

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045791**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.27

(21) Номер заявки
202191414

(22) Дата подачи заявки
2019.11.18

(51) Int. Cl. **C07K 14/725** (2006.01)
C07K 14/525 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)

(54) СУИЦИДНЫЙ ГЕН

(31) **62/769,405; 62/773,372; 62/791,464**

(32) **2018.11.19; 2018.11.30; 2019.01.11**

(33) **US**

(43) **2021.08.05**

(86) **PCT/US2019/062009**

(87) **WO 2020/106619 2020.05.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БОРД ОФ РИДЖЕНТС, ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕХАС
СИСТЕМ (US)**

(72) Изобретатель:
Резвани Кэйти, Шполл Элизабет (US)

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

(56) PEREZ C. ET AL.: "A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact", CELL, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 63, no. 2, 19 October 1990 (1990-10-19), pages 251-258, XP023884239, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/0092-8674(90)90158-B [retrieved on 1990-10-19], Abstract; page 254, column 2, last paragraph - page 255, column 1, paragraph 2; figure 2; tables 1, 2

WO-A1-2016054522
BIANCA SANTOMASSO ET AL.: "The Other Side of CAR T-Cell Therapy: Cytokine Release Syndrome, Neurologic Toxicity, and Financial Burden", 17 May 2019 (2019-05-17), XP055665075, DOI: 10.1200/EDBK, Retrieved from the Internet: URL: https://ascopubs.org/doi/pdf/10.1200/EDBK_238691 [retrieved on 2020-02-04], the whole document

(57) Варианты осуществления настоящего изобретения охватывают определенные мутанты TNF-альфа, которые не секретируются и связаны с мембраной, тем самым обеспечивая мишень для ингибирования в клетках, которые экспрессируют мутанты. В конкретных вариантах осуществления мутанты TNF-альфа используются в качестве суицидного гена в клетках, используемых для адаптивной клеточной терапии у индивидуума, где в желаемое время индивидууму вводят одно или несколько антител против TNF-альфа, которые связывают мембраносвязанный TNF-альфа и вызывают комплементзависимую цитотоксичность в клетках. Мутантный TNF-альфа также можно использовать как способ отслеживания трансдуцированных клеток in vivo.

B1

045791

045791 B1

По заявке на данное изобретение испрашивается приоритет временной заявки на патент США № 62/769405, поданной 19 ноября 2018 г.; временной заявки на патент США № 62/773372, поданной 30 ноября 2018 г.; и временной заявки на патент США № 62/791464, поданной 11 января 2019 г., причем все эти заявки полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Списки последовательностей

Заявке на данное изобретение содержит список последовательностей, который был подан электронным способом в формате ASCII и полностью включен в настоящее описание путем ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 13 ноября 2019 г., имеет название UTFC_P1151WO_SL.txt и размер 108 байт.

Область техники, к которой относится изобретение

Варианты осуществления изобретения относятся по меньшей мере к области клеточной биологии, молекулярной биологии, иммунологии, клеточной терапии и медицины.

Уровень техники

Адаптивная клеточная терапия с использованием Т-клеток, трансдуцированных сконструированными химерными антигенными (CAR) и Т-клеточными (TCR) рецепторами, сопровождается публикациями о тяжелых побочных эффектах, таких как синдром высвобождения цитокинов и нейротоксичность, а также внеопухолевая токсичность. Поскольку число пациентов, которые получают лечение адаптивной клеточной терапией, растет со временем, то внедрение механизма безопасности для обеспечения селективной делеции адаптивно инфузированных клеток является полезным в отношении токсичности.

Настоящее раскрытие относится к решению давней потребности в механизмах безопасности для клеточной терапии.

Сущность изобретения

Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к системам, способам и композициям, связанным с клеточной терапией, включая механизмы безопасности для управления клеточной терапией. В конкретных вариантах осуществления уникальный суицидный ген используют в сочетании с клеточной терапией любого типа для контроля ее применения и предоставления возможности контролируемого прекращения клеточной терапии при достижении желаемого результата и/или по истечении желательного времени. Суицидный ген применяют в трансдуцированных клетках для того, чтобы вызвать гибель трансдуцированных клеток при необходимости. В конкретных вариантах осуществления суицидный/истошающий ген представляет собой мутант фактора некроза опухоли (TNF)-альфа, который не расщепляется стандартными ферментами, которые расщепляют TNF в природе, такими как TNF-альфа-конвертирующий фермент (также называемый TACE). По существу, в конкретных вариантах осуществления мутант TNF-альфа является мембраносвязанным, неактивным и несекретируемым. Мутант TNF-альфа по настоящему изобретению является мишенью одного или более агентов, которые связываются с мутантом, включая по меньшей мере антитело, так что после связывания агента (агентов) с мутантом TNF-альфа на поверхности клетки, клетка умирает. Варианты осуществления изобретения позволяют использовать мутант TNF-альфа в качестве маркера для клеток, которые экспрессируют его.

Варианты осуществления настоящего изобретения включают композиции, содержащие трансдуцированную клетку, содержащую нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или более сконструированных несекретируемых мутантных полипептидов фактора некроза опухоли (TNF)-альфа, и нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или более продуктов терапевтических генов. В конкретных вариантах осуществления мутантный полипептид TNF-альфа содержит делецию относительно SEQ ID NO: 8 следующих аминокислот: аминокислотного остатка 1 и аминокислотного остатка 12; аминокислотного остатка 1 и аминокислотного остатка 13; аминокислотных остатков 1-12; аминокислотных остатков 1-13; или аминокислотных остатков 1-14. Продукт терапевтического гена композиции может представлять собой или нет сконструированный рецептор, такой как Т-клеточный рецептор, химерный антигенный рецептор (CAR), цитокиновый рецептор, хоминговый рецептор или хемокиновый рецептор. Любой из сконструированных рецепторов может иметь своей мишенью или нет антиген, такой как раковый антиген. Когда сконструированным рецептором является CAR, CAR может содержать или не содержать один или более костимуляторных доменов, таких как CD28, DAP12 или оба эти домена.

В конкретных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, которая кодирует мутантный полипептид TNF-альфа, и нуклеиновая кислота, которая кодирует продукт терапевтического гена, являются одной и той же молекулой нуклеиновой кислоты, хотя нуклеиновая кислота, которая кодирует мутантный полипептид TNF-альфа, и нуклеиновая кислота, которая кодирует продукт терапевтического гена, могут являться различными молекулами нуклеиновых кислот. В любом случае молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой вектор, включая вирусный вектор (ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор или аденоассоциированный вирусный вектор) или невирусный вектор, такой как плаزمид, липид, транспозон или их комбинация.

Трансдуцированные клетки композиции по настоящему изобретению могут представлять собой, например, иммунную клетку или стволовую клетку. Примеры иммунных клеток включают Т-клетку, NK-клетку, NKT-клетку, iNKT-клетку, В-клетку, регуляторную Т-клетку, моноцит, макрофаг, дендритную клетку или мезенхимальную стромальную клетку. Клетка может экспрессировать или нет один или

более экзогенно предложенных цитокинов, таких как IL-15, IL-12, IL-18, IL-21 или их комбинация. Цитокин может кодироваться или нет тем же самым вектором, что и ген мутантного TNF-альфа. В отдельных случаях цитокин экспрессируется в виде отдельной полипептидной молекулы в качестве мутанта TNF-альфа и в качестве сконструированного клеточного рецептора.

В конкретных вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид TNF-альфа содержит SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 39. Мутантный полипептид TNF-альфа может кодироваться последовательностью, которая содержит SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 38. В некоторых аспектах у мутантного полипептида TNF-альфа отсутствует одна или более дополнительных мутаций, которые предотвращают связывание мутантного полипептида TNF-альфа с рецептором TNF.

Варианты осуществления настоящего изобретения включают способы индукции гибели трансдуцированной клетки, экспрессирующей по меньшей мере сконструированный несекретируемый мутантный полипептид TNF-альфа и, необязательно, экспрессирующей терапевтический ген, такой как сконструированный рецептор, причем способы включают стадию получения эффективного количества по меньшей мере одного агента, который связывает мутант TNF-альфа в трансдуцированной клетке. Агентом, который связывает TNF-альфа, может являться, например, антитело, низкомолекулярное соединение, полипептид, нуклеиновая кислота или их комбинация. Когда агентом является антитело, оно может быть любого типа, включая по меньшей мере моноклональное антитело. В этих способах клетка может дополнительно экспрессировать сконструированный рецептор, включая T-клеточный рецептор, химерный антигенный рецептор (CAR), цитокиновый рецептор, хоминговый рецептор или хемокиновый рецептор. Любой из сконструированных рецепторов может связывать раковый или другой антиген. В конкретных случаях способ осуществляется *in vivo* у индивидуума, имеющего заболевание, и когда индивидуум получает курс терапии от заболевания, который включает в себя множество трансдуцированных клеток. Хотя заболевание может быть любого типа, в конкретных случаях заболевание представляет собой рак. Агент может вводиться индивидууму при начале одного или более побочных эффектов терапии, или когда ожидается побочный эффект. У индивидуума может наблюдаться один или более симптомов синдрома высвобождения цитокинов, нейротоксичности, анафилаксии/аллергии и/или внеопухолевой токсичности. В некоторых случаях индивидуум получал, получает и/или будет получать дополнительную терапию своего заболевания. В конкретных аспектах настоящего изобретения мутантный полипептид TNF-альфа не содержит или содержит одну или несколько дополнительных мутаций, предотвращающих связывание мутантного полипептида TNF-альфа с TNF-рецептором или предотвращающих обратную сигнализацию.

Варианты осуществления настоящего изобретения включают способы снижения эффектов синдрома высвобождения цитокинов у индивидуума, который получил и/или который получает клеточную терапию клетками, которые экспрессируют несекретируемый мутант TNF-альфа, включающие в себя стадию введения эффективного количества одного или более агентов, которые связываются с мутантом, чтобы вызвать у индивидуума (а) удаление по меньшей мере некоторых из клеток клеточной терапии и (б) снижение уровня растворимого TNF-альфа.

Варианты осуществления настоящего изобретения включают способы снижения риска токсичности клеточной терапии для индивидуума, включающие в себя стадию модификации клеток клеточной терапии для экспрессии несекретируемого мутанта TNF-альфа. Клеточная терапия может быть направлена, например, на рак. Клеточная терапия может содержать сконструированный рецептор, мишенью которого является антиген.

Конкретные варианты включают векторы, содержащие последовательность, которая кодирует несекретируемый мутант TNF-альфа и которая кодирует сконструированный рецептор. Несекретируемый мутант TNF-альфа и сконструированный рецептор могут быть закодированы или нет в векторе в виде отдельных полипептидов. В отдельных случаях последовательность вектора, который кодирует несекретируемый мутант TNF-альфа, и последовательность вектора, который кодирует сконструированный рецептор, отделяют на векторе с помощью элемента 2A или элемента IRES. Этот вектор может дополнительно кодировать цитокин, такой как IL-15, IL-12, IL-18, IL-2, IL-7 или IL-21. Цитокин может экспрессироваться с вектора в виде отдельного полипептида в качестве мутанта TNF-альфа и сконструированного рецептора.

Варианты осуществления настоящего изобретения включают химические вещества, включающие последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16.

Специально предусмотрено, что любое ограничение, описанное в отношении одного варианта осуществления изобретения, может применяться к любому другому варианту осуществления изобретения. Кроме того, любая композиция изобретения может быть использована в любом способе изобретения, и любой способ изобретения может использоваться для получения или для использования любой композиции изобретения. Аспекты варианта осуществления, изложенные в примерах, также являются вариантами осуществления, которые могут быть реализованы в контексте вариантов осуществления, описанных в другом месте в другом примере или в другом месте документа, например в разделах "Краткое описание", "Подробное описание", "Формула изобретения" и "Краткое описание чертежей".

Вышеизложенное довольно широко очерчивает признаки и технические преимущества настоящего

изобретения для лучшего понимания подробного описания, следующего ниже. Далее будут описаны дополнительные признаки и преимущества, которые образуют предмет формулы изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что раскрытые концепция и конкретные варианты осуществления могут быть легко использованы в качестве основы для модификации или проектирования других структур для выполнения тех же целей, что и настоящие конструкции. Специалистам в данной области также должно быть понятно, что такие эквивалентные конструкции не выходят за рамки сущности и объема, изложенных в прилагаемой формуле изобретения. Новые признаки, которые, как полагают, являются характерными для конструкций, раскрытых в настоящем изобретении, как в отношении организации, так и способа выполнения, вместе с другими целями и преимуществами, будут лучше понятны из последующего описания, рассматриваемого совместно с прилагаемыми чертежами. Однако следует четко понимать, что каждый из чертежей приведен только для целей иллюстрации и описания и не предназначен для определения пределов настоящего изобретения.

Краткое описание чертежей

Для более полного понимания настоящего изобретения далее дается ссылка на последующее описание вместе с прилагаемыми чертежами.

Фиг. 1 представляет собой один пример экспериментального плана мутагенеза TNF-альфа для того, чтобы удалить мембранные сайты расщепления. Перес с сотр. (Perez et al. (1990)) опубликовали, что делеция валина в положении 1 и пролина в положении 12 внеклеточного участка TNF-альфа приводит к биологически активному, но нерасщепляемому TNF-альфа. Подчеркнутые нуклеотиды в левой панели показывают удаленные нуклеотиды во время мутагенеза, соответствующие положениям 229-279 нуклеотидной последовательности. Праймер дикого типа TCGAGAAGATCTGACTGCCTGGGCCAGAGG представляет собой SEQ ID NO: 42, мутантный праймер, Del VAL1, TCG AGA AGA TGA TCT TGC CTG GGC CAG AGG-3 представляет собой SEQ ID NO: 43, и олигонуклеотид CP496 TGA TCT TGC CTG представляет собой SEQ ID NO: 44. Праймер дикого типа TAC AAC ATG GGC TACAGGCTTGCTCACTCGGGGT представляет собой SEQ ID NO: 45, мутантный праймер Del PRO 12 TAC AAC ATG GGC TAC CTT GTC ACT CGG GGT представляет собой SEQ ID NO: 46, и олигонуклеотид CP498 GGC TAC CTT GTC представляет собой SEQ ID NO: 47. Последовательность из Perez et al. (1990) CAGGCAGTCAGATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAGCCTGTAGCC представляет собой SEQ ID NO: 48, и последовательность QAVRSSSRTPSDKPPVA представляет собой SEQ ID NO: 49.

