синтезированные и транскрибируемые аптамеры подвергали селекции
 45 на оксиде графена (ГРО) при физиологическом Mg^{++} (0,5 mM) и элюировании либо
 ацикловиrom (+), либо контр-мишенями (х). Элюированные фракции аптамера для
 каждого образца подвергали ПААГ для анализа.

100 пмоль каждого кандидата-аптамера (на проба/полосу) ресуспендировали в 1X

модифицированном буфере для отбора (50 мМ HEPES, 100 мМ KCl, 0,5 мМ MgCl₂, pH 7,3) и снова откладывали (90°C в течение 5 минут, затем 4°C для 5 мин), затем инкубировали при 37°C в течение 30 минут с 200 пмоль (каждая) объединенных контр-мишеней или мишеней. Конечная концентрация библиотеки составляла 0,5 мкМ, концентрация мишеней/контр-мишенями составляла 1 мкМ (объем инкубации составлял 200 мкл).

После инкубации с мишенью/контр-мишенью добавляли 250 мкг GrO (Angstrom Materials (Дейтон, ОН)) для адсорбции несвязанного кандидата (10-минутная инкубация при 37°C).

Образцы центрифугировали в течение 5 минут при 7000 × g. Супернатант извлекали, денатурировали, используя 2X формамид, с 40 мМ EDTA, и работали на 10% денатурации ПААГ с 8 М мочевиной (поставщик: Американский биоаналитический; каталог # AB13021-01000. AB13022-01000). Буферным раствором для анализа был 1X TBE (поставщик: Amresco/VWR; каталог №0658-20L, разбавленный с использованием воды DI). ДНК-лестница была 20/100 ДНК-лестницей (IDT). Гели окрашивали гель-звездой (Lonza, 50535) и изображали на синем светопрозрачнике.

Кандидаты F1A-769, F1A-795, F1A-946 и F1A-996, как представляется, проявляют избирательный положительный отклик при этой качественной оценке ПААГ (хорошее элюирование аптамера от CrO с помощью целевого ацикловира и относительно меньшее или минимальное элюирование с помощью контр-мишеней).

Вывод

Сильные кандидаты на ацикловире были определены после двенадцати раундов итеративного скрининга и параллельной оценки; сильные кандидаты на пенцикловире были определены после двух раундов скрининга и параллельной оценки.

Пример 2: Выделение условных ScFv.

Потенциальные обязательства сайта сращивания удаляются, а специфические scFv опухолевых антигенов синтезируются путем перекрытия олиго-синтеза и клонируются в конструкцию челнока CAR, содержащую чувствительный к ацикловиру элемент и промотор CD3ζ примата. В качестве исходного прототипа используется анти-ECD EPCAM или ERBB2scFv с сигнальным пептидом, стеблем и трансмембранным доменом CD8-alpha. Твердые опухолевые микроокружения ограниченные продукты CAR генерируются либо с использованием способов, как описано в патенте США №8709755 и публикации PCT № WO/2016/033331 A1, либо путем прямого отбора из человеческих фаговых библиотек в разрешенных и непервизионных условиях. Вкратце, человеческая библиотека V_H × V_L от Creative Biolabs (Shirley, NY) подмечается в следующих разрешительных условиях опухоли: 100 мкг/мл гиалуронана, 100 кДа-фракции (Lifecore Biomedical, Chaska, MN), 20 мг/мл рекомбинантного HSA (Cyagen, Santa Clara, CA), 200 нг/мл рекомбинантного человеческого VEGF в 25 мМ бикарбонатном буфере натрия, 2 мкМ аденозина, 10 мМ лактата натрия, pH 6,7, после зазора с помощью магнитных шариков стрептавидина (ThermoFisher, Carlsbad, CA), связанных с биотинилированным человеческим IgG. Связывание с ECD рецептора биотинилированного-мишени рецептора EPCAM и ERBB2 при 37°C проводят в разрешительных условиях, за которыми следуют последовательные промывки в разрешительных условиях. Фаг высвобождается с физиологическими состояниями (1 мкг/мл гиалуронана, 20 мг/мл HSA, 25 мМ бикарбоната, 1 мМ лактата натрия, pH 7,2) с последующим элюированием плотных вариантов с кислым элюированием и быстрой нейтрализацией 1 М Трис. Фаг увеличивают, а геномную ДНК разделяют для глубокого анализа последовательности V_H × V_L-цепей с использованием длительной последовательности считывания (PacBio,

Menlo Park, CA). Пэннинг можно повторить для обогащения. $V_H \times V_L$

последовательности, показывающие преимущественное усиление считываний в процессе культивирования фага по обогащению до цели, исключаются для дальнейшего анализа. Фаг с селективным связыванием с мишенью, которые обогащены в условиях разрешающей способности опухоли, но высвобождаются в физиологических условиях, выбираются для дальнейшей характеристики путем клонирования в экспрессионную систему CAR, генерацию лентивируса и трансдукцию в Т-клетки для тестирования CAR-опосредованного опухолевого антигена, экспрессирующего убийство мишени в опухолеселективной среде по сравнению с физиологическими состояниями.

Пример 3: Генерация MRB-CAR с использованием микроокружения, ограниченного scFv.

Были получены ограничения на микроокружение, которые были получены путем проведения последовательностей V_H и V_L с низкой селективностью для развития микроокружения опухоли, как описано в заявке WO/2016/033331 A1. Химерные антигенные рецепторы (CARs) для связывания обоих двух опухолевых антигенов Axl или Ror2 с повышенной активностью при уменьшенном pH среды опухоли по сравнению с нормальной тканью (такие биологические биологические микроузлы иногда упоминаются здесь как (MRB-CAR) путем включения тяжелых цепей и легких цепей ограниченных однокомпонентных антител в микроокружение через векторы лентивиральной экспрессии вместе с другими доменами CAR для генерации MRB-CAR. Эти CAR включали различные комбинации модулей от аминокислотной до карбоксильного конца, которые включали сигнальный пептид CD8 (PI) (SEQ ID NO: 74); микроокружение ограничено анти-Ror2 и анти-Axl V_H и V_L комбинациями; стебель и трансмембранный домен из CD8 (SEQ ID NO: 75) или CD28 (SEQ ID NO: 76) (P5); ко-стимулирующий домен из CD 137 (SEQ ID NO: 1) или ICA (SEQ ID NO: 3) (P6); домен активации из CD3Z (SEQ ID NO: 13) (P7); 2A-1 рибосомная последовательность пропускания (SEQ ID NO: 77) (P8); и примерный eTAG (SEQ ID NO: 78) (P9).

Pan Т-клетки трансдуцировали рекомбинантными лентивирующими частицами, экспрессирующими CAR-кандидаты, и процент трансфицированных клеток определяли путем определения процента клеток, экспрессирующих eTag с использованием FACS. ПанТ-клетки успешно трансдуцировали рекомбинантными лентивирующими частицами, кодирующими кандидатские ЦАР, и проявляли условную активность в этих трансдуцированных Т-клеточных анализах при pH 6,7 против pH 7,4.

Цитотоксическую активность кандидатов CARs против клеток-мишеней, экспрессирующих Axl или Ror2, анализировали при pH 7,4 (физиологический pH) или pH 6,7 (pH-суррогатное исследование опухоли). Многие из кандидатов CAR были более эффективны в лизинге клеток-мишеней при pH 6,7, чем pH 7,4.

Пример 4. Построение лиганд-индуцируемых рибопереклюателей.

Аптамеры рибопереклюателя дезоксигуанозина и аптамеры рибопереклюателя гуанина (Pikovskaya, 2014; Kim, 2007) или другие пуриновые аптамеры рибопереклюателя синтезируются как олигонуклеотиды. В одном примере рибопереклюатель дезоксигуанозина IA из *Mesoplasma florum* (подчеркнутый и выделен жирным шрифтом на РИС. 6; СПРОЕКТ. выбран для эволюции, чтобы генерировать ацикловир-реагирующий рибопереклюатель. В другом примере, рибопереклюатель гуанина хрт из *Bacillus subtilis* (подчеркнутый и выделен жирным шрифтом на РИС. 10; СПРОЕКТ. выбран для эволюции, чтобы генерировать ацикловир-реагирующий рибопереклюатель. Для каждого из этих двух примеров создается случайная библиотека

РНК с альтернативными нуклеотидами в целевых положениях последовательностей в сегментах P2, P3, J1-2 и J2-3 (РИС 7 и 11). Каждый сегмент позволяет использовать 3 альтернативные нуклеиновые кислоты в каждом целевом положении последовательности или, альтернативно, делецию основания и вставку 4 нуклеотидов на сайт +1 в каждом целевом положении последовательности для мутагенеза насыщения, как показано на РИС. 8А-8В и 9 (M florum IA) и на РИС. 12А-12В и 13 (B. subtilis xpt). После удлинения праймера и приготовления реагента следует транскрипция РНК. Результирующая библиотека РНК отрицательно выбирается на оксиде графена в присутствии гуанина, гуанозина и дезоксигуанозина с последующим положительным отбором с ацикловиром или пенцикловиром. Во время процессов отрицательного и положительного отбора используют физиологические уровни магниевого ионов человека (от 0,5 мМ до 1,2 мМ) и температуру поддерживают при 37°C. Восстановленные аптамеры подвергают обратной транскрипции и амплификации ПЦР с последующей транскрипцией и последующим скринингом в течение по меньшей мере 8 последовательных раундов отбора. При параллельном подходе аптамеры экранируются дополнительным отрицательным экраном при 40°C. Результирующие положительные пулы проверяются последовательностью и анализом NextGen. Индивидуальные аптамеры синтезируют и исследуют на аффинность с помощью изотермической калориметрии при 35-40°C в физиологических уровнях магния человека. После отбора для позитивных ацикловиров и ацикловира пеницикловира аптамеры интегрированы с рибозимом типа молот и рибозимом типа пистолет. Положительные ацикловир-селективные аптамеры объединяются с пистолетными рибозимами для определения ацикловира, регулируемых рибозимами. (Harris KA RNA. 2015 Nov; 21(11): 1852-8. doi: 10.1261/rna). Варианты подвергают очистке методом ПААГ на основе гелевых сдвигов в присутствии ацикловира и отсутствии пенцикловира. Кроме того, селективный рибосвитч с ациклогиданозином помещают сразу 3 в петлю к акцептору сплайсинга перед конструкцией CAR/IL-7. В отсутствие ацикловира положение места срачивания связано в комплексе рибопереключателем, но в присутствии ацикловира становится доступным, генерируя функциональный транскрипт CAR.

Пример 5. Построение доменов распространения *in vivo*.