Фиг. 2A иллюстрирует один пример вектора, который отдельно кодирует мутант TNF-альфа (delVal1 и delPro12) и пример CD19-специфичного химерного антигена (CAR) (левая панель). Правая панель иллюстрирует пример конфигурации вектора, в которой мутантный TNF-альфа кодируется как отдельный полипептид как от молекулы CAR, так и от цитокина.

Фиг. 2B иллюстрирует один пример вектора, который отдельно кодирует мутант TNF-альфа (delVal13), пример CAR и цитокина.

Фиг. 2C иллюстрирует один пример вектора, который отдельно кодирует мутант TNF-альфа (delVal1 и delVal13) и пример CAR.

Фиг. 2D иллюстрирует один пример вектора, который отдельно кодирует мутант TNF-альфа (где удалены 13 ак от Val1 до Val13) и пример CAR.

Фиг. 2E иллюстрирует один пример вектора, который отдельно кодирует мутант TNF-альфа (delAla-1-delVal13, где удалены 14 ак, от Ala-1 до Val13) и пример CAR.

На фиг. 3 показано, что NK-клетки, трансдуцированные вектором, имеющим конструкцию, отдельно кодирующую как мутант TNF-альфа, так и CAR, экспрессируют как CAR, так и TNF-альфа на своей поверхности.

Фиг. 4A иллюстрирует примеры ингибиторов TNF-альфа.

На фиг. 4B показано, что NK-клетки, трансдуцированные вектором, имеющим конструкцию, отдельно кодирующую как мутант TNF-альфа, так и CAR, являются мишенью антагонистов TNF-альфа и элиминируются за счет комплементзависимой цитотоксичности (CDC). Более 70% NK-клеток, экспрессирующих мутантный TNF-альфа, элиминируются путем CDC в течение 90 мин после добавления инфликсимаба.

На фиг. 5A показано, что NK-клетки, трансдуцированные вектором, имеющим конструкцию, отдельно кодирующую как мутант TNF-альфа, так и CAR, продуцируют больше эффекторных цитокинов и дегранулируются более эффективно, чем клетки CAR19-NK в ответ на мишени Raji.

На фиг. 5B показано, что NK-клетки, трансдуцированные вектором, имеющим конструкцию, отдельно кодирующую как мутант TNF-альфа, так и конструкцию CAR, эффективно убивают клетки-мишени, Raji.

На фиг. 6 показано, что NK-клетки, трансдуцированные вектором, который отдельно экспрессирует CD19-специфичный CAR и мутант TNF-альфа, не проявляют неспецифичной активности.

На фиг. 7 показано, что NK-клетки, трансдуцированные вектором, который отдельно экспрессирует CD19-специфичный CAR и мутант TNF-альфа, не проявляют неспецифичной активности и не секретируют TNF-альфа неспецифично.

На фиг. 8 показано, что рецепторные сайты связывания TNF-альфа для TNF-рецепторов 1 и 2 отно-

сительно антител к TNF-альфа, инфликсимаба и адалимумаба, отличаются. Последовательность на фигуре представляет собой SEQ ID NO: 50.

На фиг. 9 представлена структура TNF-альфа с указанными доменами. Последовательности на фигуре представляют собой SEQ ID NO 17, 54-59, 51, 18 и 18-21 соответственно, в порядке появления.

Фиг. 10 иллюстрирует мутацию TNF-альфа, которая объединяет мутацию в консенсусной последовательности казеинкиназы I (CKI) в цитоплазматическом домене (подчеркнуто) с делецией Ala-3 и Gln-2 (в дополнение к делеции от Ala-1 до Val13 включительно, которая не показана) в дополнение к шести примерам дополнительных мутаций, которые препятствуют связыванию с TNF-рецептором 1 и TNF-рецептором 2 (такие мутированные последовательности подчеркнуты двойной чертой). Нуклеотидная последовательность на фигуре представляет собой SEQ ID NO: 52, а полипептидная последовательность на фигуре представляет собой SEQ ID NO: 53.

На фиг. 11A, 11B показано, что противоопухолевая активность NK-клеток, трансдуцированных конструкцией TNF-alpha mutant-CAR19-IL15, превосходит активность конструкции iC9-CAR19-IL15.

На фиг. 11A, мыши NSG с опухолью Raji получали 3×10^6 CAR-NK-клеток пуповинной крови, трансдуцированных конструкцией TNF-alpha mut-CAR19-IL15 или конструкцией iC9-CAR19-IL-15.

На фиг. 11B показана выживаемость в процентах во времени.

Подробное описание изобретения

Настоящее описание включает путем ссылки временную заявку на патент США № 60/769414, поданную 19 ноября 2018 г.; временную заявку на патент США № 62/773394, поданную 30 ноября 2018 г.; и временную заявку на патент США № 62/791491, поданную 11 января 2019 г.

В настоящем описании единственное число может означать один или более. В пункте (пунктах) формулы изобретения при использовании совместно со словом "содержащий", слова в единственном числе могут означать один или более. При использовании в настоящем изобретении "другой" может означать по меньшей мере второй или более. В конкретных вариантах осуществления, аспекты изобретения могут, например, "состоять, по существу, из" или "состоять из" одной или более последовательностей по настоящему изобретению. Некоторые варианты осуществления изобретения могут состоять из или состоять по существу из одного или более элементов, стадий способа и/или способов по изобретению. Предполагается, что любой способ или композиция, описанные в настоящем изобретении, могут быть реализованы в отношении любого другого способа или композиции, описанных в настоящем изобретении. Объем настоящей заявки не ограничивается конкретными вариантами осуществления процесса, механизма, изготовления, химического вещества, средств, способов и стадий, описанных в спецификации изобретения. Используемые в настоящем изобретении термины "или" и "и/или" используются для описания нескольких компонентов объединенных или исключающих друг друга. Например, "x, y и/или z" может относиться к только одному "x", только одному "y" и только одному "z" по отдельности, "x, y и z", "(x и y) или z", "x или (y и z)", или "x или y или z". В частности, предполагается, что x, y или z могут быть специально исключены из варианта осуществления.

В настоящем документе термин "примерно" используется в соответствии с его простым и обычным значением в области клеточной и молекулярной биологии, чтобы указать, что значение включает в себя стандартное отклонение ошибки для устройства или способа, используемого для определения значения.

Термин "сконструированный", используемый в настоящем изобретении, относится к объекту, который создается человеком, включая клетку, нуклеиновую кислоту, полипептид, вектор и т.п. По меньшей мере в некоторых случаях сконструированный объект является синтетическим и содержит элементы, которые не присутствуют в природе или сконфигурированы способом, в котором он используется в описании.

В этом описании ссылка на "один вариант осуществления", на "вариант осуществления", "конкретный вариант осуществления", "родственный вариант осуществления", "некоторый вариант осуществления", "дополнительный вариант осуществления" и "еще один вариант осуществления" или их комбинации означают, что конкретный признак, структура или характеристика, описанная в связи с вариантом осуществления, включена по меньшей мере в один вариант осуществления настоящего изобретения. Таким образом, появление вышеуказанных фраз в различных местах в этом описании необязательно относится к одному и тому же варианту осуществления изобретения. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть скомбинированы любым подходящим способом в одном или нескольких вариантах осуществления.

I. Общие варианты осуществления.

Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам и композициям, которые обеспечивают возможность прекращения клеточной терапии. Настоящее изобретение относится как к маркерному элементу, так и к суицидному/истощающему элементу для клеточной терапии на основе нерасщепляемых мутантов 26 кД TNF-альфа. Мутанты TNF-альфа являются нерасщепляемыми, что составляет их мембраносвязанными и несекретируемыми. Клетки, экспрессирующие нерасщепляемые мутанты TNF-альфа, могут являться мишенями для селективного уничтожения, включая, например, применение одобренных FDA в настоящее время для клинического применения антител к TNF- α , таких как

этанерсепт, инфликсимаб или адалилумаб. Мутированный полипептид TNF-альфа может быть совместно экспрессирован с одним или несколькими терапевтическими трансгенами, такими как ген, кодирующий TCR или CAR. Кроме того, экспрессирующие TNF-альфа клетки обладают превосходной активностью против опухолевой мишени, опосредованной биологической активностью связанного с мембраной белка TNF-альфа.

II. Мутанты TNF-альфа.

Настоящее изобретение относится к мутантам TNF-альфа, экспрессия которых в конкретных клетках позволяет мутантному TNF быть мишенью агента, который связывается с мутантом, вызывая тем самым гибель конкретных клеток, несущих TNF-альфа. В конкретных вариантах осуществления мутантные полипептиды TNF-альфа являются нерасщепляемыми и несекретируемыми из-за одной или более мутаций, и такие нерасщепляемые и несекретируемые полипептиды представляют собой мутантный TNF-альфа, который должен быть мембраносвязанным. Связывание связанного с мембраной TNF-альфа в клетке позволяет убить клетку, когда связанный с мембраной TNF-альфа является мишенью агента, который связывает его прямо или непрямо, включая ингибитор. В вариантах осуществления, в которых ингибитор TNF-альфа представляет собой антитело, клетка может погибнуть в результате комплементзависимой цитотоксичности, и в вариантах осуществления, в которых ингибитор TNF-альфа не является антителом, клетка может погибнуть в результате другого механизма, такого как апоптоз.

Поэтому в конкретных вариантах мутанта участок (участки) расщепления на мембране удаляется, тем самым сохраняя экспрессию на поверхности клетки и наделяя клетку способностью становиться мишенью разрушения. Таким образом, данное описание предусматривает мутантный мембраносвязанный TNF-альфа в качестве суицидного гена для селективного уничтожения трансдуцированных клеток.

TNF-альфа имеет трансмембранную форму 26 кД и секретируемый компонент 17 кД. На фиг. 1 (правая панель из Perez et al. (1990)) показаны некоторые мутанты, охваченные изобретением. В конкретных вариантах осуществления примеры мутантов TNF-альфа по настоящему изобретению включают по меньшей мере следующее по отношению к TNF-альфа 17 кД: (1) делецию Val11 и делецию Pro12; (2) делецию Val13; (3) делецию Val11 и делецию Val13; (4) делецию от Val11 до Pro12 включительно и также делецию Val13 (удаление 13 ак); (5) делецию от Ala -3 до Val13 включительно (удаление 16 ак); (6) делецию от Ala-1 до Val13 включительно (удаление 14 ак). В конкретных вариантах осуществления мутант TNF-альфа включает делецию соответствующей аминокислоты в положении -3, -2, -1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или их комбинации.

Конкретные комбинации включают делеции в положениях от -3 до 13 включительно; от -3 до 12 включительно; от -3 до 11 включительно; от -3 до 10 включительно; от -3 до 9 включительно; от -3 до 8 включительно; от -3 до 7 включительно; от -3 до 6 включительно; от -3 до 5 включительно; от -3 до 4 включительно; от -3 до 9 включительно; от -3 до 2 включительно; от -3 до 1 включительно; от -3 до -1 включительно; от -3 до -2 включительно; от -2 до 13 включительно; от -2 до 12 включительно; от -2 до 11 включительно; от -2 до 10 включительно; от -2 до 9 включительно; от -2 до 8 включительно; от -2 до 7 включительно; от -2 до 6 включительно; от -2 до 5 включительно; от -2 до 4 включительно; от -2 до 3 включительно; от -2 до 2 включительно; от -2 до 1 включительно; от -2 до -1 включительно; от -1 до 13 включительно; от -1 до 12 включительно; от -1 до 11 включительно; от -1 до 10 включительно; от -1 до 9 включительно; от -1 до 8 включительно; от -1 до 7 включительно; от -1 до 6 включительно; от -1 до 5 включительно; от -1 до 4 включительно; от -1 до 3 включительно; от -1 до 2 включительно; от -1 до 1 включительно; от 1 до 13 включительно; от 1 до 12 включительно; от 1 до 11 включительно; от 1 до 10 включительно; от 1 до 9 включительно; от 1 до 8 включительно; от 1 до 7 включительно; от 1 до 6 включительно; от 1 до 5 включительно; от 1 до 4 включительно; от 1 до 3 включительно; от 1 до 2 включительно и т.д.

Мутанты TNF-альфа могут быть получены любым подходящим способом, но в конкретных вариантах осуществления они генерируются сайт-направленным мутагенезом. В некоторых случаях мутанты TNF-альфа могут иметь мутации, отличные от делеций, которые делают белок нерасщепляемым. В отдельных случаях мутанты TNF-альфа могут иметь 1, 2, 3 или большее число мутаций, отличных от делеций в Val11, Pro12 и/или в Val13 или в области между ними. Мутации, отличающиеся от делеций, которые делают мутанты несекретируемыми, могут представлять собой одну или несколько из аминокислотной замены, делеции, добавления, инверсии и т.п. В случаях, когда дополнительная мутация представляет собой аминокислотную замену, замена может представлять собой или нет замену, например, консервативной аминокислотой. В некоторых случаях 1, 2, 3, 4, 5 или большее число дополнительных аминокислот могут присутствовать на N- и/или C-конце белка. В некоторых случаях мутант TNF-альфа имеет (1) одну или несколько мутаций, которые делают мутанта несекретируемым; (2) одну или несколько мутаций, которые предотвращают прохождение сигнала извне внутрь клетки для мутанта; и/или (3) одну или несколько мутаций, которые препятствуют связыванию мутанта с TNF-рецептором 1 и/или TNF-рецептором 2 и делают их неактивными.