Ряд конститутивно активных трансмембранных мутантов IL-1 (IL-7) трансмембранных мутантов из Т-клеточных лимфобластных лейкозов (243 InsPPCL (SEQ ID NO: 82), 246 InsKCH (SEQ ID NO: 101), 241 InsFSCGP (SEQ ID NO: 102), 244 InsCHL (SEQ ID NO: 103) и 244 InsPPVCSV (SEQ ID NO: 104), все из Shochat et al., 2011, J. Exp. Med. Том 208 №5, 901-908) синтезируют путем перекрытия олигонуклеотидного синтеза (DNA2.0, Newark, California). Синтезированные конститутивно активные трансмембранные мутанты IL7R вводятся в конститутивно экспрессирующую лентивирусную векторную магистраль сразу за 2А рибосомной пропущенной последовательностью, за которой следует кассета экспрессии анти-CD19 CD3ζ, которая включает стебель CD8A (SEQ ID NO: 79) и лидерный пептид (SEQ ID NO: 74). Упаковочные клетки HEK293 трансфицируют трансформированными лентивирусными векторами трансмембранного мутанта IL7R, а лентивирусные упаковочные конструкции, выращенные и вирусные супернатанты собирают с использованием способов, известных в данной области. CD3/CD28-стимулированные Т-клетки трансдуцируют с вирусными супернатантами и выращены в дефиците IL2 AIM V, CTS OpTmizer T Cell Expansion SFM или среде X-VIVO 15 в течение 4 недель, дозаторы еженедельно с замороженными РВМС от того же донора. Полученные в результате трансдуцированные Т-клетки, экспрессирующие варианты IL7R, клонируют с помощью сортировки FACS, а

последовательности конструкций IL-7 идентифицируют путем секвенирования продуктов RT-PCR. Вариант 243 InsPPCL (PPCL) (SEQ ID NO: 82) выбирается для дальнейшей эволюции для генерации условно активного CAR.

Пример 6. Скрининг вспомогательных компонентов для активации и распространения CAR-T.

Ряд доменов, кодирующих белок (ABCG1, SOCS1, SMAD2, TGFBR2, cBCL, PD1) и miРНК, сконструирован для включения в синтетический интрон на обратной стороне кассеты CAR с использованием промотора с CD3. Каждая конструкция, содержащая кассету CAR, промотирующую CD3-промотор, и кодирующую белок домен или последовательность miРНК, содержит уникальный штрих-код для глубокого секвенирования и собирается с использованием сборки Гибсона с последующим преобразованием и увеличением библиотеки в *E. coli*. Вирусные запасы продуцируются и используются для трансдуцирования Т-клеток, индуцированных CD3/CD28, в AIM V, CTS OpTmizer T Cell Expansion SFM или X-VIVO 15 без IL2 и позволяют расти в течение 4 недель в культуре с последовательной выборкой ДНК для амплификации и глубокую последовательность для идентификации кода. Библиотека также подвержена анализу последовательности PACBio полной длины для определения разнообразия библиотек и декодирования компонентов штрихового кода. Последовательности miРНК и белок-кодирующие домены проверяют на синергическую активацию доменов CAR CD3ζ.

Пример 7. Разработка ретровирусной упаковки и трансдуцирующей системы нацеливания покоящихся Т-клеток для селективной интеграции Т-клеток и экспрессии от МКПК.

Несмотря на возможность установления лентивирусных векторов с высоким титром посредством транзientной трансфекции, данный способ несет риск генерации репликации компетентных ретровирусов (РКР) и не является масштабируемым для клинических применений. В этом случае стабильная ретровирусная пакующая клеточная линия генерируется путем одновременного введения нескольких конструкций, кодирующих индуцируемые промоторы и их регуляторы, в адаптированные к суспензии HEK293 (HEK293S) клетки для стабильного получения вирусных компонентов, CAR-генов и их регуляторных компонентов. Для временного контроля экспрессии генов могут использоваться две различные индуцибельные системы. Одна система основана на рапамицин- или рапалог-индуцированной димеризации двух факторов транскрипции. Один фактор транскрипции состоит из трех копий FKPB-белка, слитого с ДНК-связывающим доменом ZFHD1, а другой фактор транскрипции состоит из FRB-белка, слитого с доменом активации р65. Рапамицин или рапалог димеризует факторы транскрипции с образованием ZFHD1/р65 AD и может активировать транскрипцию гена на участках связывания 12xZFHD1.

Ряд векторов, показанных на РИС. 3А-3Е генерируются фланкирующими последовательностями транспозонов для целей интеграции в геном HEK293S. После интегрирования в геном клетки данные последовательности функционируют в качестве регуляторных компонентов, а также участки lox и/или FRT для последующей интеграции с использованием рекомбиназ Cre и/или flp, обозначенных в настоящем документе посадочными площадками. Исходные 5 конструкций содержат полинуклеотидные последовательности, кодирующие устойчивость к пурамицину, GFP, RFP и внеклеточному MYC-маркеру, который нацелен на клеточную мембрану через N-концевой PLss (сигнальный пептид бычьего пролактина) и закреплен на клеточной мембране через C-концевой трансмембранный якорный домен рецептора тромбоцитарного фактора роста (ТцРФ). Исходные 5 конструкций могут также

включать конститутивные минимальные промоторы ЦМВ и минимальные промоторы IL-2, промотор на основе рапамицин-регулируемого ZFHD1, тетрациклин-чувствительный промотор (TRE) или двунаправленный промотор TRE (BiTRE).

Конструкция на РИС. 3А содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую домен FRB, слитый с доменом активатора NFκB p65 (p65 AD) и ДНК-связывающий домен ZFHD1, слитый с тремя повторами FKBP, которые экспрессируются конститутивно. Конструкция на РИС. 3А также включает домен HIV1 REV и HSV VP65 для SrcFlagVpx под рапамицин-индуцируемым промотором ZFHD1/p65 AD. Конструкция на РИС. 3В включает полинуклеотид, кодирующий последовательность rtTA,

контролируемый промотором ZFHD1/p65 AD. Конструкция на РИС. 3С включает полинуклеотид, кодирующий ген устойчивости к пуромицину, фланкированными loxP-участками, и внеклеточный MYC-маркер, фланкированный lox2272-участками. Оба этих селективных маркера контролируются промотором BiTRE, фланкированным FRT-участками. Конструкция на РИС. 3D включает полинуклеотид, кодирующий

фланкированный loxP-участками GFP, контролируемый промотором TRE. Конструкция на РИС. 3D также включает в себя один участок FRT, расположенный между промотором TRE и 5' loxP-участком GFP. Конструкция на РИС. 3Е включает полинуклеотид, кодирующий фланкированный loxP-участками RFP, контролируемый промотором ZFHD1/p65 AD. Конструкция на РИС. 3Е также включает в себя один

участок FRT, расположенный между промотором ZFHD1/p65 AD и 5' loxP-участком RFP. Конструкции на РИС. 3С-3Е выступают в качестве посадочных площадок для других полинуклеотидных последовательностей для вставки в геном пакующей клеточной линии. Полинуклеотидные последовательности, подлежащие вставке, могут быть фланкированы lox-участками и вставлены в геном с использованием рекомбиназы Cre и loxP-участков. Это приводит к введению и одновременному удалению геномных областей, кодирующих резистентность к пуромицину, внеклеточному MYC-маркеру, GFP и RFP. В качестве альтернативы, полинуклеотидные последовательности могут быть фланкированы с помощью FRT-участков и вставлены в геном с использованием рекомбиназы flp и сайтов FRT-участков с последующим удалением полинуклеотидных последовательностей, кодирующих резистентность к пуромицину, внеклеточному MYC-маркеру, GFP и RFP с использованием рекомбиназы Cre.

Для генерации пакующей клеточной линии с посадочными площадками, интегрированными в геном, клетки НЕК293S совместно трансфицируют эквимоллярными концентрациями 5 плазмид (РИС. 3А-3Е) плюс 5 мкг in vitro-транскрибированной мРНК транспозазы piggybac или 5 мкг плазмиды с промотором для экспрессии транспозазы piggybac в присутствии PEI в соотношении 2:1 или 3:1 PEI к ДНК (масс/масс) или 2-5 мкг белка транспозазы piggybac с использованием смеси катионных пептидов.

Трансфицированные клетки выбирают с использованием пуромицина в присутствии 100 нм рапамицина и 1 мкг/мл доксициклина в течение 2-5 дней с последующей сортировкой клеток, активированной флуоресценцией, для целей сбора клеток, экспрессирующих GFP и RFP. Сортированные клетки выращивают в течение 5 дней в отсутствие пуромицина, рапамицина и доксициклина, а клетки, экспрессирующие GFP и RFP, удаляют, также с помощью тус-гранул удаляют тус-положительные клетки.

Затем отдельные клоны из отрицательно отсортированных клеток подвергают скринингу для целей индукции GFP и RFP рапамицином и доксициклином и одной клонированной клетки. ДНК из клонов собирают и секвенируют для анализа интеграции. Клоны, положительные на сильную индуцибельную экспрессию GFP и RFP в присутствии рапамицина и доксициклина, имеющие ограниченную фоновую экспрессию в отсутствие

рапамицина и доксициклина, увеличиваются и накапливаются.

Клетки НЕК293S с конструкциями, представленными на РИС. 3А-3Е и интегрированные в геном, затем трансфицируют конструкцией, содержащей трицистронный полинуклеотид, кодирующий участок сигнальной последовательности DAF/scFvFc анти-CD3 (UCHT1)/участок присоединения ГИФ-якоря CD14 (SEQ ID NO: 252), сигнальную последовательность DAF/внеклеточный домен CD80, способный участок присоединения ГИФ-якоря CD28/CD16B GPI (SEQ ID NO: 253) и сигнальную последовательность DAF/IL-7/DAF (SEQ ID NO: 107), а также последовательности транспозонов, фланкирующие полинуклеотидную область для интеграции в геном НЕК293S (РИС. 4А). После трансфекции клетки увеличивают в течение 2 дней при отсутствии рапамицина и доксициклина, и выбирают конститутивно красные колонии. После чего положительные колонии временно трансфицируют конструкцией для экспрессии рекомбиназы Cre с целью удаления остающейся геномной ДНК и области кодирования RFP. Другая конструкция (РИС. 4В), содержащий полинуклеотид с BiTRE -промотором и полинуклеотидную область, кодирующую полиполипептиды gag и pol в одном направлении, а также полинуклеотидную область, кодирующую белки вирусов кори F и H в другом направлении, трансфицируется в то же время. Рекомбиназа Cre интегрирует конструкцию в геном с целью генерации интегрированной последовательности, показанной на РИС. 4В. Полученные колонии оценивают на наличие экспрессии белка в присутствии доксициклина и рапамицин и анализируют методом глубокого секвенирования на наличие геномной интеграции. Оставшийся TRE-отзывчивый участок GFP сохраняется для введения лентивирусного генома.

Пример 8. Генерация лентивирусного вектора и ретровирусной упаковки.