Аминокислотная последовательность мутанта TNF-альфа delVal1 delPro12:

MSTESMIRDVELAEALPKKTGGPQGSRRCLFSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVI
 GPQREEFPRDLSLISPLAQRSSSRTPSDKVAHVVANPQAEGLQWLNRRANALLANGV
 ELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQ
 RETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIHAL (SEQ
 ID NO:1)

Нуклеотидная последовательность мутанта TNF-альфа delVal1 delPro12:

atgagcactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgctccccaagaagacaggggggccccagggctc
 caggcgggtgcttgttctcagcctcttctctctctgatcgtggcaggcgccaccacgctcttctgcctgctgcactttggagtgatcgcccc
 cagaggggaagagttccccaggacctctctctaatcagccctctggcccaggcaagatcatcttctgaaccccgagtgacaaggttagcccc
 atgttgtagcaaacctcaagctgagggcgagctccagtggtgaaccggcccaatgccctctggccaatggcgtggagctgaga
 gataaccagctggtggtgccatcagagggcctgtacctcatctactcccaggtcctctcaaggccaaggctgccccccacccatgtgct
 cctcaccacaccatcagccgcatcgccgtctctaccagaccaaggtcaacctctctctgccatcaagagccctgccagagggagac
 cccagaggggctgaggccaagccctggtatgagccatctatctggaggggctctccagctggagaagggtgaccgactcagcgtg
 agatcaatcgcccactatctcactttgccgagctggcaggtctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO: 2)

Аминокислотная последовательность мутанта TNF-альфа delVal1-Val13 (удаление 13 аминокислот):

MSTESMIRDVELAEALPKKTGGPQGSRRCLFSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVI
 GPQREEFPRDLSLISPLAQAHVVANPQAEGLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVP
 SEGLYLIYSQVLFKQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAK
 PWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIHAL (SEQ ID NO: 3)

Нуклеотидная последовательность мутанта TNF-альфа delVal1-Pro12-delVal13 (удаление 13 аминокислот):

atgagcactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgctccccaagaagacaggggggccccagggctc
 caggcgggtgcttgttctcagcctcttctctctctgatcgtggcaggcgccaccacgctcttctgcctgctgcactttggagtgatcgcccc
 cagaggggaagagttccccaggacctctctctaatcagccctctggcccaggcaagcctgttgtagcaaacctcaagctgagggcgag
 ctccagtggtgtagccggcccaatgccctctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgccatcagagggcct
 gtacctcatctactcccaggtcctctcaaggccaaggtgccccccacccatgtgctctcaccacaccatcagccgcatcgccgtctc
 ctaccagaccaaggtcaacctctctctgccatcaagagccctgccagagggagaccccagaggggctgaggccaagcctggtatg
 agccccatctatctggaggggctctccagctggagaagggtgaccgactcagcgtgagatcaatcgcccactatctcactttgccga
 gctgggcaggtctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO: 4)

Аминокислотная последовательность TNF-альфа delVal1-delVal13:

MSTESMIRDVELAEALPKKTGGPQGSRRCLFSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVI
 GPQREEFPRDLSLISPLAQRSSSRTPSDKPAHVVANPQAEGLQWLNRRANALLANGV
 ELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQ
 RETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIHAL (SEQ
 ID NO: 5)

Нуклеотидная последовательность TNF-альфа delVal1-delVal13:

atgagcactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgctccccaagaagacaggggggccccagggctc
 caggcgggtgcttgttctcagcctcttctctctctgatcgtggcaggcgccaccacgctcttctgcctgctgcactttggagtgatcgcccc
 cagaggggaagagttccccaggacctctctctaatcagccctctggcccaggcaagatcatcttctgaaccccgagtgaagcctgccc
 atgttgtagcaaacctcaagctgagggcgagctccagtggtgaaccggcccaatgccctctggccaatggcgtggagctgaga
 gataaccagctggtggtgccatcagagggcctgtacctcatctactcccaggtcctctcaaggccaaggctgccccccacccatgtgct
 cctcaccacaccatcagccgcatcgccgtctctaccagaccaaggtcaacctctctctgccatcaagagccctgccagagggagac
 cccagaggggctgaggccaagccctggtatgagccatctatctggaggggctctccagctggagaagggtgaccgactcagcgtg
 agatcaatcgcccactatctcactttgccgagctggcaggtctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO: 6)

Нуклеотидная последовательность TNF-альфа delAla-3-Val13:

TCGAGTCGAGATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCTGGCCGA
GGAGGCGCTCCCAAGAAGACAGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTTC
TCAGCCTCTTCTCCTTCCTGATCGTGGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTGCCTGCTGCA
CTTTGGAGTGATCGGCCCCAGAGGGAAGAGTCCCCAGGGACCTCTCTAATCAG
CCCTCTGCAGGCAGCCATGTTGTAGCAAACCTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGT
GGCTGAACCGCCGGGCAATGCCCTCCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAAC
CAGCTGGTGGTCCATCAGAGGGCCTGTACCTCATCTACTCCCAGGTCCTTCAAG
GGCAAGGCTGCCCCCACCACATGTGCTCCTCACCCACACCATCAGCCGCATCGCC
GTCTCCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCTCTGCCATCAAGAGCCCCTGCCAGAGG
GAGACCCAGAGGGGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGAGG
GGTCTTCCAGCTGGAGAAGGGTGACCGACTCAGCGCTGAGATCAATCGCCCCGACT
ATCTCgACTTTGCCGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTGTCGTCG
(SEQ ID NO: 38)

Аминокислотная последовательность TNF-альфа delAla-3 и делеция от Val1 до Val13 включительно (удаление ак в положении -3 и удаление ак в положениях 1-13 (с сохранением ак в положениях -2 и -1)):

MSTEMIRDVELAEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSLIVAGATTLFLLHFGVI
GPQREEFPRDLSLISPLQAAHVVANPQAEGLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSE
EGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKP
WYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL (SEQ ID NO: 39)

Нуклеотидная последовательность мутанта TNF-альфа delAla-3-Val13 в дополнение к примеру мутации СИК-мотива, которая предотвращает передачу сигналов извне внутрь клетки, и другие мутации, которые препятствуют связыванию мутанта с TNF-рецептором 1 и/или TNF-рецептором 2 (см. фиг. 10):

ATGAGCACTGAAATGCATCCCGAAGGGGGTCTGGCACGAGGAGGCGCTC
CCCAAGAAGACAGGGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTTCCTCAGCCTCTTC
TCCTTCCTGATCGTGGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTTCTGCTGCACTTTGGAGTGA
TCGGCCCCCAGAGGGAAGAGTCCCCAGGGACCTCTCTAATCAGCCCTCTGGCCC
ATGTTGTAGCAAACCTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGGGCC
AATGCCCTCCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGCTGGTGGTGGCCATC
AGAGGGCCTGTACCTCATCTACTCCCAGGTCCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCTC
CACCCATGTGCTCCTCACCCACACCATCAGCCGCATCGCCGTCTCCCACCAGACCAA
GGTCAACCTCCTCTCGCCATCAAGAGCCCCTGCCAGAGGGAGACCCAGAGGGGG
CTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTGGAG
AAGGGTGACCGACTCATCGCTGAGATCAATCGGCCCGACTATCTCTACTTTGCCGAG
TATGGGCAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTGTCG (SEQ ID NO: 40)

Мутант TNF-альфа с аминокислотной последовательностью del Ala-3-Val13, кодируемой SEQ ID NO: 40:

MSTEMHPGRGSWHEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSLIVAGATTLFLLHFGV
IGPQREEFPRDLSLISPLAHVVANPQAEGLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEG
LYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVSHQTKVNLLFAIKSPCQRETPEGAEAKPW
YEPIYLGGVFQLEKGDRLIAEINRPDYLYFAEYQVYFGIIALS (SEQ ID NO: 41)

В конкретных вариантах осуществления мутант TNF-альфа может содержать делецию от Ala-3 до Val13, но не содержит мутацию СИК-мотива и мутацию, которая препятствует связыванию с TNF-рецептором 1 и/или TNF-рецептором 2.

Для справки приведена аминокислотная последовательность TNF дикого типа, версия 26 кД:

MSTEMIRDVELAEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSLIVAGATTLFLLHFGVI
GPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPVANPQAEGLQWLNRRANALLAN
GVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSP
CQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL
(SEQ ID NO: 7)

Для справки приведена аминокислотная последовательность TNF дикого типа, версия 17 кД:

VRSSSRTPSDKPVANPQAEGLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSE
GLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKP
WYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL (SEQ ID NO: 8)

Мутанты TNF-альфа, лишённые способности к индукции внутриклеточного сигнала или способности связывания TNF-рецептора.

Эти мутанты имеют мутации в цитоплазматическом сигнальном домене и/или в областях связывания с TNF-рецептором и, следовательно, не проявляют никакой биологической активности, поскольку они не обладают способностью к обратной сигнализации и/или способностью связывать TNF-рецепторы соответственно. Это позволяет TNF-альфа в конструкции быть мишенью для ингибиторов TNF, в то же

время не проявляя биологической активности.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутанты TNF-альфа лишены части или всего внутрицитоплазматического домена TNF-альфа, так что мутантный TNF-альфа неспособен осуществлять внутриклеточную передачу сигнала (обратную сигнализацию). Несекретируемые мутанты TNF-альфа также могут или нет подвергаться мутагенезу для удаления части или всего внутрицитоплазматического домена.

На фиг. 9 представлена структура TNF-альфа. Как показано на фиг. 9, внутрицитоплазматический домен содержит MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFL (SEQ ID NO: 17). Сайт казеинкиназы I (CKI) представляет собой STES (SEQ ID NO: 18). Трансмембранный домен представляет собой FSFLIVAGATTLFCLLHFGVI (SEQ ID NO: 19). Сайт расщепления SPPL2b представляет собой SL/LI. Линкер содержит GPQREEFPRDLSLISPLAQA (SEQ ID NO: 20). Сайт расщепления TACE представляет собой VRSSSRTPSDKPV (SEQ ID NO: 21). P01375 относится к номеру белка в базе данных UniProt. Последовательность на фиг. 9 относится только к части белка TNF.

Конкретные примеры мутанта TNF-альфа для мотива CKI (мутантная последовательность подчеркнута) для нуклеотидной и аминокислотной последовательностей соответственно являются следующими:

atgagcactgaaaTGCATCCCGGAAGGGGGTCTCGGCACgaggagcgcctcccaagaagacaggg
gggccccaggcctccaggcggctgttctcctcagcctcttctcctctgatcgtggcaggcgcaccacgctcttgcctgctgactttg
gagtgatcggccccagagggaagagtccccaggacctctctaatcagccctctggcccaggcagccatgtagcaaacctc
aagctgaggggagcctccagtggctgaaccgggccaatgccctctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggt
gccaatcagaggcctgtacctatctactcccaggctccttcaaggccaaggctgccctccaccatgtgctcctaccacacatca
ggcctatcgccgtcctaccagaccaaggtcaacctcctctgccatcaagagcccctgccagaggagaccccagagggggctgag
gccaagccctggtgatgagccatctatctgggaggggtctccagctggagaagggtgaccgactcagcgtgagatcaatgccccgac
tatctcgacttgcgagctggcaggtctactttgggatcattgccctgctg (SEQ ID NO: 22)

MSTEMHPGRGSWHEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSFLIVAGATTLFCLLHFGV
IGPQREEFPRDLSLISPLAQA VRSSSRTPSDKPV AHV VANPQAEGQLQWLNRANALLA
NGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIK
SPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIHAL
(SEQ ID NO: 23)

Одним примером мутанта TNF-альфа, имеющего мутацию M-71K во внутрицитоплазматической последовательности и другую мутацию Y87H (мутированные последовательности подчеркнуты) для нуклеотидной и аминокислотной последовательностей соответственно, является следующий:

atgagcactgaaagcaAgatccgggagctggagctggccgaggagcgcctcccaagaagacagggggccccaggcct
ccaggcggctgttctcctcagcctcttctcctctgatcgtggcaggcgcaccacgctcttgcctgctgactttgagtgatcggccc
ccagagggaagagtccccaggacctctctaatcagccctctggcccaggcagccatgtagcaaacctcaagctgaggggca
gctccagtggctgaaccgggccaatgccctctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgccatcagaggcc
tgacctatctactcccaggctccttcaaggccaaggctgccctccaccatgtgctcctaccacacacatcagccgcatcggctct
ccCaccagaccaaggtcaacctcctctgccaatcaagagcccctgccagaggagaccccagagggggctgagccaagccctggtg
tgagccatctatctgggaggggtctccagctggagaagggtgaccgactcagcgtgagatcaatgccccgactatctcactttgcc
gagtctggcaggtctactttgggatcattgccctgctg (SEQ ID NO: 24)

MSTESKIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSFLIVAGATTLFCLLHFGVI
GPQREEFPRDLSLISPLAQA AHV VANPQAEGQLQWLNRANALLANGVELRDNLVVP
SEGLYLIYSQVLFKQGCPSTHVLLTHTISRIAVSHQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAK
PWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIHAL (SEQ ID NO: 25)

Одним примером мутанта TNF-альфа, имеющего мутацию в S95F и C-28F (мутированные последовательности подчеркнуты) для нуклеотидной и аминокислотной последовательностей соответственно, является следующий:

atgagcactgaaagcatgatccgggagctggagctggccgaggagcgcctcccaagaagacagggggccccaggcctc
caggcggctgttctcctcagcctcttctcctctgatcgtggcaggcgcaccacgctcttctTcctgctgactttgagtgatcggcccc
cagagggaagagtccccaggacctctctaatcagccctctggcccaggcagccatgtagcaaacctcaagctgaggggagc
ctccagtggtgaaccgggccaatgccctctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgccatcagaggcct
gtacctatctactcccaggctccttcaaggccaaggctgccctccaccatgtgctcctaccacacacatcagccgcatcggctctc
ctaccagaccaaggtcaacctcctctTCgccaatcaagagcccctgccagaggagaccccagagggggctgagccaagccctggtat
gagccatctatctgggaggggtctccagctggagaagggtgaccgactcagcgtgagatcaatgccccgactatctcactttgcc
agtctggcaggtctactttgggatcattgccctgctg (SEQ ID NO: 26)

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFSLFSFLIVAGATTFLFLLHFGVI
 GPQREEFPRDLSLISPLAQAAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVP
 SEGLYLIYSQVLFKQGQCPSTHVLLTHTISRIVSYQTKVNLLFAIKSPCQRETPEGAEAK
 PWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL (SEQ ID NO: 27)

Одним примером мутанта TNF-альфа, имеющего мутацию в S133I и S147Y (мутированные последовательности подчеркнуты) для нуклеотидной и аминокислотной последовательностей соответственно, является следующий:

Atgagcactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgctccccaagaagacagggggccccagggct
 ccaggcggctgttctcagcctctctcctctctgatcgtggcaggcgccaccacgctctctgctgctgactttggagtatcggccc
 ccagagggaagagttccccagggacctctctctaatcagccctctggcccaggcagcccatgtttagcaaacctcaagctgaggggca
 gctccagtggctgaaccggcggccaatgccctctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgcatcagagggcc
 tgtacctcatctactcccaggctctctcaaggccaaggctgcccctccaccatgtgctctcaccacacatcagccgcatcgccgtct
 cctaccagaccaaggtcaacctctctctgccaatcaagagccctgcccagaggagagccccagaggggctgaggccaagccctggtat
 gagcccatctatctgggaggggtctccagctggagaagggtgaccgactcaTcgctgagatcaatcgccccgactatctcgactttgccg
 agtAtgggcaggtctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO: 28)

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFSLFSFLIVAGATTFLFLLHFGVI
 GPQREEFPRDLSLISPLAQAAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVP
 SEGLYLIYSQVLFKQGQCPSTHVLLTHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAK
 PWYEPIYLGGVFQLEKGDRLJAEINRPDYLDFAEYQVYFGIIAL (SEQ ID NO: 29)

Одним примером мутанта TNF-альфа, имеющего мутацию в Asp143Tyr и делецию Ala в положении -1 (мутированная последовательность подчеркнута, а удаленная последовательность показана зачеркнутой) для нуклеотидной и аминокислотной последовательностей соответственно, является следующий:

atgagcactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgctccccaagaagacagggggccccagggctc
 caggcggctgttctcagcctctctcctctctgatcgtggcaggcgccaccacgctctctgctgctgactttggagtatcggcccc
 cagaggggaagagttccccagggacctctctctaatcagccctctgcccaggcagcccatgtttagcaaacctcaagctgaggggca
 ctccagtggctgaaccggcggccaatgccctctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgcatcagagggcct
 gtacctcatctactcccaggctctctcaaggccaaggctgcccctccaccatgtgctctcaccacacatcagccgcatcgccgtctc
 ctaccagaccaaggtcaacctctctctgccaatcaagagccctgcccagaggagagccccagaggggctgaggccaagccctggtatg
 agcccatctatctgggaggggtctccagctggagaagggtgaccgactcagcgtgagatcaatcgccccgactatctcTactttgccga
 gctggcaggtctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO: 30)

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFSLFSFLIVAGATTFLFLLHFGVI
 GPQREEFPRDLSLISPLAQAAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVP
 SEGLYLIYSQVLFKQGQCPSTHVLLTHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAK
 PWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLYFAESGQVYFGIIAL (SEQ ID NO: 31)

Версии SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31, в которых отсутствуют удаленные последовательности, приведены ниже, соответственно (мутированные последовательности подчеркнуты):

atgagcactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgctccccaagaagacagggggccccagggctc
 caggcggctgttctcagcctctctcctctctgatcgtggcaggcgccaccacgctctctgctgctgactttggagtatcggcccc
 cagaggggaagagttccccagggacctctctctaatcagccctctgaggcagcccatgtttagcaaacctcaagctgaggggca
 cagtggctgaaccggcggccaatgccctctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgcatcagagggcctgta
 cctcatctactcccaggctctctcaaggccaaggctgcccctccaccatgtgctctcaccacacatcagccgcatcgccgtctccta
 ccagaccaaggtcaacctctctctgccaatcaagagccctgcccagaggagagccccagaggggctgaggccaagccctggtatgag
 cccatctatctgggaggggtctccagctggagaagggtgaccgactcagcgtgagatcaatcgccccgactatctcTactttgccgag
 ctgggcaggtctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO: 32)

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFSLFSFLIVAGATTFLFLLHFGVI
 GPQREEFPRDLSLISPLAQAAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVP
 EGLYLIYSQVLFKQGQCPSTHVLLTHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAK
 WYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLYFAESGQVYFGIIAL (SEQ ID NO: 33)

Одним примером мутанта TNF-альфа, имеющего комбинацию мутации СИК-мотива и вышеуказанных мутаций, является следующий, при этом мутации подчеркнуты:

ATGCTCGAGtcgagatgagcactgaaaTGCATCCCCGGAAGGGGGTCCCTGGCACgaggagggc
 gctccccaagaagacagggggggcccccagggtccaggcgggtgcttgttctcagcctcttctctctgatcgtggcaggcggccaccac
 gctctctTctgctgactttggagtgatcgccccagagggaagagttccccaggacctctctaatcagecctctggcagcccatg
 ttgtagcaaacctcaagctgaggggcagctccagtggtgaaccggcccaatgccctctggccaatggcgtggagctgagagat
 aaccagctggtggtgccatcagaggcctgtacctactctccaggctctctcaaggccaaggctgccctccaccatgtctctct
 caccacaccatcagccgcatcgctctccCaccagaccaaggtcaacctctctTCgcatcaagagcccctgccagaggagacc
 ccagagggggctgagggccaagcctggtatgagcccctctctgggggggctctccagctggagaagggtgaccgactcaTcgctga
 gatcaatcgcccactctcTactttgccgagtAtgggcaggtctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO: 34)

MSTEMHPGRGSWHEEALPKKTGGPQGSRRCLFSLFSFLIVAGATTLFELLHFGV
 IGPQREEFPRDLISPLAQAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLQVVP
 EGLYLIYSQVLFKGGCPSTHVLLTHTISRIAVSHQTKVNLLFAIKSPCQRETPEGAEAKP
 WYEPYILGGVFQLEKGDRLIAEINRPDYLYFAEYQVYFGIHAL (SEQ ID NO: 35)

III. Терапевтический ген (гены).

В некоторых случаях клетки, экспрессирующие мутантный TNF-альфа (мутанты), могут также экспрессировать один или более терапевтических генов. В тех случаях, когда используется более одного терапевтического гена, терапевтические гены могут являться или нет одним и тем же типом молекулы. Например, в дополнение к мутанту TNF-альфа одна клетка может также экспрессировать сконструированный рецептор, цитокин, цитокиновый рецептор, хоминговый рецептор, хемокиновый рецептор или их комбинацию. В настоящую спецификацию включены нуклеотидные последовательности терапевтических генов; продукты терапевтических генов, включая полипептиды; векторы, содержащие нуклеотидную последовательность терапевтического гена; и клетки, содержащие любое из вышеперечисленного.

В конкретных вариантах осуществления изобретения мутант совместно экспрессируется по меньшей мере с одним терапевтическим геном, включая терапевтический трансген. Терапевтический трансген может быть любого типа, но в конкретных вариантах осуществления он кодирует сконструированный рецептор. Примеры сконструированных рецепторов включают по меньшей мере Т-клеточный рецептор, химерный антигенный рецептор (CAR), хемокиновый рецептор, цитокиновый рецептор, хоминговый рецептор или их комбинацию. Любой сконструированный рецептор может иметь свой мишенью любой конкретный лиганд, такой как антиген, включая раковый антиген (такой как опухолевый антиген). Раковые антигены могут относиться к любому типу, включая те, которые связаны с конкретным раком, подлежащим лечению, и те, которые являются желательной мишенью для специфического элиминирования рака.

В тех случаях, когда продукт терапевтического гена является сконструированным рецептором, рецептор содержит антигенсвязывающий домен, мишенью которого может быть любой антиген, такой как опухолевый антиген. Антигенсвязывающий домен может, например, содержать scFv. Молекулы антигенов могут относиться, например, к инфекционным агентам, аутоантигенам, антигенам, связанным с опухолью/раком, или опухолевым неоантигенам. Примеры антигенов, которые могут быть мишенями, включают, но не ограничиваются ими, антигены, экспрессирующиеся в В-клетках; антигены, экспрессирующиеся на карциномах, саркомах, лимфомах, лейкозах, опухолях зародышевых клеток и бластомах; антигены, экспрессирующиеся на различных иммунных клетках; и антигены, экспрессирующиеся на клетках, ассоциированных с различными гематологическими заболеваниями, аутоиммунными заболеваниями и/или воспалительными заболеваниями. Примеры специфических антигенов в качестве мишеней включают CD19, CD5, CD99, CD33, CLL1, CD123, 4-1BB, 5T4, антиген аденокарциномы, альфа-фетопротейн, BAFF, клетки В-лимфомы, C242 антиген, CA-125, карбоангидразу 9 (CA-IX), C-MET, CCR4, CD152, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23 (рецептор IgE), CD28, CD30 (TNFRSF8), CD33, CD4, CD40, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CEA, CNTO888, CTLA-4, DRS, EGFR, EpCAM, CD3, FAP, экстрадомен В фибронектина, фолатный рецептор 1, ганглиозиды GD2, GD3, гликопротеин 75, GPNB, HER2/neu, HGF, человеческий рецептор фактора рассеяния, рецептор IGF-1, IGF-1, IgG1, L1-CAM, IL-13, IL-6, инсулиноподобный фактор роста I, integrin- $\alpha\beta$ 1, integrin- $\alpha\beta$ 3, MORAb-009, MS4A1, MUC1, муцин CanAg, N-гликолилнейраминавая кислота, NPC-1 C, PDGF-R альфа, PDL192, фосфатидилсерин, клетки карциномы предстательной железы, RANKL, RON, ROR1, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, TAG-72, тенасцин С, TGF- β 2, TGF- β , TRAIL-R1, TRAIL-R2, опухолевый антиген STA16.88, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR2, виментин и их комбинации. Любой рецептор антигена, который может быть использован в способах и композициях по настоящему изобретению, может иметь своей мишенью любой из указанных выше антигенов или один или более других, и такой рецептор антигена может представлять собой CAR или TCR. В конкретных вариантах осуществления в одних и тех же клетках для терапии могут использоваться как CAR, так и TCR.

В тех случаях, когда терапевтический ген кодирует CAR, CAR, например, может представлять собой первое поколение, второе поколение или третье или последующее поколение. CAR может являться или нет биспецифичным по отношению к двум или нескольким различным антигенам. CAR может содержать один или более костимуляторных доменов. Каждый костимуляторный домен может содержать

костимуляторный домен любого одного или более, например, из представителей суперсемейства CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), Dap10, DAP12, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40 или их комбинаций. В конкретных вариантах осуществления изобретения CAR содержит CD3-зета. В некоторых вариантах осуществления CAR не имеет одного или более специфических костимуляторных доменов, например CAR может не иметь 4-1BB.

В конкретном варианте осуществления CAR содержит по меньшей мере DAP12 в качестве костимуляторного домена, и в некоторых аспектах полипептид CAR содержит конкретную аминокислотную последовательность DAP12 или кодируется определенной последовательностью нуклеиновой кислоты DAP12. Примеры приведены ниже.

Аминокислотная последовательность DAP12:

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLT
VLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYQELQGGQRSDVYSDLNTQRPYYK
(SEQ ID NO: 9)

Нуклеотидная последовательность DAP12:

ATGGGGGGACTTGAACCTGCAGCAGGCTCCTGCTCCTGCCTCCTGCTGGC
TGTAAGTGGTCTCCGTCCTGTCCAGGCCAGGCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTAC
GGTGAGCCCGGGCGTGCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTGC
TCATTGCCCTGGCCGTGACTTCCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTG
CGGAGGCAGCGACCCGAAACAGCGTATCACTGAGACCGAGTCGCSTTATCAGGAG
CTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGCCGTATTA
CAAATGA (SEQ ID NO: 10)

В конкретном варианте осуществления CAR содержит по меньшей мере CD28 в качестве костимуляторного домена, и в некоторых аспектах полипептид CAR содержит конкретную аминокислотную последовательность CD28 или кодируется определенной нуклеотидной последовательностью н CD28. Примерами являются следующие:

Аминокислотная последовательность CD28:

KFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLRHSDYMNMTPRRPGPTRKH
YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGGKGDGLYQGLSTATKDT
YDALHMQALPPRG (SEQ ID NO:11)

Нуклеотидная последовательность CD28:

ATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGTATAGCTTGCTAG
TAACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACA
GTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAG
CCSTATGCCCCACCACGCGACTTCGACGCTATCGCTCACGCG (SEQ ID NO: 12)

В конкретных вариантах осуществления полипептид CAR содержит внеклеточный спейсерный домен, который связывает антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен. Внеклеточные спейсерные домены могут включать, но не ограничиваются ими, Fc-фрагменты антител или их фрагменты или их производные, шарнирные области антител или их фрагменты или производные, CH2-области антител, CH3-области антител, искусственные спейсерные последовательности или их комбинации. Примеры внеклеточных спейсерных доменов включают, но не ограничиваются ими, шарнир CD8-альфа, искусственные спейсеры из полипептидов, таких как Gly3, или CH1-, CH3-домены IgG (таких как IgG1 или IgG4 человека). В конкретных случаях внеклеточный спейсерный домен может содержать (i) шарнирную, CH2- и CH3-области IgG4, (ii) шарнирную область IgG4, (iii) шарнир и CH2 из IgG4, (iv) шарнирную область CD8-альфа, (v) шарнир, CH2- и CH3-области IgG1, (vi) шарнирную область IgG1 или (vi) шарнир и CH2 из IgG1 или их комбинацию.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения шарнир принадлежит IgG1, и в некоторых аспектах полипептид CAR содержит конкретную аминокислотную последовательность с шарнирной аминокислотной последовательностью IgG1 или кодируется конкретной нуклеотидной последовательностью шарнира из IgG1. Примерами являются следующие.

Аминокислотная последовательность шарнира IgG1:

SYVTVSSQDPAEPKSPDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGKDDPK (SEQ ID NO: 13)

Нуклеотидная последовательность шарнира IgG1:

```

GTACGTCACTGTCTCTTCACAGGATCCCGCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAA
ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC
CTCTTCCCCC AAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACA
TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT
GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAC
CATCTCAAAGCCAAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAATA
CAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC
ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
AAAGATC (SEQ ID NO: 14)

```

IV. Векторы.

Мутант (мутанты) TNF-альфа может быть доставлен в клетку-реципиента с помощью любого подходящего вектора, включая вирусный вектор или невирусный вектор. Примеры вирусных векторов включают по меньшей мере ретровирусные, лентивирусные, аденовирусные или аденоассоциированные вирусные векторы. Примеры невирусных векторов включают по меньшей мере плазмиды, транспозоны, липиды, наночастицы и т.п.

В тех случаях, когда клетка трансдуцируется вектором, кодирующим мутантный ген TNF-альфа, а также требует трансдукции другого гена в клетку, такого как продукт терапевтического гена, мутантный ген TNF-альфа и терапевтический ген могут быть включены или нет в один вектор. В некоторых случаях мутантный ген TNF-альфа и терапевтический ген экспрессируются с одной векторной молекулы, такой как одна молекула вирусного вектора. В таких случаях экспрессия мутантного гена TNF-альфа и терапевтического гена может регулироваться одним регуляторным элементом (элементами). Когда мутантный ген TNF-альфа и терапевтический ген находятся в одном векторе, они могут экспрессироваться в виде отдельных полипептидов. В тех случаях, когда они экспрессируются в виде отдельных полипептидов, они могут быть разделены в векторе, например, с помощью элемента 2A или элемента IRES. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутант TNF-альфа и продукт терапевтического гена продуцируются в виде слитого белка.

В конкретных вариантах осуществления мутантный ген TNF-альфа экспрессируется с мультицистронного вектора. Мультицистронный вектор может кодировать по меньшей мере один терапевтический ген в дополнение к гену мутанта TNF-альфа. В конкретных вариантах осуществления мультицистронный вектор кодирует мутант TNF-альфа и по меньшей мере один сконструированный рецептор, такой как T-клеточный рецептор и/или CAR. В некоторых случаях мультицистронный вектор кодирует по меньшей мере один мутант TNF-альфа, по меньшей мере один сконструированный рецептор, и по меньшей мере один цитокин. Цитокин может относиться к конкретному типу цитокина, например, принадлежать человеку или мыши, или любому биологическому виду. В специфических случаях цитокином является интерлейкин IL-15, IL-12, IL-2, IL-18 и/или IL-21.

Одним примером нуклеотидной последовательности для вектора, который кодирует мутант TNF-альфа delVal1 delPro12, и который отдельно кодирует CD19-специфичный CAR с шарниром IgG1, CD28 и CD3-зета, и который отдельно кодирует IL15, является следующий:

AATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTT
TGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGG
AACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCT
GCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGAT
ATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGA
TGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCA
AGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCT
TCTGTTGCGCGCTTATGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTC
GGGGCGCCAGTCTCCGATTGACTGAGTCGCCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACC
CTCTTGACAGTTGCATCCGACTGTGGTCTCGCTTTCCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAG
TGATTGACTACCCGTCAGCGGGGTCTTTCATTTGGGGGCTCGTCCGGGATCGGGAG
ACCCCTGCCAGGGACCACCGACCCACCACCGGAGGTAAGCTGGCCAGCAACTTA
TCTGTGTCTGTCGATTGTCTAGTGTCTATGACTGATTTTATGCGCCTGCGTGGTAC
TAGTTAGCTAACTAGCTCTGTATCTGGCGGACCCGTGGTGAACCTGACGAGTTCGGA
ACACCCGGCCGCAACCCTGGGAGACGTCCCAGGGACTTCGGGGGCCGTTTTTGTGG
CCCACCTGAGTCTAAAATCCCGATCGTTTAGGACTCTTTGGTGCACCCCTTAG
AGGAGGGATATGTGGTCTGGTAGGAGACGAGAACCTAAAACAGTTCCCGCTCCG
TCTGAATTTTTGCTTTTCGGTTTGGGACCGAAGCCGCGCCGCGCTCTGTCTGCTGCA
GCATCGTTCTGTGTTGTCTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTATTTGTCTGAAAATATGGG
CCCGGGCTAGCCTGTTACCACTCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCAGTGGAAAGATGT
CGAGCGGATCGCTCACAACCAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTTACCT
TCTGCTCTGCAGAAATGGCCAACCTTTAACGTCGGATGGCCGCGAGACGGCACCTTA
ACCGAGACCTCATCACCCAGGTTAAGATCAAGGTCTTTTCACCTGGCCCGCATGGAC
ACCCAGACCAGGTGGGGTACATCGTGACCTGGGAAGCCTTGGCTTTTGACCCCTC
CCTGGGTCAAGCCCTTTGTACACCCTAAGCCTCCGCTCCTCTCCTCCATCCGCCCC
GTCTCTCCCCCTTGAACCTCCTCGTTCGACCCCGCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCC
CTCACTCCTTCTTAGGGCCCCCATAATGGCCATATGAGATCTTATATGGGGCACCC
CCGCCCCTTGTAAACTTCCCTGACCCTGACATGACAAGAGTTACTAACAGCCCTCT
CTCCAAGCTCACTTACAGGCTCTCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTG
GCGGCAGCCTACCAAGAACAACCTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCCCTACCGAGT
CGGCGACACAGTGTGGGTCCGCCGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGA
AAGGACCTTACACAGTCTGCTGACCACCCACCAGCCCTCAAAGTAGACGGCATC
GCAGCTTGGATACACGCCGCCACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGTGGACCATC
CTCTAGACTGCCATGCTCGAGATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCT
GGCCGAGGAGGCGCTCCCCAAGAAGACAGGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGC
TTGTTCTCAGCCTCTTCTCCTTCTGATCGTGGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTGCC

TGCTGCACTTTGGAGTGATCGGCCCCAGAGGGAAGAGTTCCCCAGGGACCTCTCTC
TAATCAGCCCTCTGGCCCAGGCAAGATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAGGTAG
CCCATGTTGTAGCAAACCTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGG
GCCAATGCCCTCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGCTGGTGGTGCC
ATCAGAGGGCCTGTACCTCATCTACTCCCAGGTCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCC
CTCCACCCATGTGCTCCTCACCCACACCATCAGCCGCATCGCCGTCTCTACCAGAC
CAAGTCAACCTCTCTCTGCCATCAAGAGCCCCCTGCCAGAGGGAGACCCAGAGG
GGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTG
GAGAAGGGTGACCGACTCAGCGCTGAGATCAATCGGCCCGACTATCTCGACTTTGC
CGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTGTGCGGAGCCGAGGGCAGGG
GAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCCGGGCCCATGGAGTTGGG
CTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTCTAGAGACATCC
AGATGACACAGACTACATCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCA
GTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCA
GATGGAAGTGTAACTCCTGATCTACCATAACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCA
TCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTG
GAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACG
TTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGG
TGTTCTGGCGGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGAGGTGCAGCTGCAGCAGT
CTGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTACATGCACTGTCTCAG
GGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAACTGGATTGCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTC
TGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTAAAACACATACTATAAATTCAGCTCTC
AAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAAT
GAACAGTCTGCAAAGTATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTA
CGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACTGTCTCCTC
GTACGTCACTGTCTCTTACAGGATCCCGCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCA
CACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTT
CCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGT
GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG
GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC
GTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAAAAACCATC
TCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCG
GGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC
CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACACTACAA
GACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAC
CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAAAA
GATCCCAAATTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGTATAGCTTG
CTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCTG

CACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATT
CCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGAGCCTATCGCTCACGCGTGAAGTTCAG
CAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACAGCTCTATAACGAGC
TCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGAC
CCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATG
AACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGA
GCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCA
AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGCGGACCGCAGTGTA
CTAATTATGCTCTCTTGAATTTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCATGC
GCATTAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGC
TGAACAGCCACTTCTGACCGAGGCCGCATCCACGTGTTATCCTGGGCTGCTTCA
GCGCCGGACTGCCAAGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAG
AAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAG
CGACGTGCACCCACAGTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTCTGCTGGAACCTGCA
GGTGATCAGCCTGAAAAGCGGCGACGCCAGCATCCAGACACCGTGGAGAACCTGA
TCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGC
AAAGAGTGCAGGAACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGT
GCACATCGTGCAGATGTTTCAACACCAGCTGACAATTGCGCGTCATCATCGATCC
GGATTAGTCCAATTTGTTAAAGACAGGATATCAGTGGTCCAGGCTCTAGTTTTGACT
CAACAATATCACCAGCTGAAGCCTATAGAGTACGAGCCATAGATAAAAAAAAAGAT
TTTTATTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGAAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTTGGCA
AGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATA
GAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACA
GGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACA
GCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGG
GCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACC
ATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTATTTGAAC
TAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATA
AAAGAGCCCAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCTCCGATTGACTGAGTCGCCC
GGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCCTTTCAGTTCATCCGACTTGTGGTCTCGCT
GTTCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCAC
ACATGCAGCATGTATCAAAATTAATTTGGTTTTTTTTCTTAAGTATTTACATTAATG
GCCATAGTACTTAAAGTTACATTGGCTTCCTTGAATAAACATGGAGTATTCAGAAT
GTGTCATAAATATTTCTAATTTAAGATAGTATCTCCATTGGCTTCTACTTTTTCTTT
TATTTTTTTTTGCTCTGTCTTCCATTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT
GGTTGGTTGGTTAATTTTTTTTTAAAGATCCTACACTATAGTTCAAGCTAGACTATTA
GCTACTCTGTAACCCAGGGTGACCTTGAAGTCATGGGTAGCCTGCTGTTTTAGCCTT
CCCACATCTAAGATTACAGGTATGAGCTATCATTTTTGGTATATTGATTGATTGATTG
ATTGATGTGTGTGTGTGATTGTGTTGTGTGTGTGACTGTGAAAATGTGTGTATGG
GTGTGTGTAATGTGTGTATGTATGTGTGTGTGAGTGTGTGTGTGTGTGTGCAT

CD28 И CD3-зета, и который отдельно кодирует IL15, является следующий:

MSTESMIRDVELAEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSLIVAGATTLFCLLHFGVI
 GPQREEFPRDLISPLAQRSSSRTPSDKVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGV
 ELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLTLHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQ
 RETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIALSRAEG
 RGSLLTCGDVEENPGPMEFGLSWLFLVAILKGVQCSRDIQMTQTSSLSASLGDRVTISC
 RASQDISKYLWYQKQPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI
 ATYFCQQGNTLPYTFGGGKLELKRGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLQQSGPGLV
 APSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKD
 NSKSQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTTVTVSSYVTVSSQDP
 AEPKSPDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD
 PKFWLVVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYP
 YAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPEM
 GPKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDYD
 ALHMQUALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKPHLRSISIQCYLCLLNSHFLTE
 AGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPCKVTAM
 KCFLELQVISLESGDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQS
 FVHIVQMFINTS (SEQ ID NO: 36)

Одним примером нуклеотидной последовательности для вектора, который кодирует мутант TNF-альфа delVal1 delPro12, и который отдельно кодирует CD19-специфичный CAR с шарниром IgG1, DAP12 и CD3-зета, и который отдельно кодирует IL15, является следующий:

AATGAAAGACCCACCTGTAGGTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTT
 TGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGG
 AACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCT
 GCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGAT
 ATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGA
 TGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTCCCCA
 AGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCT
 TCTGTTCCGCGCTTATGCTCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCACAACCCCTCACTC
 GGGGCGCAGTCCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCAGGTAACCCGTGATCCAATAAACC
 CTCTTGACAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAG
 TGATTGACTACCCGTCAGCGGGGCTTTTCATTTGGGGGCTCGTCCGGGATCGGGAG
 ACCCTGCCAGGGACCACCGACCCACCACCGGAGGTAAGCTGGCCAGCAACTTA
 TCTGTGTCTGTCGATTGTCTAGTGTCTATGACTGATTTTATGCGCTGCGTCCGTAC
 TAGTTAGCTAACTAGCTCTGTATCTGGCGGACCCGTGGTGGAACTGACGAGTTCGGA
 ACACCCGGCCGCAACCCCTGGGAGACGTCCCAGGACTTCGGGGGCCGTTTTTGTGG
 CCCGACCTGAGTCCTAAAATCCCGATCGTTTAGGACTCTTTGGTGCACCCCTTAG
 AGGAGGGATATGTGGTCTGGTAGGAGACGAGAACCTAAAACAGTCCCGCTCCG
 TCTGAATTTTGTCTTTCGTTTGGGACCGAAGCCGCGCCGCGCTCTGTCTGCTGCA
 GCATCGTTCTGTGTGTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTATTTGTCTGAAAAATAGGG
 CCCGGGCTAGCCTGTTACCACTCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCAGTGGAAAGATGT
 CGAGCGGATCGCTCACAACAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTTACCT
 TCTGCTCTGCAGAAATGGCCAACCTTAACGTCGGATGGCCGCGAGACGGCACCTTA
 ACCGAGACCTCATCACCCAGGTTAAGATCAAGGCTTTTTACCTGGCCCGCATGGAC
 ACCGAGACCAGGTGGGTACATCGTGACCTGGGAAGCCTTGGCTTTTGACCCCTC
 CCTGGGTCAAGCCCTTTGTACACCTAAGCCTCCGCTCCTCTTCTCCATCCGCCCC
 GTCTCTCCCCCTTGAACCTCCTCGTTCCGACCCCGCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCC
 CTCACCTCTCTAGGGCGCCCCATATGGCCATATGAGATCTTATATGGGGCACCC
 CCGCCCTTGTAACCTTCCCTGACCCTGACATGACAAGAGTTACTAACAGCCCTCT
 CTCCAAGCTCACTTACAGGCTCTCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTTG
 GCGGCAGCCTACCAAGAACAACCTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGT
 CGGCGACACAGTGTGGGTCCGCGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGA
 AAGGACCTTACACAGTCTGCTGACCACCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATC
 GCAGCTTGGATACACGCCCCACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGTGGACCATC

CTCTAGACTGCCATGCTCGAGATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCT
GGCCGAGGAGGCGCTCCCAAGAAGACAGGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGC
TTGTTCCCTCAGCCTCTTCTCCTTCTGATCGTGGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTGCC
TGCTGCACTTTGGAGTGATCGGCCCCAGAGGGAAGAGTTCCCCAGGGACCTCTCTC
TAATCAGCCCTCTGGCCCAGGCAAGATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAGGTAG
CCCATGTTGTAGCAAACCTCAAGCTGAGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGG
GCCAATGCCCTCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGCTGGTGGTGCC
ATCAGAGGGCCTGTACCTCATCTACTCCAGGTCCTTCAAGGGCCAAGGCTGCC
CTCCACCCATGTGCTCCTCACCCACACCATCAGCCGCATCGCCGTCTCTACCAGAC
CAAGGTCAACCTCTCTGCCATCAAGAGCCCCCTGCCAGAGGGAGACCCAGAGG
GGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTCCAGCTG
GAGAAGGGTGACCGACTCAGCGCTGAGATCAATCGGCCCGACTATCTCGACTTTCG
CGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTGTGCGGAGCCGAGGGCAGGG
GAAGTCTTCAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGGAGTTGGG
CTGAGCTGGCTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGCTCTAGAGACATCC
AGATGACACAGACTACATCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCA
GTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCA
GATGGAACGTGTTAACTCCTGATCTACCATACTCAAGATTACTCAGGAGTCCCA
TCAAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTG
GAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACG
TTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGG
TGGTCTGGCGGCGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGAGGTGCAGCTGCAGCAGT
CTGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCACATGCACTGTCTCAG
GGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAAGCTGGATTCCGACGCTCCACGAAAGGGTC
TGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTACGCTCTC
AAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTCTTAAAAAT
GAACAGTCTGCAAACCTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAAACATTATTA
CGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACTGTCTCCTC
GTACGTCAGTGTCTTTCACAGGATCCCGCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCA
CACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTT
CCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGT
GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG
GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC
GTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATC
TCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCG
GGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC
CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACACTACAA
GACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAC
CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG

AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAAAA
GATCCCAAATTTGGGGCGTGTGGCCGGAATCGTGATGGGCGACCTGGTGCTGAC
AGTGCTGATCGCCCTGGCTGTGTACTTCCTGGGCAGACTGGTGCCAGAGGAAGAG
GCGCTGCCGAAGCCGCCACCCGGAAGCAGAGAATCACCGAGACAGAGAGCCCTAT
CAGGAACTGCAGGGCCAGCGGAGCGACGTGTACAGCGACCTGAATACCCAGCGGCC
CTACTACAAACGCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGAGA
TGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCATCA
GCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCACTTCCTGACCGAGGCCGCA
TCCACGTGTTATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGACTGCCCAAGACCGAGGCCAACT
GGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCAC
ATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCACCCCAGCTGCAAGGTGACCCG
CATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACCTGCAGGTGATCAGCCTGAAAAGCGGCGACGCCA
GCATCCACGACACCGTGAGAACCTGATCATCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGC
AACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAAGAGAAGA
ACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTATCAACACCA
GCTGACAATTGCGCGTCATCATCGATCCGGATTAGTCCAAATTTGTTAAAGACAGGAT
ATCAGTGGTCCAGGCTCTAGTTTTGACTCAACAATATCACCGCTGAAGCCTATAGA
GTACGAGCCATAGATAAAAATAAAAGATTTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAA
TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGAAGG
CATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTGAGGAACAGAT
GGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGG
CTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGG
TAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCC
AGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTG
AAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGC
GCGCTTCTGTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCA
GTCTCCGATTGACTGAGTCGCCCCGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCCTTGTGCAG
TTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCCCTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACT
ACCCGTCAGCGGGGTCTTTCACACATGCAGCATGTATCAAAATTAATTTGGTTTTT
TTTCTAAGTATTTACATTAATGGCCATAGTACTTAAAGTTACATTGGCTTCCTTGA
AATAAACATGGAGTATTCAGAATGTGTCATAAATATTTCTAATTTTAAGATAGTATC
TCCATTGGCTTTCTACTTTTCTTTTATTTTTTTTTGTCCTCTGTCTTCCATTTGTTGT
GTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTAATTTTTTTTTTAAAGATCCTAC
ACTATAGTTCAAGCTAGACTATTAGCTACTCTGTAACCCAGGGTGACCTTGAAGTCA
TGGGTAGCCTGCTGTTTTAGCCTTCCCACATCTAAGATTACAGGTATGAGCTATCATT
TTTGGTATATTGATTGATTGATTGATTGATGTGTGTGTGTGATTGTGTTGTGTGT
GTGACTGTGAAAATGTGTGTATGGGTGTGTGTAATGTGTGTATGTATGTGTGTGTG
TGAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCATGTGTGTGTGTGACTGTGTCTATGTGTATGAC
TGAAAAAAT
ATTCTATGGTAGTGAGAGCCAACGCTCCGGCTCAGGTGTCAGGTTGGTTTTTGTGAGC

AGAGTCTTTCACCTTAGCTTGAATTCACCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGG
 GAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGC
 TGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCAGCCT
 GAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTTC
 ACACCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCA
 GCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGC
 ATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTC
 ACCGTATACCGAAACGCGGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATA
 GGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAA
 TGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTC
 ATGAGACAATAACCCGTGATAAATGCTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG
 TATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGGGCATTTTCCTTCTGTTT
 TTGCTCACCCAGAAACGCTGGTAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA
 CGAGTGGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGC
 CCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTA
 TTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTTCTCAG
 AATGACTTGGTTGAGTACTACCCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGAC
 AGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACT
 TACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGG
 GGGATCATGTAACCTGCTTGTGCTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCA
 AACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCT
 ATTAACCTGGCGAACTACTTACTTACTGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGA
 GGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTAT
 TGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGG
 GCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAA
 CTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCAT
 TGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATT
 TTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCC
 CTTAACGTGAGTTTTCGTTCCTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT
 CTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACC
 GCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGT
 AACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAAACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTT
 AGGCCACCACTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCT
 GTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAG
 ACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACAC
 AGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACCCGAAGTGAAGATACCTACAGCGTGAGCTA
 TGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCG
 GCAGGGTCCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCTGGTA
 TCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGC
 TCGTCAGGGGGGGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTT
 CCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTG
 TGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGA
 CCGAGCGCAGCGAGTCAAGTGAAGCGGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACC
 GCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGA
 CTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGG
 CACCCAGGCTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCG
 GATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGCTCTT
 AGGAGTTTCCCTAATACATCCCAAACCTCAAATATATAAAGCATTGACTTGTCTATG
 CCCTAGGGGGGGGGGGAAGCTAAGCCAGCTTTTTTTAACATTTAAAATGTTAATTC
 CATTTTAAATGCACAGATGTTTTATTTTCATAAGGGTTTCAATGTGCATGAATGCTGC
 AATATTCCTGTTACCAAAGCTAGTATAAATAAAAATAGATAAACGTTGAAATTACTT
 AGAGTTTCTGTCATTAACGTTTCTTCCCTCAGTTGACAACATAAAATGCGCTGCTGAG
 CAAGCCAGTTTGCATCTGTCAGGATCAATTTCCCATATGCCAGTCATATTAATTA
 AGTCAATTAGTTGATTTTTATTTTTGACATATACATGTG (SEQ ID N0:16).

Одним примером аминокислотной последовательности для вектора, который кодирует мутант TNF-альфа delVall delPro12, и который отдельно кодирует CD19-специфичный CAR с шарниром IgG1, DAP12 и CD3-зета, и который отдельно кодирует IL15, является следующий:

MSTESMIRDVELAEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSLIVAGATTLFCLLHFGVI
 GPQREEFPRDLISLISPLAQARSSSRTPSDKVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGV
 ELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLTTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQ
 RETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIALSRAEG
 RGSLLTCGDVEENPGPMEFGLSWLFLVAILKGVQCSRDIQMTQTSSLSASLGDRVTISC
 RASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI
 ATYFCQQGNTLPYTFGGGKLELKRGGGGSGGGGGSGGGGGSEVQLQQSGPGLV
 APSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPQRKLEWLGVIWGSSETTYNSALKSRLTIKD
 NSKSQVFLKMNSLQTDATAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTTVTVSSYVTVSSQDP
 AEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD
 PKFWGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAEEAATRKRITETESPYQELQ
 GQRSDVYSDLNTRPYYKRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRR
 GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTA
 TKDITYDALHMQUALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKPHLRSISIQCYLCLLN
 SHFLTEAGIHVILGCFASGLPKTEANWVNVISDLKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC
 KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLILANNLSLSSNGVNTESGCKECELEEKNI
 KEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ IDNO: 37)

V. Клетки.

Варианты осуществления настоящего изобретения охватывают клетки, которые экспрессируют один или более мутантов TNF-альфа, описанных в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления изобретения клетка содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или более сконструированных несекретируемых, мембраносвязанных мутантных полипептидов TNF-альфа. В конкретных вариантах осуществления, в дополнение к экспрессии одного или более мутантных полипептидов TNF-альфа, клетка также включает нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или более продуктов терапевтических генов. Нуклеиновые кислоты могут представлять собой векторы любого вида. Нуклеиновая кислота, которая кодирует один или более мутантных полипептидов TNF-альфа, может являться или нет той же молекулой нуклеиновой кислоты, которая кодирует один или более продуктов терапевтических генов.

Клетки по настоящему изобретению могут относиться к любому типу, включая по меньшей мере Т-клетки, НК-клетки, iNKT-клетки, макрофаги, В-клетки, MSC или стволовые клетки любого типа, включая по меньшей мере гемопоэтические стволовые клетки, плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки или эмбриональные стволовые клетки.

Клетки могут быть получены от индивидуума непосредственно или могут быть получены из депозитория или другого хранилища. Клетки в качестве терапии могут быть аутологичными или аллогенными по отношению к индивидууму, который получает клетки в качестве терапии.

Клетки могут быть получены от индивидуума, нуждающегося в терапии заболевания, и после их модификации для экспрессии мутанта TNF-альфа и продукта терапевтического гена (с использованием стандартных методик трансдукции и размножения для адаптивной клеточной терапии, например), они могут быть введены индивидууму, от которого они были изначально получены. В некоторых случаях клетки хранят для последующего использования у индивидуума или другого индивидуума.

Клетки, которые несут один или более сконструированных рецепторов и которые может быть необходимо элиминировать с помощью резидентного суицидного гена TNF-альфа, могут быть любого типа. В конкретных вариантах осуществления клетки являются иммунными клетками или стволовыми клетками, включая, например, клетки, которые используются для адаптивной клеточной терапии. Иммунные клетки могут представлять собой Т-клетки, НК-клетки, NKT-клетки, iNKT-клетки, В-клетки и т.п. Клетки могут состоять из популяции клеток, и эта популяция может иметь большинство, которое трансдуцировано одним или несколькими суицидными мутантными генами TNF-альфа или обоими из одного или более сконструированных рецепторов и одного или более суицидных мутантных генов TNF-альфа. Клеточная популяция может содержать 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% клеток, которые трансдуцированы одним или несколькими суицидными мутантными генами TNF-альфа и, необязательно, одним или несколькими сконструированными рецепторами. Мутант (мутанты) TNF-альфа и сконструированный рецептор (рецепторы) представляют собой отдельные полипептиды.

Клетки могут продуцироваться суицидным мутантным геном TNF-альфа с целью их модульного использования для конкретной цели. Например, могут быть получены клетки, в том числе для коммерческого распространения, экспрессирующие мутант TNF-альфа (или распространяются в виде нуклеиновой кислоты, которая кодирует мутант для последующей трансдукции), и пользователь может модифицировать их для экспрессии одного или более интересующих терапевтических генов в зависимости от пред-

полагаемой цели (целей). В качестве только одного примера, индивидуум, которому необходимо лечение CD5-положительного рака, может получать или генерировать экспрессирующие TNF-альфа клетки и модифицировать их для экспрессии CAR, содержащего CD5-специфический scFv. В альтернативном варианте индивидуум, заинтересованный в лечении CD5-положительного рака, может получить трансдуцируемые клетки, получить вектор, который кодирует мутант TNF-альфа, и модифицировать вектор также для кодирования CD5-специфического CAR с последующей трансдукцией клеток. Любой из этих вариантов может быть применен к любому другому раковому антигену помимо CD5.

В конкретных вариантах осуществления геном трансдуцированных клеток, экспрессирующих мутант TNF-альфа, может быть модифицирован. Геном может быть модифицирован любым способом, но в конкретных вариантах осуществления геном модифицируют, например, с помощью методики редактирования генов CRISPR. Геном клеток может быть модифицирован для повышения эффективности мутанта TNF-альфа в качестве суицидного гена, для повышения эффективности использования продукта терапевтического гена или для другой цели. Конкретные примеры генов, которые могут быть модифицированы в клетках, включают следующее: нокаут ADAM13/TACE, повышенную устойчивость экспрессирующих мутант TNF-альфа клеток к микросреде опухоли, такой как TGF-бета-рецептор 1 или 2, IDO, молекулы контрольных точек, такие как PD1, TIGIT, KLRG1, TIM3 и т.п.

VI. Применение мутантов TNF-альфа в качестве суицидного гена.

В конкретных вариантах осуществления клетки, в которых используют мутантный ген TNF-альфа, представляют собой клетки, которые обладают вредоносным потенциалом, например, для индивидуума, подвергающегося воздействию клеток *in vivo*. Клетки могут быть токсичными для индивидуума при доставке или после нее, и поэтому потребность в возможности уничтожения клеток может быть постоянно представлена в клетках. Например, в любом типе клеточной терапии для использования у индивидуума *in vivo* могут использоваться раскрытые мутанты TNF-альфа в клетках, позволяя при желании завершить клеточную терапию. Клеточная терапия может стать объектом для применения суицидного мутантного гена TNF-альфа, когда у индивидуума, получающего клеточную терапию и/или получившего клеточную терапию, наблюдается один или более побочных эффектов, таких как синдром высвобождения цитокинов, нейротоксичность, анафилаксия/аллергия и/или внеопухолевая токсичность (в качестве примеров), или у него подозревают неизбежный риск возникновения одного или более симптомов. Применение мутанта TNF-альфа в качестве суицидного гена может быть частью запланированного протокола для терапии или может применяться только при возникновении потребности в его использовании. В некоторых случаях клеточная терапия заканчивается с помощью использования агента (агентов), мишенью которых является суицидный ген TNF-альфа, поскольку терапия больше не требуется.

В конкретном варианте осуществления изобретения клетки, для которых используют суицидный ген TNF-альфа, могут представлять собой клетки, сконструированные для клеточной терапии для млекопитающих. В таких случаях клеточная терапия может относиться к любому типу, и клетки могут быть любого типа. В конкретных вариантах осуществления клетки являются иммунными клетками или стволовыми клетками, которые были сконструированы для экспрессии одного или более продуктов терапевтических генов. В конкретных вариантах осуществления клетки представляют собой клетки, которые трансдуцируют одним или несколькими сконструированными рецепторами для клеток. Сконструированные рецепторы могут придавать терапевтические свойства клеткам за счет направленного взаимодействия, например путем связывания, лиганда с рецептором. В конкретных вариантах осуществления изобретения сконструированный рецептор является неприродным и может быть создан человеком. Сконструированный рецептор может быть любого типа, включая T-клеточный рецептор, химерный антигенный рецептор (CAR), хемокиновый рецептор, цитокиновый рецептор, хоминговый рецептор, гено-редактированные клетки или их комбинацию. Например, сконструированные рецепторы могут быть сконструированы таким образом, чтобы они могли связывать, в качестве мишени, специфичный антиген, включая по меньшей мере опухолевый антиген. Сконструированные рецепторы могут быть биспецифичными или мультиспецифичными более чем для одного антигена, в некоторых случаях позволяя трансдуцированным клеткам связываться через сконструированный рецептор с клетками, которые экспрессируют множественные антигены.