Устойчивая клеточная линия ретровирусной упаковки, полученная в примере 7, трансфицирована конструкцией (РИС. 4С) для экспрессии Flp-рекомбиназы Flp и конструкцией, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую CAR и лимфопролиферативный элемент IL7 α -insPPCL-вставку, регулируемый промотором CD3Z, который не активен в клетках НЕК293S, при этом CAR и IL7 α -insPPCL разделены полинуклеотидной последовательностью, кодирующей рибосомальный шаг T2A, а IL7 α -insPPCL имеет рибозим, регулируемый рибопереключателем ацикловира. CAR-содержащая конструкция дополнительно включает cPPT/CTS, последовательности RRE и полинуклеотидную последовательность, кодирующую ВИЧ-1 пси. Вся полинуклеотидная последовательность на CAR-содержащей конструкции, которая должна быть интегрирована в геном, фланкирована FRT-участками. Успешная интеграция CAR-содержащей конструкции приводит к конститутивной экспрессии GFP, которая, следовательно, удаляется с помощью переходной трансфекции конструкцией для экспрессии рекомбиназы Cre. Линию НЕК293S выращивают в бессывороточной среде. После вырастания до пиковой плотности клеток в реакторе с мешалкой клетки разводят до 70% пиковой плотности клеток и обрабатывают 100 нМ рапамицином в течение 2 дней для целей индукции экспрессии ранних генов REV, Vpx и aCD3 scFv CD16B GPI, aCD28 scFv CD16B GPI и IL-7 SD GPIDAF с последующим добавлением 1 мкг/мл доксициклина в среду для целей индукции экспрессии таких структурных элементов, как Gag Pol, MV(Ed)-FΔ30, MV(Ed)-HΔ18 и лентивирусный геном, включая терапевтическую мишень. Уровни продуцирования вируса исследуют с помощью qPCR последовательности упаковки и метода ELISA p24. Вирус собирают путем глубокой фильтрации клеток, а также концентрирования/диафильтрации с использованием TFF-картриджа с последующим сверхбыстрым замораживанием флаконов.

Пример 9. Выделение, трансдукция и увеличение периферической крови

моноклеарных клеток (МКПК).

Представленный ниже пример иллюстрирует использование закрытой системы для обработки МКПК *ex vivo* перед увеличением *in vivo*. В качестве примера, у испытуемого отбирают 30-200 мл человеческой крови в пакет для сбора крови с использованием 5 кислого цитратного раствора на основе декстрозы (ACD) в качестве антикоагулянта. В качестве альтернативы, кровь отбирается в вакуумные пробирки для взятия пробы венозной крови, шприц или аналогичное изделие и переносится в пустой пакет для сбора крови или пакет для внутривенного вливания. Весь объем крови обрабатывают с помощью набора Neat Cell (Кат. № CS-900.2, Omniamed) в системе обработки клеток 10 Sepax 2 (BioSafe) в соответствии с инструкциями производителей. Моноклеарные клетки периферической крови (РВМС) собирают либо в пакет для культивирования, либо, в качестве альтернативы, в шприц. Аликвоту отбирают асептически для подсчета клеток, чтобы определить количество жизнеспособных клеток. МКПК переносятся на газопроницаемое клеточное культуральное устройство G-Rex100MCS (Wilson Wolf) при 15 конечной концентрации $0.1-1.0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл в X-VIVO 15 (Кат. №08-879H, Lonza) или устройство клеточного увеличения CTS OpTmizer Cell Extension SFM (Кат. № A1048501, Thermo Fisher Scientific) с 10-300 МЕ/мл IL-2 (Кат. №202-IL-010, R&D Systems) до достижения максимального конечного объема 200 мл. Кроме того, в среду может быть добавлена сыворотка иммунных клеток CTS, IL-2 (Кат. №A2596101, Thermo 20 Fisher Scientific). Газопроницаемое клеточное культуральное устройство G-Rex закрытого типа может быть предварительно покрыто Петрониктином (Кат. № CH-296, Takara) или аналогичным эквивалентом, полученным из фибронектина, в соответствии с инструкциями производителя.

МКПК, выделенные из периферической крови, загружают в фильтр PALL PBMC, 25 промывают один раз через фильтр с использованием 10 мл среды AIM V (Thermo Fisher Scientific) или среды X-VIVO 15 с последующей перфузией 10-60 мл лентивирусного запаса (приготовленного в примере 8) при температуре 37°C со скоростью 5 мл/час. Затем МКПК снова промывают с использованием среды AIM V, устройства CTS 30 OpTmizer T Cell Expansion SFM или среды X-VIVO 15, содержащей рекомбинантную человеческую ДНКазу (Пульмозим, Genentech) с последующей промывкой лактатным раствором Рингерабез, не содержащим ДНКазк (Кат. № L7500, Braun). Затем МКПК переливают обратно через фильтр в шприц. После этого клетки (целевые уровни клеток составляют от 5×10^5 до 1×10^6 клеток/кг) повторно вводятся пациенту методом 35 внутривенного переливания.

В зависимости от типа рибопереклювателя, содержащегося в ретровирусном геноме, пациенту выписывается соответствующий аналог нуклеозида противовирусного 40 препарата или аналог нуклеозида противовирусного пролекарства (ацикловир, валацикловир, пенцикловир или фамцикловир). Пациентам может быть выписана любая терапевтически эффективная доза, например: 500 мг аналога нуклеозида 45 противовирусного препарата или пролекарства перорально три раза в день. Лечение аналогом нуклеозида противовирусного препарата или пролекарством предпочтительно начинается до выполнения реинфузии, например, за 2 часа до этого, и может также начинаться во время реинфузии или через некоторое время после реинфузии. Курс лечения может продолжаться как минимум 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 30, 60, 90, 120 45 дней или 5, 6, 9, 12, 24, 36 или 48 месяцев или дольше. Лечение может включать введение аналога нуклеозида противовирусного препарата или пролекарства один, два, три или четыре раза в день. После начала реинфузии и курса лечения количество инфицированных клеток определяется посредством анализа крови на 2, 5, 7, 11, 13, 18,

28 и 56 день после завершения реинфузии посредством qPCR для количественного определения количества вирусного генома. Пациент, у которого наблюдается лихорадка или синдром высвобождения цитокинов, может получать уменьшенную дозу или частоту приема аналога нуклеозида противовирусного препарата или пролекарства, или вовсе может прекратить лечение. Если инфицированные Т-клетки не могут увеличены в 10000-100000 раз за день на 18-й день, доза или частота приема аналога нуклеозида противовирусного препарата или пролекарства может быть увеличена. Клинический ответ пациента может быть измерен с помощью визуализации ФДГ-ПЭТ и последовательной КТ. Пероральный прием аналога нуклеозида противовирусного препарата или пролекарства может быть сокращен или приостановлен после достижения продолжительной ремиссии или в случае чрезмерного распространения Т-клеток свыше 30% от общего количества периферических Т-клеток.

Пример 10. Терапевтическое вмешательство для повышения pH сосудов или тканей.

Чтобы уменьшить связывание антигенсвязывающего домена с его родственным антигеном, NaHCO_3 вводят в виде болюса IV или путем инфузии IV. Стандартная доза составляет 1 мг/кг массы тела в качестве начальной дозы, затем 0,5 мг/кг каждые 10 минут. Если pH равен 7,0, требуется четыре 50 мЭк ампулы NaHCO_3 для коррекции pH до 7,40

Раскрытые варианты осуществления, примеры и эксперименты не предназначены для ограничения объема раскрытия или для представления того, что приведенные ниже эксперименты являются полностью или единственными выполненными экспериментами. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых номеров (например, количества, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Следует понимать, что вариации описанных методов могут быть сделаны без изменения основных аспектов, которые должны быть проиллюстрированы экспериментами.

Специалисты в данной области техники могут разработать множество модификаций и других вариантов осуществления в рамках объема и духа настоящего раскрытия. Действительно, изменения в материалах, методах, чертежах, экспериментах, примерах и вариантах осуществления могут быть сделаны квалифицированными специалистами без изменения основных аспектов настоящего раскрытия. Любой из раскрытых вариантов осуществления может использоваться в сочетании с любым другим раскрытым вариантом осуществления.

Пример 11. Процесс тестирования лимфопролиферативных/выживаемых элементов рецептора IL-7 в МКПК

Для тестирования вариантов IL-7Ra в отношении их способности опосредовать антиген-независимую выживаемость Т-клеток, отбирали тридцать миллилитров человеческой крови с использованием кислого цитратного раствора на основе декстрозы (ACD) в качестве антикоагулянта в вакуумной пробирке для взятия пробы венозной крови. Весь объем крови обрабатывали посредством центрифугирования в градиенте плотности с помощью Ficoll-Paque™ (General Electric) в соответствии с инструкцией производителя для получения моноклеарных клеток периферической крови (МКПК). Аликвоты РВМС передавались асептически в лунки 12-луночного планшета для культивирования ткани вместе со средой X-Vivo™ 15 (Lonza) до получения конечной концентрации 0,5 миллиона жизнеспособных клеток/мл в конечном объеме 1 мл. В некоторые образцы также добавляли рекомбинантный человеческий интерлейкин-2 (IL-2) (новопротеин) в концентрации 100 МЕ/мл. Добавляли активирующее Ат к анти-CDS (ОКТ3, новопротеин) в концентрации 50 нг/мл с целью активации МКПК для

вирусной трансдукции. Планшеты выдерживали в течение ночи в стандартном инкубаторе с увлажненной культуральной средой при температуре 37°C и 5% двуокисью углерода. После выдерживания в течение ночи препараты лентивирусных частиц, содержащие требуемые испытываемые конструкции (РИС. 19А) добавляли в отдельные лунки при множественности инфекции (MOI), равной 5. Планшет выдерживали в течение ночи в стандартном инкубаторе с увлажненной культуральной средой при температуре 37°C и 5% двуокисью углерода. После выдерживания в течение ночи содержимое каждой из лунок 12-луночного планшета отбирали и центрифугировали, получая гранулу. Образцы один раз промывали фосфатно-солевым буфером Дюльбекко (D-PBS)+2% альбумином сыворотки человека (HSA), повторно суспендировали в среде X-Vivo⁵™ и переносили в лунки 6-луночных газопроницаемых клеточных культуральных устройств G-Rex® (Wilson Wolf). Добавляли дополнительную среду X-Vivo⁵™ 15, чтобы довести конечный объем каждой лунки до 30 мл. Соответствующие контрольные образцы для каждой из конструкций переносили в лунки 6-луночных газопроницаемых клеточных культуральных устройств G-Rex® (Wilson Wolf) и добавляли дополнительные среды, чтобы довести конечный объем до 30 мл с помощью 100 МЕ/мл рецептора IL-2 для некоторых контрольных образцов. Устройство G-Rex® выдерживали в течение ночи в стандартном инкубаторе с увлажненной культуральной средой при температуре 37°C и 5% двуокисью углерода. Во время культивирования свежий IL-2 добавляли каждые 2-3 дня к контрольным образцам, содержащим IL-2. В соответствии с требованиями испытываемые образцы без IL-2 добавки не вносились. Образцы удаляли для отслеживания количества клеток и жизнеспособности во время увеличения (Countess, Thermo Fisher) на 7-й день.

На РИС. 19А представлена схема конструкций IL7Rα, прошедших тестирование. Эти конструкции были вставлены в рекомбинантный лентивирусный геном. Для трансдукции МКПК использовали рекомбинантные ретровирусы. На РИС. 19А показана схема IL7Rα дикого типа (SEQ ID NO: 229), которая состоит из сигнальной последовательности (SS), внеклеточного домена (ECD), трансмембранного (ТМ) и внутриклеточного домена (ICD). «1» означает участок домена фибронектина III типа; «2» означает участок мотива WSXWS; «3» означает участок из Блока 1, «4» означает участок фосфорилирования протеинкиназы С (PKC), а «5» обозначает участок из Блока 2.