В конкретных вариантах осуществления при доставке эффективного количества одного или более агентов для связывания с клетками, экспрессирующими TNF-альфа, большинство клеток, экспрессирующих мутант TNF-альфа, удаляют. В конкретных вариантах осуществления изобретения у индивидуума удаляется более чем 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% клеток, экспрессирующих мутанты TNF-альфа. После распознавания необходимости удаления клеток доставка агента (агентов) индивидууму может продолжаться до исчезновения одного или более побочных эффектов или до тех пор, пока не будет удалено достаточное количество клеток. Число клеток у индивидуума можно контролировать с использованием мутантов TNF-альфа в качестве маркеров.

Варианты осуществления способов по настоящему изобретению могут включать первую стадию предоставления эффективного количества клеточной терапии индивидууму, нуждающемуся в этом, где клетки содержат один или более несекретируемых мутантов TNF-альфа; и вторую стадию уничтожения клеток с использованием мутанта (мутантов) TNF-альфа в качестве суицидных генов (прямо или непря-

мо через клеточную гибель с помощью любого механизма). Вторая стадия может быть инициирована при возникновении по меньшей мере одного побочного эффекта у индивидуума, и этот побочный эффект может быть распознан любыми способами, в том числе при обычном мониторинге, который может быть или нет непрерывным с начала клеточной терапии. Побочные эффекты могут быть обнаружены при обследовании и/или тестировании. В случаях, когда у человека наблюдается синдром высвобождения цитокинов (который также может называться цитокиновым штормом), у человека, например, может наблюдаться повышенный уровень воспалительного цитокина (цитокинов) (просто в качестве примеров: интерферона-гамма, гранулоцитарного макрофагального колониестимулирующего фактора, IL-10, IL-6 и TNF-альфа); жар; усталость; гипотония; гипоксия, тахикардия; тошнота; текучесть капилляров; сердечная/почечная/печеночная дисфункция; или их комбинация. В случаях, когда у человека наблюдается нейротоксичность, у человека может присутствовать спутанность сознания, делирий, аплазия и/или судороги. В некоторых случаях человека проверяют на наличие маркера, связанного с началом и/или тяжестью синдрома высвобождения цитокинов, такого как С-реактивный белок, IL-6, TNF-альфа и/или ферритин.

В дополнительных вариантах осуществления введение одного или более агентов, которые связываются с несекретируемым TNF-альфа во время высвобождения цитокинов или нейротоксичности, например, имеет дополнительное преимущество нейтрализации высоких уровней растворимого TNF-альфа, которые вносят вклад в токсичность терапии. Растворимый TNF-альфа высвобождается на высоком уровне во время синдрома высвобождения цитокинов и является медиатором токсичности при использовании CAR-T-клеточной терапии. В таких случаях введение анти-TNF-альфа антител, охватываемых в настоящем изобретении, имеет двойное благотворное действие, а именно селективное уничтожение клеток, экспрессирующих мутант TNF-альфа, а также нейтрализацию растворимого TNF-альфа, вызывающего токсичность. Таким образом, варианты осуществления настоящего изобретения охватывают способы устранения или уменьшения тяжести синдрома высвобождения цитокинов у индивидуума, который получает или который получил адаптивную клеточную терапию, в которой клетки экспрессируют несекретируемый мутант TNF-альфа, включающие в себя стадию введения эффективного количества агента, который связывается с несекретируемым мутантом TNF-альфа, причем указанный агент вызывает у индивидуума (а) удаление по меньшей мере некоторых из клеток клеточной терапии и (б) снижение уровня растворимого TNF-альфа.

Варианты осуществления настоящего изобретения включают способы снижения эффектов синдрома высвобождения цитокинов у индивидуума, который получил или получает клеточную терапию клетками, которые экспрессируют несекретируемый мутант TNF-альфа, включающие в себя стадию введения эффективного количества одного или более агентов, которые связываются с мутантом, чтобы вызвать у индивидуума (а) удаление по меньшей мере некоторых из клеток клеточной терапии и (б) снижение уровня растворимого TNF-альфа.

При возникновении необходимости в применении суицидного гена TNF-альфа индивидууму вводят эффективное количество одного или более ингибиторов, которые способны ингибировать, например, прямую связывание мутанта TNF-альфа на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления ингибитор (ингибиторы) может вводиться индивидууму системно и/или местно. Ингибитор может представлять собой полипептид (такой как антитело), нуклеиновую кислоту, низкомолекулярное соединение (например, производное ксантина), пептид или их комбинацию. В конкретных вариантах осуществления антитела являются одобренными FDA (FDA). Когда ингибитором является антитело, ингибитор может представлять собой моноклональное антитело по меньшей мере в некоторых случаях. Когда используются смеси антител, одно или несколько антител в смеси могут представлять собой моноклональное антитело. Примеры низкомолекулярных ингибиторов TNF-альфа включают низкомолекулярные соединения, такие как описанные в патенте США 5118500, который в полном объеме включен в данное описание в качестве ссылки. Примеры полипептидных ингибиторов TNF-альфа включают полипептиды, такие как полипептиды, описанные в патенте США № 6143866, который в полном объеме включен в данное описание в качестве ссылки.

В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере одно антитело используют для направленного воздействия на мутант TNF-альфа для запуска его активности в качестве суицидного гена. Примеры антител включают по меньшей мере Адалimumаб, Адалimumаб-atto, Цертолизумаб-пегол, Этанерсепт, Этанерсепт-szszs, Голимумаб, Инфликсимаб, Инфликсимаб-duyb или их смесь.

Варианты осуществления настоящего изобретения включают способы снижения риска токсичности клеточной терапии для индивидуума путем модификации клеток клеточной терапии для экспрессии несекретируемого мутанта TNF-альфа. Клеточная терапия предназначена для лечения рака, в конкретных вариантах осуществления, и она может содержать сконструированный рецептор, направленный на антиген, включая раковый антиген.

В конкретных вариантах осуществления, в дополнение к предлагаемой в изобретении клеточной терапии по настоящему изобретению, индивидуум может получить в прошлом, может получать в настоящем и/или он может получать в будущем дополнительную терапию заболевания. В случаях, когда заболевание представляет собой рак, индивидуум может получить одно или несколько из хирургической

операции, облучения, иммунотерапии (отличной от клеточной терапии по настоящему изобретению), гормональной терапии, генной терапии, химиотерапии и т.п.

В тех случаях, когда человек, получающий лечение с помощью клеточной терапии по настоящему изобретению, имеет рак, индивидуум может иметь любой тип рака. Индивидуум может иметь лейкоз, лимфому, миелому, рак головного мозга, рак легких, рак молочной железы, рак ободочной кишки, рак эндометрия, рак шейки матки, рак яичника, рак яичка, рак кости, рак кожи, рак почек, рак печени, рак желудка, рак селезенки, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак желчного пузыря и т.п.

VII. Наборы по настоящему изобретению.

Любая из описанных в настоящем изобретении композиций может содержаться в наборе. В неограничивающем примере клетки, реагенты для получения клеток, векторы и реагенты для получения векторов и их компонентов могут быть включены в набор. В некоторых вариантах осуществления изобретения альфа-бета-T-клетки, гамма-дельта-T-клетки, NK-клетки, NKT-клетки, iNKT-клетки, В-клетки или стволовые клетки могут быть включены в набор. Такой набор может содержать или нет один или более реагентов для манипуляций с клетками. Например, такие реагенты включают низкомолекулярные соединения, белки, нуклеиновые кислоты, антигены, антигены, буферы, праймеры, нуклеотиды, соли и/или их комбинацию. В набор могут быть включены нуклеотиды, которые кодируют один или более мутантов TNF-альфа, сконструированные рецепторы или цитокины. В набор могут быть включены белки, такие как цитокины или антитела, включая моноклональные антитела. В набор могут быть включены нуклеотиды, кодирующие компоненты сконструированных рецепторов, такие как химерные антигенные рецепторы или рецепторы T-клеток, включая реагенты для их создания.

В конкретных аспектах набор включает клеточную терапию по настоящему изобретению, а также другую терапию рака. В некоторых случаях набор, в дополнение к вариантам осуществления клеточной терапии, также включает вторую раковую терапию, такую как химиотерапия, гормональная терапия и/или иммунотерапия, например. Набор (наборы) может быть адаптирован к конкретному раку для индивидуума и включает соответствующие вторые способы лечения рака для индивидуума.

Наборы могут включать подходящие аликвоты композиций по настоящему изобретению. Компоненты наборов могут быть упакованы либо в водной среде, либо в лиофилизированной форме. Средства упаковки наборов обычно включают по меньшей мере один флакон, пробирку, колбу, бутылку, шприц или другой контейнер, в который может быть помещен компонент и, предпочтительно, подходящим образом разделен на аликвоты. Когда в наборе присутствует более одного компонента, набор также может обычно содержать второй, третий или другой дополнительный контейнер, в который дополнительные компоненты могут быть помещены отдельно. Однако во флаконе могут содержаться различные комбинации компонентов. Наборы по настоящему изобретению также обычно включают средства для содержания композиции и любых других контейнеров с реагентами в небольшом пространстве для коммерческой продажи. Такие контейнеры могут включать перфорированные или формованные пластиковые контейнеры, в которых содержатся желаемые флаконы.

Примеры

Нижеследующие примеры включены, чтобы продемонстрировать предпочтительные варианты осуществления изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что методы, раскрытые в нижеследующих примерах, представляют методы, обнаруженные изобретателем, как хорошо функционирующие при осуществлении изобретения на практике, и, таким образом, которые могут рассматриваться как составляющие предпочтительные варианты для его применения на практике. Однако специалисты в данной области техники должны в свете настоящего описания принять во внимание, что в конкретные раскрытые варианты осуществления можно внести многочисленные изменения, и все же получить аналогичный или сходный результат, не выходя за рамки сущности и объема изобретения.

Пример 1.

Суицидный ГЕН TNF-альфа.

Настоящее изобретение относится к маркерной молекуле и суицидной молекуле для клеточной терапии на основе нерасщепляемых мутантов фактора некроза опухоли альфа 26 кД (TNF- α), который обычно процессируется до компонента 17 кД. У этого подхода есть ряд преимуществ. На фиг. 1 показан пример экспериментального плана по мутагенезу TNF-альфа для удаления участков мембранного расщепления. Как описано у Perez et al. (1990), правая панель на фиг. 1 иллюстрирует три типичных мутанта TNF-альфа, которые делают мутантный TNF-альфа нерасщепляемым: (1) делеция аминокислотных остатков 1-12 TNF 17 кД; (2) делеция аминокислотных остатков 1 и 12 TNF 17 кД и (3) делеция аминокислотных остатков 1 и 13 TNF 17 кД. В левой панели фиг. 1 представлены примеры праймеров для сайт-направленного мутагенеза в качестве примера для создания мутантов.

На фиг. 2A-2E представлены примеры векторов, которые могут кодировать мутанты TNF-альфа. На фиг. 2A показан пример векторной карты мутанта TNF-альфа, имеющего делеции аминокислот Val1 и Pro12, и, например, этот мутант коэкспрессируется с CD19-специфичным CAR, а также коэкспрессируется с IL-15, все в виде отдельных полипептидов. На фиг. 2B показан пример векторной карты мутанта TNF-альфа, имеющего делецию валина 13, и, например, этот мутант отдельно коэкспрессируется с CD19-специфичным CAR и отдельно коэкспрессируется с IL-15. На фиг. 2C пример векторной карты

мутанта TNF-альфа, имеющего делеции аминокислот Val1 и Val13, и, например, мутант отдельно коэкспрессируется с CD19-специфичным CAR и IL-15. На фиг. 2D показан пример векторной карты мутанта TNF-альфа, имеющего делеции аминокислот от Val1 до Val13 (делеция 13 аминокислот), и, например, мутант отдельно коэкспрессируется с CD19-специфичным CAR и IL-15. На фиг. 2E показан пример векторной карты мутанта TNF-альфа, имеющего делеции аминокислот от Ala -1 до Val13 (делеция 14 аминокислот), и, например, мутант отдельно коэкспрессируется с CD19-специфичным CAR и IL-15.

Мутированный нерасщепляемый TNF-альфа (в клетках, трансдуцированных вектором, кодирующим как мутант TNF-альфа с делециями в Val1 и Pro12, так и CD19-специфичный CAR, например) стабильно экспрессируется на поверхности клетки после, например, вирусной трансдукции или электропорации его кодирующей последовательности (фиг. 3).

Клетки, экспрессирующие нерасщепляемые мутанты TNF- α , могут стать мишенью для селективной элиминации с использованием одобренных FDA антител против TNF- α (например), таких как этанерцепт, инфликсимаб или адалилумаб. Фиг. 4A иллюстрирует примеры антител против TNF. На фиг. 4B продемонстрировано, что более 70% NK-клеток, экспрессирующих мутантный TNF-альфа, элиминируются за счет комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) в течение 90 мин после обработки инфликсимабом.

На фиг. 5A продемонстрировано, что в ответ на мишени Raji NK-клетки, трансдуцированные вектором, коэкспрессирующим мутант TNF-альфа и CD19-специфический CAR, продуцируют больше эффекторных цитокинов и дегранулируются более эффективно по сравнению с NK-клетками, которые экспрессируют только один анти-CD19. На фиг. 5B показано, что мишени Raji эффективно убиваются NK-клетками, трансдуцированными вектором, который отдельно коэкспрессирует мутант TNF-альфа (например, с делецией Val1 и Pro12) и CD19-специфический CAR. Мутантный белок TNF-альфа с делецией валина в положении 1 и пролина в положении 12 является биологически активным и опосредует сильный противоопухолевый ответ при прямом межклеточном контакте, дополнительно внося вклад в противоопухолевую активность трансдуцированных клеток.