Вариант «А» представляет собой рецептор IL-7Rα с InsPPCL в позиции 243 (Shochat и соавт. 2011, J. Exp. Med. Том 208, №5, стр. 901-908), но без мутации S185C, экспрессированной на транскрипте с полипептидом GFP, линкером GSG и рибосомальным шагом последовательности P2A, слитой с его N-концом. Вариант «В» представляет рецептор IL-7Rα InsPPCL с полипептидом GFP, линкером GSG и рибосомальным шагом последовательности P2A, слитой с его N-концом, а также Мус Tag между сигнальной последовательностью и внеклеточным доменом. Вариант «С» аналогичен варианту «В», за исключением того, что его внутриклеточный домен усечен в положении 292. Вариант «D» аналогичен варианту «А», за исключением того, что его внутриклеточный домен усечен в положении 292. Вариант «Е» является вариантом рецептора IL-7Rα InsPPCL, усеченного на его N-конце, так что сигнальная последовательность и большая часть внеклеточного домена (остатки 1-228) отсутствуют; вариант «Е» также имеет полипептид GFP, линкер GSG, рибосомальный шаг последовательности P2A, а eTag слитый с N-концом в этом порядке от аминоконца. Нумерация аминокислотных остатков основана на показателях рецептора IL7Rα (NCBI GI №002176.2). Т-клетки, содержащие каждый из вариантов, тестировали на жизнеспособность в присутствии или отсутствии IL-2 методом вытеснения трипанового

синего.

Как показано на РИС. 19В, МКПК требуют наличия рецептора IL-2 для выживания *in vitro*. Как показано на РИС. 19В, нетрансфицированные МКПК обладают приблизительно 80% жизнеспособностью в присутствии IL-2 и 0% жизнеспособность в отсутствие IL-2. МКПК, имеющие полноразмерные версии IL-7R α InsPPCL (варианты IL-7R α А и В на РИС. 19А) обладали жизнеспособностью более 20%, что указывает на выживаемость экспрессии конститутивно активного рецептора IL-7R α InsPPCL в этих клетках. Кроме того, Т-клетки, экспрессирующие варианты IL-7R α InsPPCL с усеченным внутриклеточным доменом (ICD) (варианты IL-7R α С и D на РИС. 19А) повысили жизнеспособность по сравнению с рецептором IL-7 дикого типа. Наконец, N-концевой мутаген рецептора IL-7 (вариант IL-7R α Е на РИС. 19А), как показано на РИС. 19В обладал выживаемостью в этих клетках. Соответственно, этот пример демонстрирует нам, что рецептор IL-7 обладает выживаемостью при экспрессии в МКПК.

Пример 12. Эффективность трансдукции свежевыделенных нестимулированных человеческих Т-клеток с помощью MeVpp

Лентивирусы продуцировали путем переходной трансфекции 293Т клеток (Lenti-X 293Т, Clontech) с лентивирующими векторами экспрессии. Клетки адаптировали к суспензионной культуре путем серийного роста в среде экспрессии Freestyle 293 (ThermoFisher Scientific). Клетки в суспензии высевали в 1х6 клеток/мл (30 мл) в колбе Эрленмейера емкостью 125 мл и сразу трансфицировали с использованием PEI (Polysciences), растворенного в слабой кислоте.

Плазмидную ДНК разбавляли в 1,5 мл среды Optimem для 30 мл клеток. Для псевдочастиц VSV-G общая ДНК (1 мкг/мл объема культуры) представляла собой смесь из 4 плазмид со следующими молярными соотношениями: 2х геномную плазмиду, 1х Rev-содержащую плазмиду, 1х VSVg-содержащую плазмиду и 1х Gagpol-содержащую плазмиду. Для псевдочастиц MV (Ed)-FΔ30/HA18 общая ДНК (1 мкг/мл объема культивирования) представляла собой смесь из 5 плазмид со следующими молярными соотношениями: 2 геномная плазида, 1х Rev-содержащая плазида, (2/3, две трети) х MV (Ed)-FΔ30-содержащая плазида, (1/3, одна треть) х MV (Ed)-HA18-содержащая плазида и 1х Gagpol-содержащая плазида. Для псевдочастиц MV (Ed)-FΔ30/HA24 общая ДНК (1 мкг/мл объема культивирования) представляла собой смесь из 5 плазмид со следующими молярными соотношениями: 2 геномная плазида, 1х Rev-содержащая плазида, (2/3, две трети) х MV (Ed)-FΔ30-содержащая плазида, (1/3, одна треть) х MV (Ed)-HA24-содержащая плазида и 1х Gagpol-содержащая плазида. Отдельно PEI разбавляли в 1,5 мл Optimem до 2 мкг/мл (объем культивирования, соотношение 2:1 к ДНК). После 5-минутной инкубации комнатной температуры два раствора тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре еще 20 минут. Конечный объем (3 мл) добавляли к клеткам. Затем клетки инкубировали при 37°C в течение 48 часов при вращении со скоростью 120 об / мин и 5-8% CO₂.

Через 48 часов супернатанты собирали методом центрифугирования со скоростью 1000 г за оборот в течение 10 минут. Супернатанты декантировали в свежую пробирку и добавляли 1/4 объема супернатантов в растворе ПЭГ (PEG-IT, System Biosciences). Лентивирусные псевдотипы осаждали путем инкубации в течение ночи при 4°C с последующим центрифугированием со скоростью 1500 г за оборот в течение 20 минут при 4°C. Супернатант удаляли и вирус ресуспендировали в соотношении 1:100 от объема PBS. Вирусы титровали путем серийного разведения и экспрессии GFP на клетках Raji, которые экспрессировали как CD46, так и SLAM, через 48 часов после трансдукции, с помощью проточной цитометрии.

Обогащенные Т-клетки периферической крови были сначала выделены из свежего охристого слоя крови, собранного и распределенного Банком крови Сан-Диего, Калифорния. Вкратце, разделение градиента плотности SepMate™ (Stemcell™) МКПК на Ficoll-Paque PLUS® (GE Healthcare Life Sciences) выполнялось по инструкциям производителей. Нетронутые Т-клетки затем дополнительно обогащали путем отрицательного отбора из недавно выделенных общих МКПК, используя нетронутые Т-клетки Dynabeads® kit (Invitrogen) и инструкции изготовителя. После выделения 2.6Е5 обогащенных и свежеизолированных и нестимулированных Т-лимфоцитов периферической крови трансдуцировали в двух экземплярах с различными векторами при различных кратностях инфекции (MOI). Трансдукции проводили в течение 14 часов при 37°C в 100 мкл RPMI-2% HIFCS в 96-луночном планшете. После инкубации с векторами в течение 14 часов клетки трижды промывали PBS-2% HIFCS и, наконец, инкубировали при плотности клеток 0,5Е6/мл в RPMI-10% HIFCS при 37°C до 3-го дня.

Через три дня после трансдукции с клетками VSV-Gpp или MeVpp, 1Е5 собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии для экспрессии GFP в популяции клеток CD3₊. На РИС. 20 показан график эффективности трансдукции в отношении MOI для отрицательно выбранных и нестимулированных Т-клеток. Символы расположены в шахматном порядке для большей наглядности. Нестимулированные Т-клетки были более эффективно трансдуцированы с использованием псевдочастиц MV (Ed)-FΔ30/MV(Ed)-HA18 (~70-80%) по сравнению с VSV-Gpp (~0-5%) при MOI, равном 1. Нестимулированные Т-клетки были также более эффективно трансдуцированы с использованием псевдочастиц MV(Ed)-FΔ30/MV(Ed)-HA24 (~70-80%) при MOI, равном 5, по сравнению с VSV-Gpp (~0-5%) при MOI, равном 6. Эффективность трансдукции свежеизвлеченных нестимулированных Т-клеток человека с помощью псевдотипированных лентивекторов значительно выше, когда усеченные полипептиды с MeV-оболочкой используются для псевдотипирования, чем при использовании VSV-G.

Пример 13. Демонстрация функциональности miРНК, вставленных в интрон промотора EF-1-альфа

Были разработаны четыре отдельных генных фрагмента gBlocks®, каждый из которых содержит структуру miR-155. Для каждого gBlock® была использована уникальная miРНК, нацеленная на транскрипт дзета-цепи CD3 мРНК, для замены целевой последовательности miR-155. Каждый gBlock® содержал последовательность перекрытия 40 бп, предназначенную для облегчения сборки всех четырех gBlocks® в виде одной цепочки в интроне промотора EF-1-альфа. GBlocks® был собран с использованием коммерческого набора для сборки Gibson® assembly ultra (NEBuilder, New England Biolabs, Inc.).

Промотор EF-1-альфа и интрон А (SEQ ID NO: 255) был частью экспрессирующей трансгенной экспрессии GFP и eTag, содержащейся в основной цепи лентивирусного вектора (основная цепь лентивируса с GFP и примерный eTag, распознаваемый цетуксимабом обозначена здесь как F02). Позиции нуклеотидов каждого gBlock® и его соответствующих компонентов в SEQ ID NO: 255 указаны в Таблице 3. Правильная сборка четырех miРНК в основную цепь лентивируса была подтверждена всесторонним секвенированием промотора EF-1α.

Характер	Позиции нуклеотидов в посл.
gBlock® 1	927-1138
Зона перекрытия EF1-альфа	927-966
каркасный участок miR155 – группа 5'	967-994
siPHK1	995-1015
конечная петля miR	1016-1034
siPHK1	1035-1042
siPHK1	1043-1053
каркасный участок miR155 – группа 3'	1054-1098
gBlock® 2	1099-1310
40bp 50% GC-линкер 1	1099-1138
каркасный участок miR155 – группа 5'	1139-1166

5

10

15

20

25

30

siPHK2	1167-1187
конечная петля miR	1188-1206
siPHK2	1207-1214
siPHK2	1215-1225
каркасный участок miR155 – группа 3'	1226-1270
gBlock® 3	1271-1482
40bp 50% GC-линкер 2	1271-1310
каркасный участок miR155 – группа 5'	1311-1338
siPHK3	1339-1359
конечная петля miR	1360-1378
siPHK3	1379-1386
siPHK3	1387-1397
каркасный участок miR155 – группа 3'	1398-1442
gBlock® 4	1443-1654
40bp 50% GC-линкер 4	1443-1482
каркасный участок miR155 – группа 5'	1483-1510
siPHK4	1511-1531
конечная петля miR	1532-1550
siPHK4	1551-1558
siPHK4	1559-1569
каркасный участок miR155 – группа 3'	1570-1614
Зона перекрытия EF1-альфа	1615-1654

Таблица 3. Характерные позиции нуклеотидов в ПОСЛ.

Лентивирусы, содержащие четыре miPHK, направленные на дзета-цепи CD3, получали
 35 посредством переходной котрансфекции четырех плазмид в суспензионные клетки
 НЕК293: плазида, содержащая четыре miPHK, нацеленная на транскрипт мРНК зета-
 цепи CD3; плазида, содержащая VSV-G; плазида, содержащая REV; и плазида,
 содержащая GAG-POL. Вирусный супернатант отбирали через 48 часов и осаждали в
 ПЭГ в течение 24 часов. Супернатанты центрифугировали, а гранулированный вирус
 40 повторно суспендировали в полной среде для роста МКПК без IL-2. Вирусные титры
 рассчитывали методом 48-часовой трансдукции клеток Юркат.

Для трансдукции МКПК размораживали в День 0 и выдерживали в течение 24 часов
 вместе с 100 Ед/мл hrIL-2. В 1-й день МКПК активировали с помощью конъюгированных
 CD3/CD28 гранул. На 2-й день активированные МКПК были трансдуцированы
 45 лентивирусом, содержащим miPHK при ПУМ, равном 10. Клетки увеличивали до 11-
 го дня, каждый раз добавляя свежий hrIL-2 каждые два дня. На 7, 9 и 11-й дни было
 отобрано 1 млн. клеток для анализа возбужденной флуоресценции сортированных
 клеток (FACS-анализ).

Клетки окрашивали для определения поверхностной экспрессии эпсилон CD3, используя ПЭ-конъюгированное антитело к ОКТ-3 (Biolegend). Уровни экспрессии определялись по среднему значению интенсивности флуоресценции (СФ) ПЭ в популяции с положительным зеленым флуоресцентным белком (GFP) (трансдуцированные клетки).
 5 Уровни экспрессии трансдуцированных клеток сравнивали между диким вирусом (F02) и вирусом F02, содержащим miРНК дзета-цепи CD3. На РИС. 21 показано, что нацеленные на дзета-цепь CD3 miРНК, которые находятся в интроне промотора EF-1-альфа, способны к нокдаун экспрессии комплекса CD3.

В некоторых случаях концепции были описаны со ссылкой на конкретные варианты осуществления. Однако, специалист в данной области техники понимает, что могут
 10 быть выполнены различные модификации и изменения без отклонения от области применения изобретения, о чем указано в приведенной ниже формуле изобретения. Соответственно, спецификация и цифры должны рассматриваться в иллюстративном, но не ограничительном смысле, и все такие модификации предназначены для включения
 15 в область применения изобретения.

(57) Формула изобретения

1. Способ генной модификации Т-клетки, включающий: взаимодействие Т-клетки *ex vivo* с некомпетентным репликативным рекомбинантным ретровирусом для
 20 образования реакционной смеси для трансдукции, причем некомпетентный репликативный рекомбинантный ретровирус содержит:

а) один или несколько псевдотипирующих элементов на поверхности некомпетентного репликативного рекомбинантного ретровируса, причем один или несколько псевдотипирующих элементов облегчают связывание с Т-клеткой и слияние с ней
 25 некомпетентного репликативного рекомбинантного ретровируса; и

б) полинуклеотид, содержащий одну или несколько единиц транскрипции, причем каждая из одной или нескольких единиц транскрипции функционально связана с промотором, активным в Т-клетках, причем одна или несколько единиц транскрипции кодируют первый сконструированный сигнальный полипептид, включающий первый
 30 рецептор химерного антигена, содержащий антигенспецифическую область для нацеливания; трансмембранный домен; и внутриклеточный активирующий домен, и

с) элемент активации на поверхности некомпетентного репликативного рекомбинантного ретровируса, причем указанный элемент активации представляет собой мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD3 на поверхности
 35 покоящейся Т-клетки и активировать покоящуюся Т-клетку, и не кодируется полинуклеотидом в некомпетентном репликативном рекомбинантном ретровирусе, причем Т-клетка взаимодействует *ex vivo* с некомпетентным репликативным рекомбинантным ретровирусом в интервале от 15 минут до 14 часов, причем способ осуществляется без предварительной стимуляции *ex vivo*, и при этом указанное
 40 взаимодействие облегчает мембранное слияние Т-клетки с некомпетентным репликативным рекомбинантным ретровирусом для получения генетически модифицированной Т-клетки.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что некомпетентный репликативный рекомбинантный ретровирус является лентивирусом.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что мембраносвязанный полипептид, способный связываться с CD3, является антителом к CD3, который слился с гетерологичной последовательностью присоединения мембраны.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере один или несколько

псевдотипирующих элементов содержат весь или функциональный фрагмент оболочечного белка вируса везикулярного стоматита (VSV-G), оболочечного белка эндогенного вируса кошачьих (RD114), полипептид вируса кори F или полипептид вируса кори H.

5 5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что одна или несколько единиц транскрипции кодируют второй сконструированный сигнальный полипептид, включающий лимфопролиферативный элемент, который содержит полипептид рецептора цитокина, содержащий сигнальный домен, способный активировать путь STAT и стимулировать пролиферацию и/или выживание Т-клеток.

10 6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что лимфопролиферативный элемент содержит конститутивно активный полипептид рецептора цитокина, причем экспрессия конститутивно активного полипептида рецептора цитокина или его фрагмента регулируется.

7. Способ по п. 5, отличающийся тем, что способ дополнительно содержит:
15 забор крови, содержащей Т-клетку пациента до взаимодействия Т-клетки *ex vivo* с некомпетентным репликативным рекомбинантным ретровирусом; и введение генно-модифицированной Т-клетки пациенту, причем генно-модифицированная Т-клетка не увеличивается *ex vivo* после указанного взаимодействия и до введения пациенту.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что взаимодействие производится в интервале
20 от 15 минут до 8 часов.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что Т-клетка является покоящейся Т-клеткой.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере один из одного или нескольких псевдотипирующих элементов представляет собой элемент активации.

11. Некомпетентный репликативный рекомбинантный ретровирус, содержащий: а)
25 один или несколько псевдотипирующих элементов на поверхности некомпетентного репликативного рекомбинантного ретровируса, причем один или несколько псевдотипирующих элементов облегчают связывание с Т-клеткой и мембранное слияние с ней некомпетентного репликативного рекомбинантного ретровируса; и б)
30 полинуклеотид, содержащий одну или несколько единиц транскрипции, причем каждая из одной или нескольких единиц транскрипции функционально связана с промотором, активным в Т-клетках, при этом одна или несколько единиц транскрипции кодируют первый сконструированный сигнальный полипептид, включающий первый рецептор химерного антигена, содержащий антигенспецифическую область для нацеливания;
35 трансмембранный домен и внутриклеточный активирующий домен; и второй сконструированный сигнальный полипептид, включающий лимфопролиферативный элемент, который содержит полипептид рецептора цитокина, содержащий сигнальный домен, способный активировать путь STAT и стимулировать пролиферацию и/или выживание Т-клеток, и с) элемент активации на поверхности некомпетентного репликативного рекомбинантного ретровируса, причем элемент активации слился с
40 гетерологичной последовательностью присоединения мембраны, и при этом элемент активации представляет собой полипептид способный связываться с CD3 на поверхности покоящейся Т-клетки и активировать покоящуюся Т-клетку и не кодируется полинуклеотидом в некомпетентном репликативном рекомбинантном ретровирусе.

12. Некомпетентный репликативный рекомбинантный ретровирус по п. 11,
45 отличающийся

тем, что промотор по меньшей мере одной из одной или нескольких единиц транскрипции представляет собой промотор EF1a, промотор вируса мышинных стволовых клеток (MSCV) или специфический промотор Т-клетки.

13. Некомпетентный репликативный рекомбинантный ретровирус по п. 11, отличающийся тем, что полинуклеотид дополнительно содержит интрон, причем интрон кодирует shRNA или одну или несколько miRNA.

14. Некомпетентный репликативный рекомбинантный ретровирус по п. 11, отличающийся тем, что лимфопротролиферативный элемент активизирует путь Stat1, путь Stat3, путь Stat4 или путь Stat5.

15. Некомпетентный репликативный рекомбинантный ретровирус по п. 11, отличающийся тем, что полипептид, способный связываться с CD3, представляет собой антитело к CD3.

16. Некомпетентный репликативный рекомбинантный ретровирус по п. 11, отличающийся тем, что по меньшей мере один из одного или нескольких псевдотипирующих элементов содержит весь или функциональный фрагмент оболочечного белка вируса везикулярного стоматита (VSV-G), оболочечного белка эндогенного вируса кошачьих (RD114), полипептид вируса кори F или полипептид вируса кори H.

17. Некомпетентный репликативный рекомбинантный ретровирус по п. 11, отличающийся тем, что по меньшей мере один из одного или нескольких псевдотипирующих элементов представляет собой элемент активации.

18. Некомпетентный репликативный рекомбинантный ретровирус по п. 11, отличающийся тем, что геном некомпетентного репликативного рекомбинантного ретровируса составляет менее 10 000 КБ, при этом некомпетентный репликативный рекомбинантный ретровирус является лентивирусом, причем лимфопротролиферативный элемент представляет собой конститутивно активный рецептор цитокина, который не привязан к цитокину, причем некомпетентный репликативный рекомбинантный ретровирус дополнительно кодирует полипептид, который распознается утвержденным биопрепаратом моноклонального антитела.

19. Некомпетентный репликативный рекомбинантный ретровирус по п. 11, отличающийся тем, что полипептид рецептора цитокина содержит внутриклеточный сигнальный домен рецептора IL-7, внутриклеточный сигнальный домен рецептора IL-12, внутриклеточный сигнальный домен рецептора IL-15 или внутриклеточный сигнальный домен рецептора IL-21.

20. Некомпетентный репликативный рекомбинантный ретровирус по п. 11, отличающийся тем, что лимфопротролиферативный элемент является конститутивно активным.

21. Некомпетентный репликативный рекомбинантный ретровирус по п. 20, отличающийся тем, что конститутивно активный лимфопротролиферативный элемент представляет собой мутант IL-7R α .

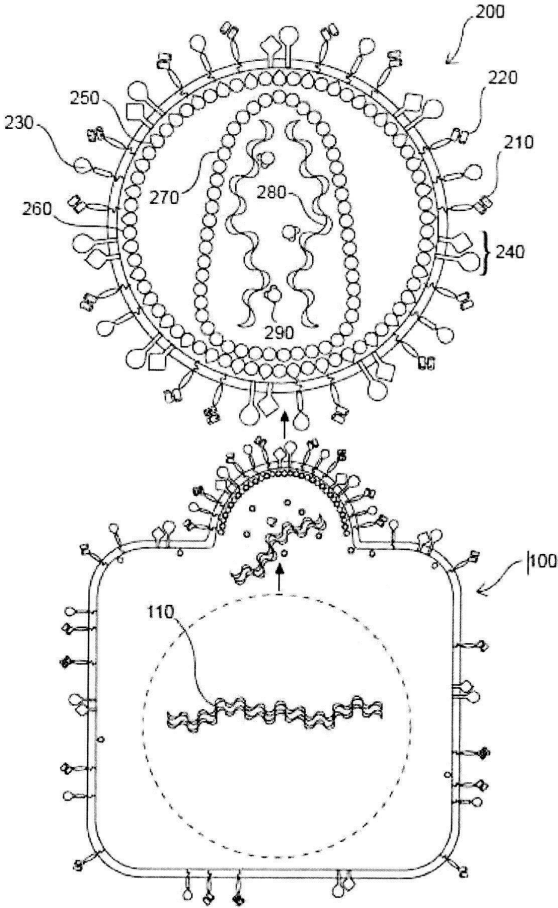
22. Некомпетентный репликативный рекомбинантный ретровирус по п. 11, отличающийся тем, что второй сконструированный сигнальный полипептид кодируется в обратной ориентации в отношении элемента упаковки ретровирусной цис-действующей РНК некомпетентного репликативного рекомбинантного ретровируса в геноме рекомбинантного ретровируса.

23. Некомпетентный репликативный рекомбинантный ретровирус по п. 11, отличающийся тем, что некомпетентный репликативный рекомбинантный ретровирус дополнительно содержит мембраносвязанный цитокин на поверхности рекомбинантного ретровируса, причем мембраносвязанный цитокин содержит слитый полипептид IL-7 и DAF, и при этом слитый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:107.

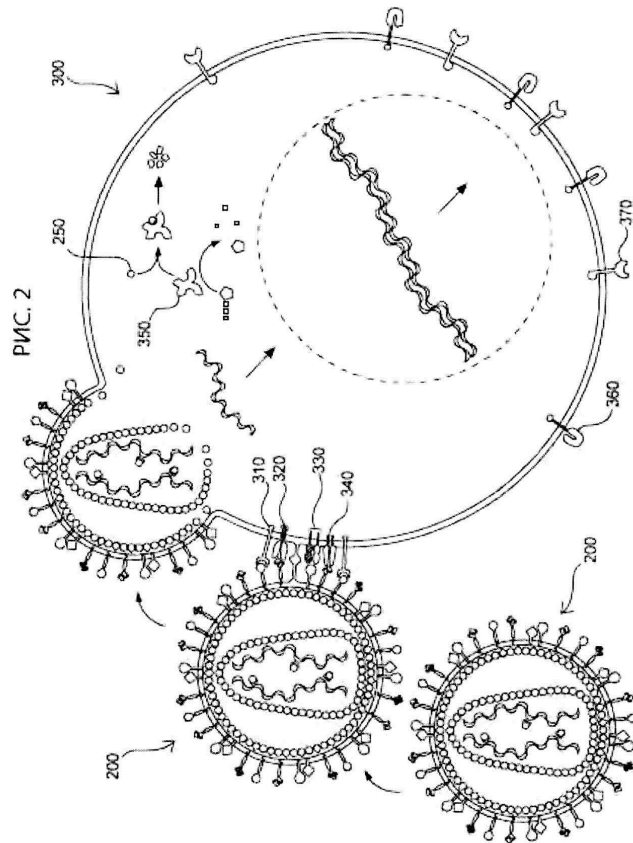
1

1/24

РИС. 1



2



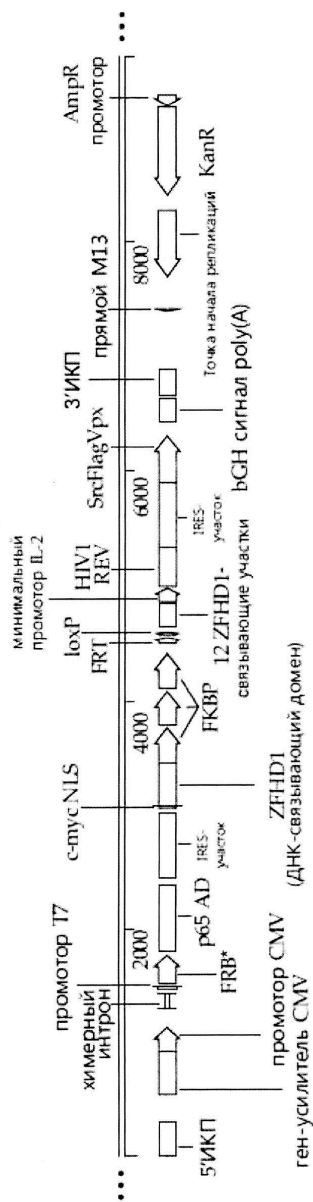


РИС. 3А

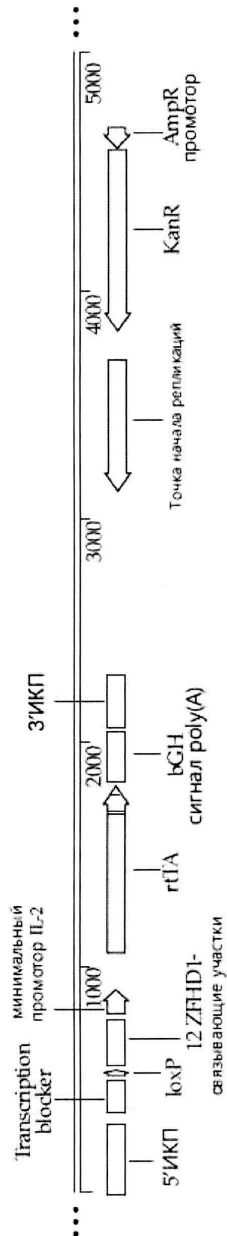
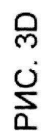
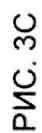


РИС. 3В



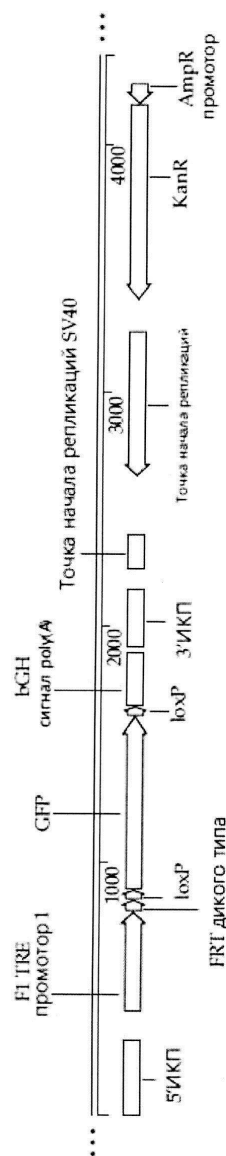
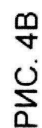
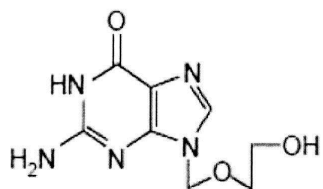


РИС. 3Е



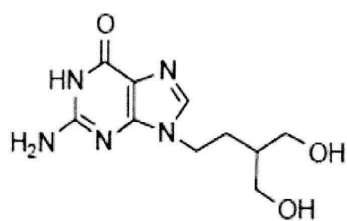


8/24



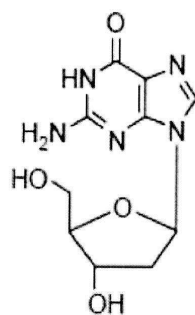
Ацикловир

РИС. 5А



Пенцикловир

РИС. 5В



2'-дезоксигуанозин

РИС. 5С

9/24

aaaaaataaaaacaatagcaaatattaagattttaagaataaaaaattaatatlaattacaactgaatataaaagaactta
tacagggtagcataaagggtactgaccccgcttcaaacctattggagactataagtgaaaaaccactcttfaattatta
 aagttctttttatgtccaaaagacaagaagaactttttatttagttgaatttataataagagaaaaagaaaggatattatATGGC
 AAAAAIAAAAAACCAAIATACAACGAGTCTGTTTCGCCAATIGAAIAIGCGCAACAAGGATTIA
 AAGGAAAAATGCGTTTCAGTAACTGAAACGTAGTAAATGATGAAAAAGATTIAGAGGTATGAAAI
 AGAATTACACAAAACTTCTGATTGCCTGAAAAAAITCCAGTTTCAAATGAI'TTAACTTCAJGAAGA
 ACTTTGACACCAGAATGACAAGAAITAAITACAAGAACTTTACAGGATTAACATTGTTAGATACA
 ATTCAAGCTACTGTTGGTGATGTGGCTCAAGTTCCTAACTCATTAACAGCATGAACAAGTAATT
 TACACAAAACTTTGCAITTAJGGTTGCAGTTCACGCTAGATCATATGGTTCAATCTTTTCAACTTIAI
 GTTCAAGTGAACAAATTGAAGAGGCTCATGAATGAGTTATCAATACAGAAACATTACAAGAAAGA
 GCTAAAGCATTAATTCCTTATTATGTGAATGATGACCTTTAAAGTCAAAAGTTGCAGCTGCTTTA
 ATGCCAGGCTTCTTATTATATGGAGGCTTCTATTTACC'ATTTTACCTATCAGCTAGAGGTAAATTACC
 AAACACTTTCAGATATTATTAGATTAATATTAAGAGATAAAGTTATACATAACTACTATAGTGGTTATA
 AAIATCAAAAAGAAAGTTGCTAAAC'TTCTCCAGAAAAACAAGCTGAAATGAAAGAAITTTGTT'TT
 AAATTATTATATGAATTAATAGATTTAGAAAAAGCTEATTTGAAAGAATTGTATGAGGATTTTGGATT
 AGCTGATGATGCTATTAGATTAGTTAGTTTACAAACGCAGGTAAATTTTACAAAATTTAGGTTATGAT
 TCACCGTTTACAGAAGAAGAAACAAGAATGAGCCAGAAATATTACACAATTATCAGCTAGAGG
 TGATGAAAACCATGATTCTTTTCAGGGAATGGCTCATCATATATTATGGGAGTTTCAGAAGAAAC
 TGAAGATGACGATTGGGAGTTTtaa (ПОСЛ. №: 236)

РИС. 6

10/24

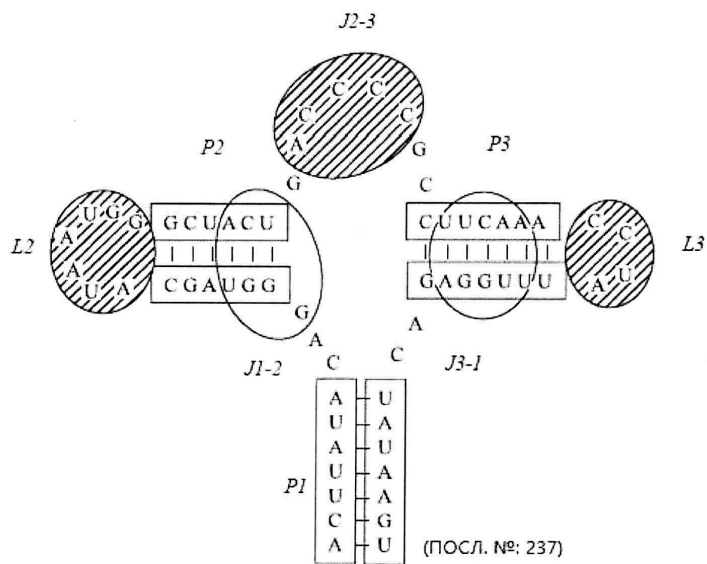


РИС. 7

ACUUAUACA GGU AGCAUAAUGGGCU ACU GACCCGCGC JUC AAACCUAUUU GG SACUAUAAGU
J1-2 L2 J2-3 L3 J3-1
(ПОСЛ. №: 237)

РИС. 8А

ACUUAUACA NNNN AGCAUAAUGGGCU NNN GNNNNNNNNN GCC NNNNAAACCUAUUU NNN GACUAUAAGU
J1-2 L2 J2-3 L3 J3-1
(ПОСЛ. №: 238)

РИС. 8В

РИС. 9

Олигобиблиотека для тестирования

CGCGGACACTTATAGTCNNAATAGGTTNNNGGNNNNNNNNNNNNAGCCCATTAATGCTNNNTGTATAAGTGCCGCC
(ПОСЛ. №: 239)

промотор праймера для амплификации

TAAATAGGACACACTTATAGGCGGCACCTTATACA (ПОСЛ. №: 240)

Обратный праймер для амплификации

CGCGGACACTTATAGTC (ПОСЛ. №: 241)

13/24

tcaaaagcctggcggcgcggtcgtcagactcttttatatcgaatcccttgaaatacgaatgatataaaaaaac
 aaaattaaagttcgggaatttttttccagcctatgcaagagattagaatcttgatataatttattacaataataatagg
aaacactcatataatcgcgtggatatggcagccaagtctaccgggcaccgttaaatgtccgactatgggtg
 agcaalggaaaccgcacgtglacgggttttttgatatacagcattgcttctttatltgagcgggcaatgctttttta
 ttctcataacggaggtagacaggatggaaagcactgaaacggaaaaatagaggaaagaaggcgtc
 gtattatctgatacaggtattgaaagtggattcttttttgaatcaccaaatgatccgctg
 cttatgcagagaaattggatgaatttgctgcttaggtttgcaaaaagacggattattacca
 aattgtgacaatcgaatcatcaggtatcgctccccgctgtaattgacgggcttgaagctg
 ggtgtgccagttgtcttcgagagaaagcataaatcgtaaacactcacccgacaacttgc
 tgacagcgctctgtttatctctttacgaagcaaacagaaagccaaatcgagtgctggtg
 gacccacctgtcggatcaggatcatgtgctgattatcgatgattttttggcaaatggac
 aggcagcgcacgggcttggtgtcgaattgtgaagcaagcgggagcttctattgctgggaa
 tccgcattgtttattgaaaagtcatttcagccgggaagagatgaaacttgtaaaaactggg
 ctaccgagtggaatctttggcaagaattcagtcctttagaagaaaggaaaaagtgctcttc
 gtacaggaggttcattcatga (ПОСЛ. №: 242)

РИС. 10

14/24

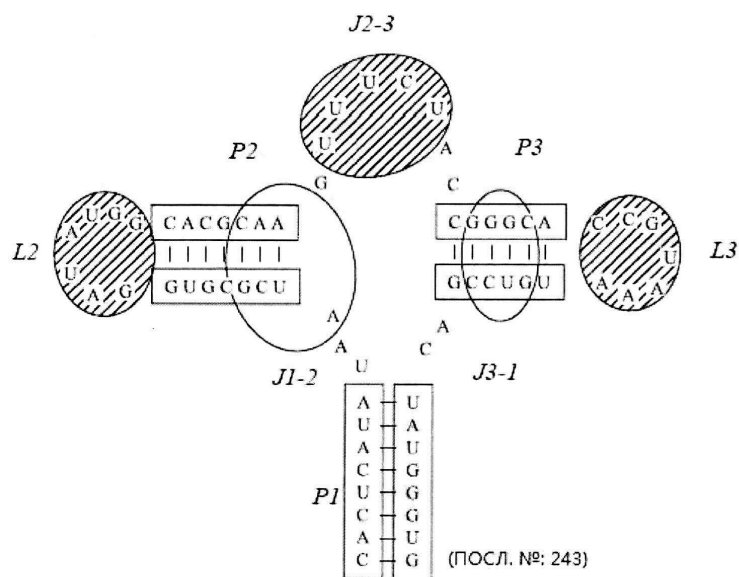


РИС. 11

(ПОСЛ. №243)

РМС. 12А

(ПОСЛ. №:244)

РМС. 12В

РИС. 13

Олигобиблиотека для тестирования

CGCGGACCAACCCATAGTCNNNCATTTACGGTGNNGGTNNNNNNNNNNNNNNCGTGCCATATCCACG
NNNTATATGAGTGCGCGCC (Посл. №: 245)

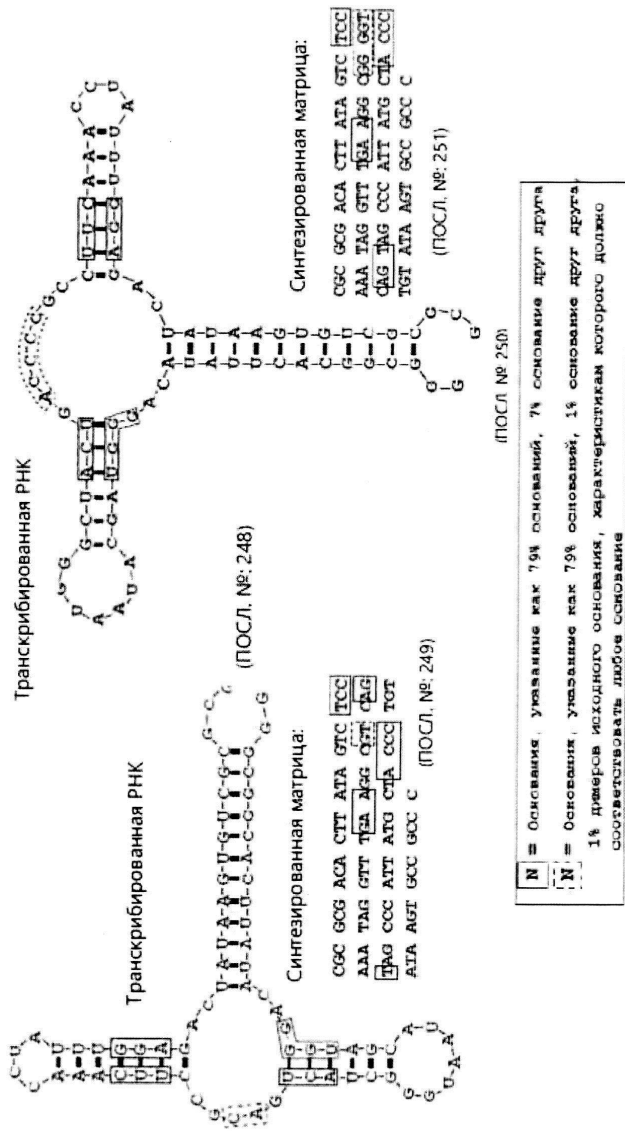
промотор-праймер для амплификации

TAATACGACTCACTATAGGGGCGGCCACTCATATA (Посл. №: 246)

Обратный праймер для амплификации

CGCGGACCAACCCATAGTC (Посл. №: 247)

РИС. 14



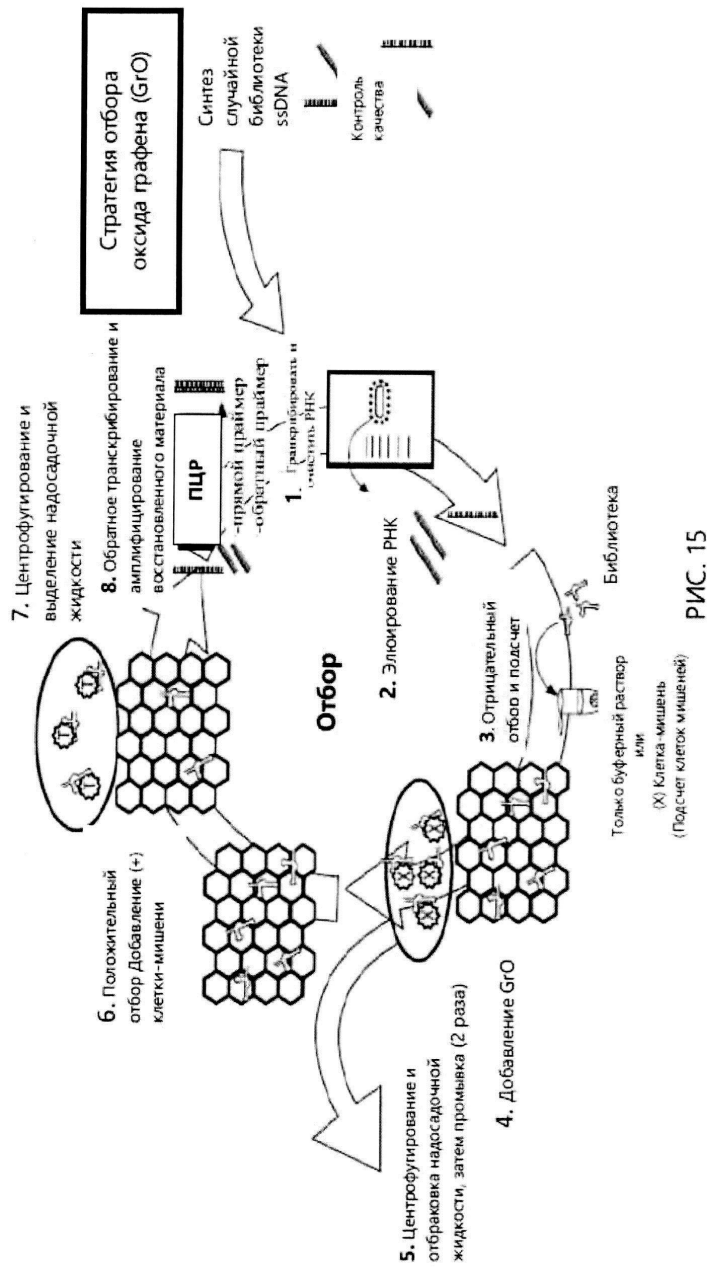


РИС. 15

19/24

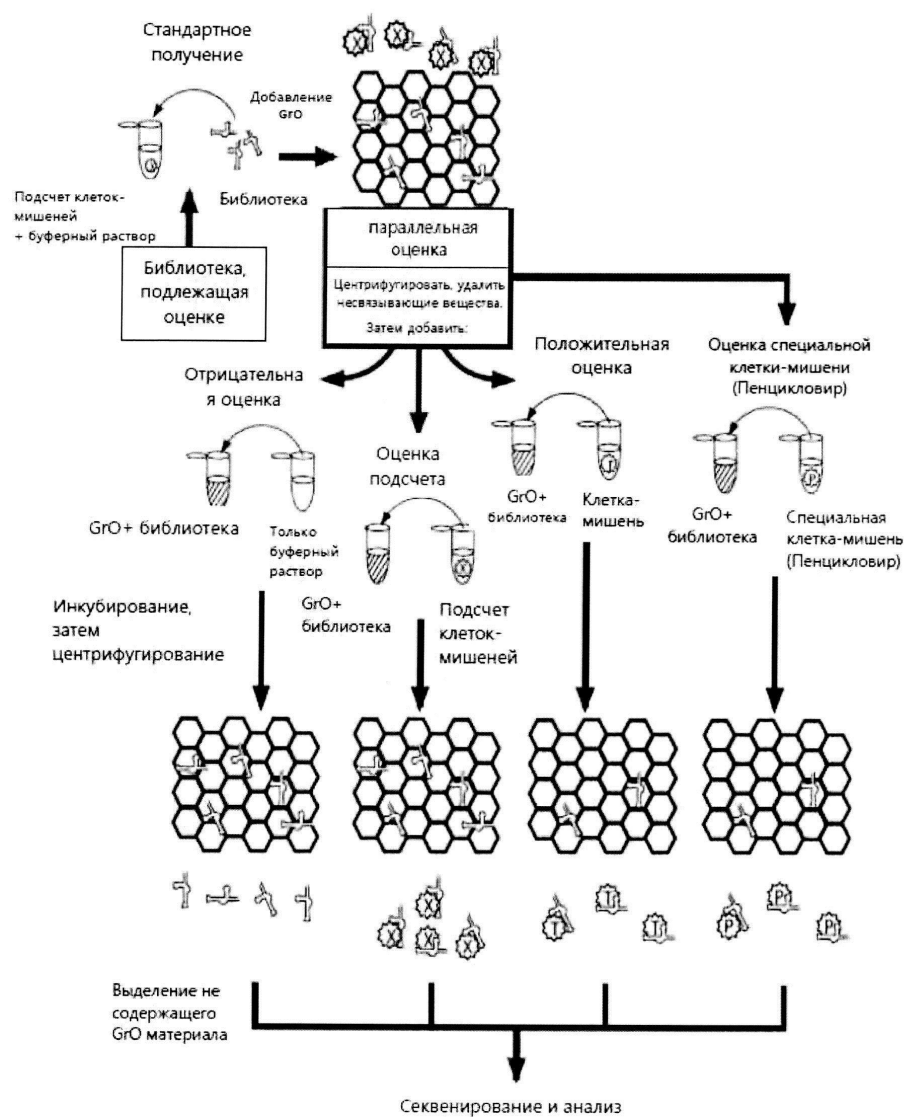


РИС. 16

PIA-795	PIA-596	PIA-935	PIA-346	PIA-941	PIA-769	PIA-382
$\Delta G = -23,30$ ккал/моль Последовательность (5'→3')	$\Delta G = -25,50$ ккал/моль Последовательность (5'→3')	$\Delta G = -25,40$ ккал/моль Последовательность (5'→3')	$\Delta G = -25,10$ ккал/моль Последовательность (5'→3')	$\Delta G = -27,40$ ккал/моль Последовательность (5'→3')	$\Delta G = -23,70$ ккал/моль Последовательность (5'→3')	$\Delta G = -23,11$ ккал/моль Последовательность (5'→3')
GAG CGG CAC UUA UAC AUC GAA GCA UAA UGG CUA CUG ACG CCC UCA AAC CCU AUU UAC AGA CUA UAA GUG UCG CGC G	GAG CGG CAC UUA UAC AGG GUA GCA UAA UGG CUA ASG ACG CCC UCA AAC CUA UCA AGA CUA UAA GUG UCG CGC G	GAG CGG CAC UUA UAC AGG GUA GCA UAA UGG CUA AGU UAG CGC CUU CAC CUA UUU GUA GAC UAU AAG UGU CGC GCG	GAG CGG CAC UUA UAC AGG GUA GCA UAA UGG CUA GCA UAC SCC GCA GAC SCC GGC AAA CCU AUU UAC AGA CUA UAA GUG UCG CGC G	GAG CGG CAC UUA UAC AGG GUA GCA UAA UGG CUA ACU GCG CCC GGC GAC CUA UUU GAG ACU AUA AGU GUC CGG CG	GAG CGG CAC UUA UAC AGG GUA GCA UAA UGG CUA AGU GCG CCU UCA AAC CUA UUU AGA GAC UAU UAG UGU CGC CGC G	GAG CGG CAC UUA UAC AGG GUA GCA UAA UGG CUA CGG ACG CGG UGC AAA CCU AUU UAC AGA CUA UAA GUG UCG CGC G
ПОСЛ. №: 87	ПОСЛ. №: 88	ПОСЛ. №: 89	ПОСЛ. №: 90	ПОСЛ. №: 91	ПОСЛ. №: 92	ПОСЛ. №: 93

РИС. 17

FIP-584	FIP-710	FIP-923	FIP-991	FIP-437	FIP-719	FIP-932
$\Delta G = -24,10$ ккал/моль Последовательность (5'→3')	$\Delta G = -28,90$ ккал/моль Последовательность (5'→3')	$\Delta G = -23,00$ ккал/моль Последовательность (5'→3')	$\Delta G = -25,00$ ккал/моль Последовательность (5'→3')	$\Delta G = -23,70$ ккал/моль Последовательность (5'→3')	$\Delta G = -25,00$ ккал/моль Последовательность (5'→3')	$\Delta G = -27,70$ ккал/моль Последовательность (5'→3')
GGG CGG CAC UUA UAC AGG GGA GCA UAA UGG GCU ACU GAC GGC CUU AAA CCU AUU UAA GGA CUA UAA GUG UCG CGC G	GGG CGG CAC UUA UAC AUG GAA GCA UAA UGG GCU GCC GAC GGC CCU UAA CCU UUG GAG ACU AUA AGU GUC GCG CG	GGG CGG CAC UUA UAC AGA UUA GCA UAA UGG GCU ACU GAC CGC GCC GAC AAA CCU AUU UCA AGA CUA UAA GUG UGG CGC G	GGG CGG CAC UUA UAC AGU GUA GCA UAA UGG GCU ACU GUC GCA UCA AAU CUA UUU GGA GAC UAU AAU UGU CGC GCG	GGG CGG CAC UUA UAC AGU GAA GCA UAA UGG GCU ACU GAC ACC CUU AAA CCU AUU GCG AGA CUA UAA GUG UCG CGC G	GGG CGG CAC UUA UAC AGA GGA GCA UAA UGG GCU ACA GAC GGC GUC AAA CCU AUU UAC GGA CUA UAA GUG UCG CGC G	GGG CGG CAC UUA UAC AGG GUG CAU AAU GGG CUU GUG AGG CCU UCA AAC CUA UUU GUA GAC UAU AAU UGU CGC GCG

ПОСЛ. №: 94 ПОСЛ. №: 95 ПОСЛ. №: 96 ПОСЛ. №: 97 ПОСЛ. №: 98 ПОСЛ. №: 99 ПОСЛ. №: 100

РИС. 18

22/24

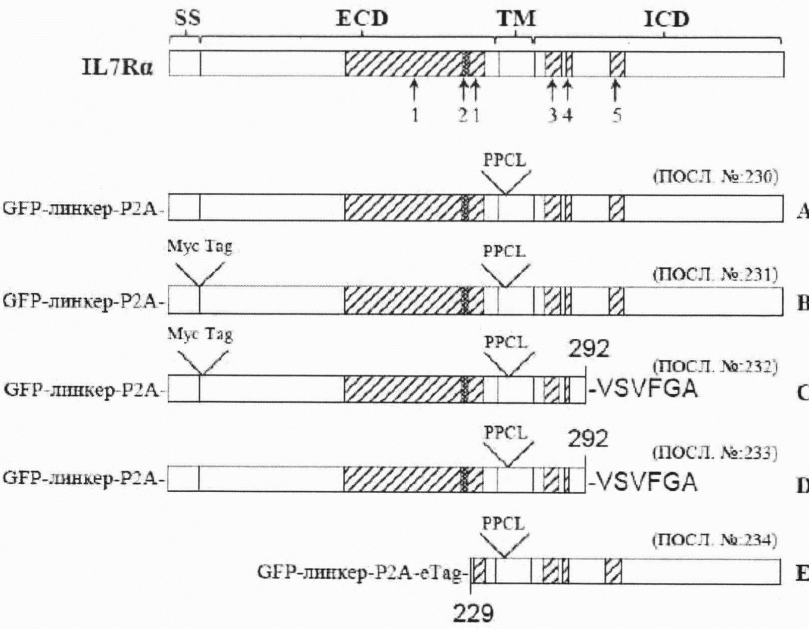


РИС. 19А

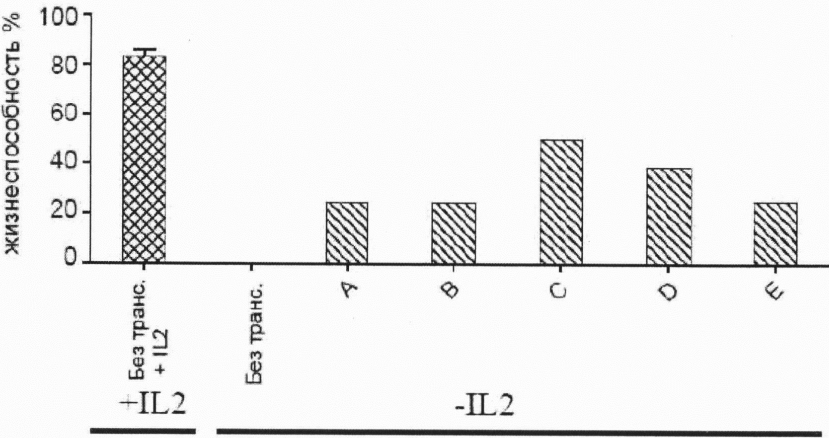


РИС. 19В

23/24

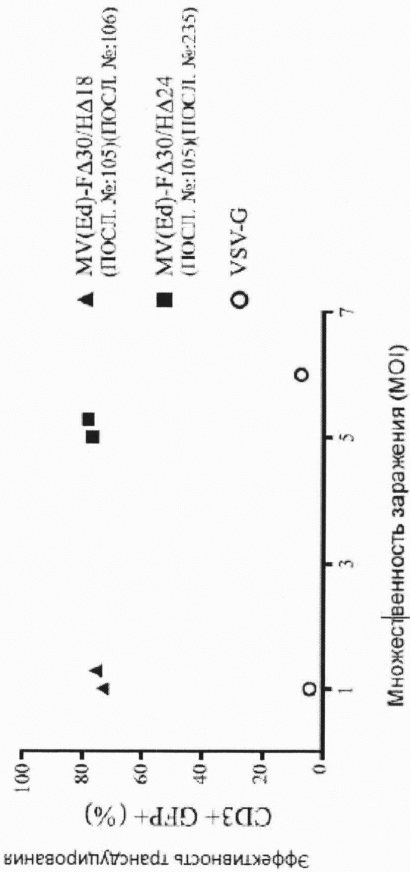


РИС. 20

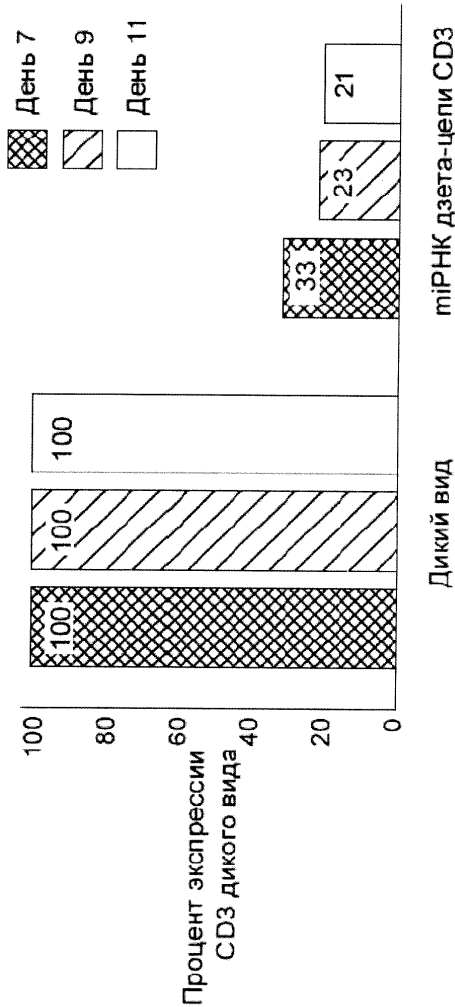


РИС. 21