Трансдуцированные NK-клетки, несущие вектор, который отдельно экспрессирует CD19-специфичный CAR и мутантный TNF-альфа, не проявляют нецелевой активности (фиг. 6). На фиг. 7 продемонстрировано, что NK-клетки, трансдуцированные вектором, который отдельно экспрессирует CD19-специфичный CAR и мутант TNF-альфа, не проявляют нецелевой активности и не секретируют неспецифично TNF-альфа. На фиг. 8 показано, что сайты связывания рецепторов TNF-альфа для TNF-рецепторов 1 и 2 по сравнению с антителами TNF-альфа, инфликсимабом и адалимумабом, различаются. Это демонстрирует, что мутации в гене TNF-альфа не будут отрицательно влиять на способность антител против TNF-альфа распознавать мутантный белок TNF-альфа; т.е. мутант TNF-альфа может по-прежнему использоваться в качестве суицидного гена и быть мишенью для антител.

Могут быть использованы дополнительные исследования безопасности. Например, можно проводить исследования токсичности *in vivo* на мышах с CD19-специфичными CAR-NK-клетками. Например, в установленной модели Raji на мышах NSG можно сравнить экспрессирующие TNF-альфа WT (дикого типа) и мутантный TNF-альфа, CD19-специфические CAR-NK-клетки, также экспрессирующие IL-15. Однако эти мутанты ранее были протестированы на мышах, и их безопасность была продемонстрирована (Kagr et al., 1992).

Можно использовать синапсные и сигнальные исследования для характеристики взаимодействия мутанта TNF-альфа относительно TNF-альфа дикого типа относительно экзогенного TNF-альфа с TNF-альфа рецептором 1 (TNF-R1) и TNF-альфа рецептором 2 (TNF-R2). Такие исследования могут включать измерение индукции апоптоза и каспаз (сигнальный путь TNF-R1) в клетках Ramos (которые экспрессируют TNFR1, но не TNFR2). Кроме того или в альтернативном варианте, можно измерять NF κ B в клетках Jurkat, которые экспрессируют как TNFR2, так и TNFR1.

Пример 2.

Сравнение противоопухолевой активности клеток CAR-NK, трансдуцированных конструкциями TNFAMUT-CAR19-IL15 относительно IC9-CAR19-IL15.

На фиг. 11 представлено сравнение противоопухолевой активности клеток CAR-NK из пуповинной крови, трансдуцированных либо конструкцией TNF-alpha mut-CAR19-IL15, либо конструкциями индуцибельной каспазы 9 (iC9)-CAR19-IL15. На фиг. 11A мыши NSG с опухолью Raji получали 3×10^6 CAR-NK-клеток пуповинной крови, трансдуцированных конструкцией TNF-alpha mut-CAR19-IL15 или трансдуцированных конструкцией iC9-CAR19-IL15. На фиг. 11B показан процент выживаемости с течением времени. Мыши, трансдуцированные конструкцией TNF-alpha mut-CAR19-IL15, пережили контрольных мышей и мышей, трансдуцированных конструкцией iC9-CAR19-IL15.

Ссылки

Все патенты и публикации, приведенные в описании, являются показателем уровня специалистов в данной области техники, к которым относятся варианты осуществления изобретения. Все патенты и публикации полностью включены в настоящее описание путем ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была специально и индивидуально указана как включенная в настоящее описание

в качестве ссылки.

Патенты.

Патент США № 5118500.

Патент США № 6143866.

Публикации.

Karp, Stephen E., Hwu, Patrick, et al. (1992), In vivo Activity of Tumor Necrosis Factor (TNF) Mutants: Secretary but non Membrane-Bound TNF Mediates the Regression of Retrovirally Transduced Murine Tumor. *J. Immunol.*, vol. 149(6):2076-2081.

Perez, C., Albert, I. et al. (1990), A Nonsecretable Cell Surface Mutant of Tumor Necrosis Factor (TNF) Kills by Cell-to-Cell Contact. *Cell*, vol. 63, 251-258.

Хотя настоящее раскрытие и его преимущества были описаны подробно, следует понимать, что в нем могут быть сделаны различные изменения, замены и изменения без отступления от идеи и объема разработки, определенной прилагаемой формулой изобретения. Кроме того, объем настоящего документа не ограничивается конкретными вариантами осуществления способа, механизма, изготовления, химического вещества, средств, способов и стадий, описанных в спецификации изобретения. Как специалист в данной области техники легко поймет из настоящего описания, способы, механизмы, изготовление, химические вещества, средства, способы или стадии, существующие в настоящее время или разработанные позже, которые выполняют по существу ту же функцию или достигают по существу того же результата, что и соответствующие варианты осуществления, описанные в настоящем изобретении, могут быть использованы согласно настоящему изобретению. Соответственно, прилагаемая формула изобретения предназначена для включения в свой объем таких процессов, механизмов, изготовления, химических веществ, средств, способов или стадий.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для клеточной терапии, содержащая трансдуцированную клетку, содержащую нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или более сконструированных несекретируемых полипептидов фактора некроза опухоли (TNF)-альфа, и нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или более продуктов терапевтических генов; где мутантный полипептид TNF-альфа содержит делецию относительно SEQ ID NO: 8 следующих остатков:

аминокислотного остатка 1 и аминокислотного остатка 12;

аминокислотного остатка 1 и аминокислотного остатка 13;

аминокислотных остатков 1-12;

аминокислотных остатков 1-13 или

аминокислотных остатков от -1 до 13,

где продукт терапевтического гена представляет собой сконструированный рецептор.

2. Композиция по п.1, где сконструированный рецептор представляет собой T-клеточный рецептор, химерный антигенный рецептор (CAR), цитокиновый рецептор, хоминговый рецептор или хемокиновый рецептор.

3. Композиция по п.1 или 2, где мишенью сконструированного рецептора является раковый антиген.

4. Композиция по любому из пп.1-3, где сконструированный рецептор представляет собой CAR, который содержит один или более костимуляторных доменов.

5. Композиция по п.4, где один или более костимуляторных доменов содержат костимуляторный домен CD28, DAP12, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), Dap10, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40 или их комбинацию.

6. Композиция по любому из пп.1-5, где нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный полипептид TNF-альфа, и нуклеиновая кислота, кодирующая продукт терапевтического гена, представляют собой одну и ту же молекулу нуклеиновой кислоты.

7. Композиция по любому из пп.1-5, где нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный полипептид TNF-альфа, и нуклеиновая кислота, кодирующая продукт терапевтического гена, представляют собой разные молекулы нуклеиновой кислоты.

8. Композиция по п.6 или 7, где молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вектор.

9. Композиция по п.8, где вектор представляет собой вирусный вектор или невирусный вектор.

10. Композиция по п.9, где вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор или аденоассоциированный вирусный вектор.

11. Композиция по п.9, где невирусный вектор представляет собой плазмиду, липид или транспозон.

12. Композиция по любому из пп.1-11, где клетка представляет собой иммунную клетку или стволовую клетку.

13. Композиция по п.12, где иммунная клетка представляет собой T-клетку, NK-клетку, NKT-клетку, iNKT-клетку, В-клетку, регуляторную T-клетку, моноцит, макрофаг, дендритную клетку

или мезенхимальную стромальную клетку.

14. Композиция по любому из пп.1-13, где мутантный полипептид TNF-альфа содержит SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 41.

15. Композиция по любому из пп.1-14, где мутантный полипептид TNF-альфа кодируется последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 40.

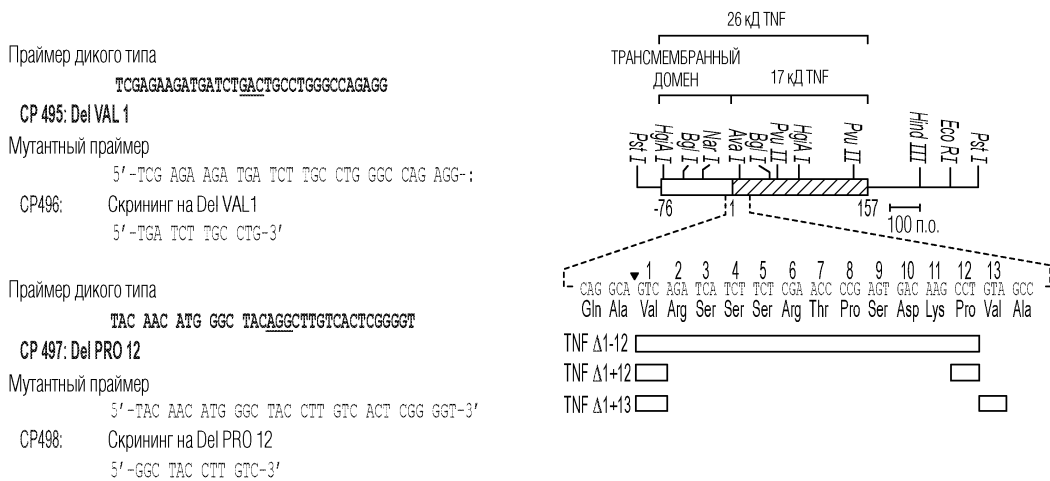
16. Композиция по любому из пп.1-15, где клетка экспрессирует экзогенно полученный цитокин.

17. Композиция по п.16, где цитокин представляет собой IL-7, IL-2, IL-15, IL-12, IL-18, IL-21 или их комбинацию.

18. Композиция по п.16 или 17, где цитокин кодируется тем же вектором, что и мутантный ген TNF-альфа.

19. Композиция по любому из пп.16-18, где цитокин экспрессируется как отдельная полипептидная молекула как мутант TNF-альфа и как отдельная полипептидная молекула как сконструированный клеточный рецептор.

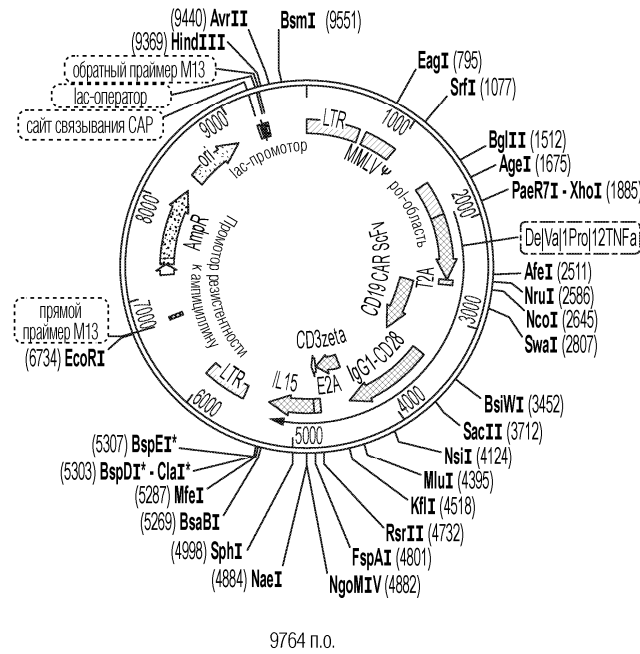
20. Композиция по любому из пп.1-19, где в мутантном полипептиде TNF-альфа отсутствует одна или более дополнительных мутаций, которые предотвращают связывание мутантного полипептида TNF-альфа с рецептором TNF.



Фиг. 1

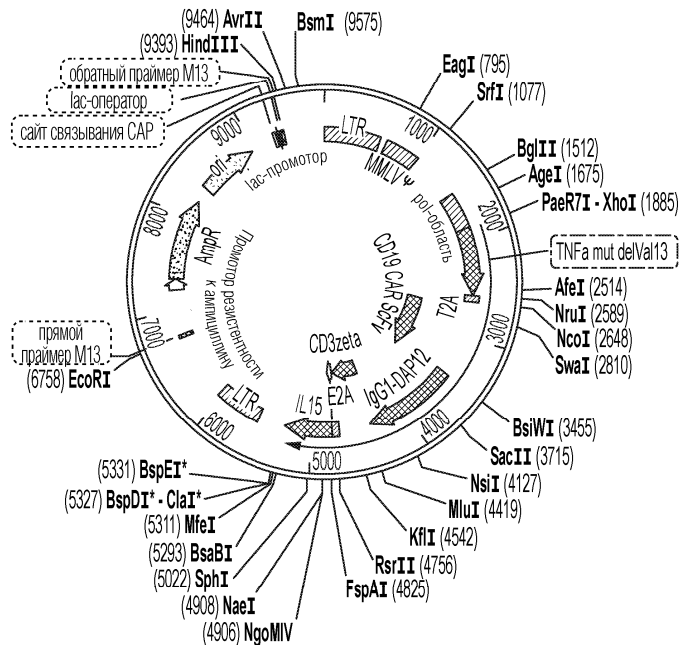
045791

Мутант TNFa delVal1 и delPro12



Фиг. 2А

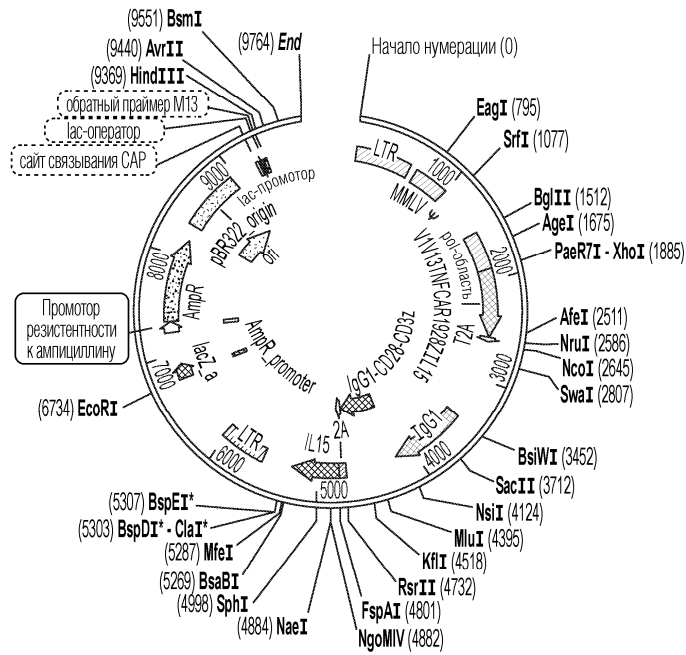
Мутант TNFa delVal13



Идентификационный номер конструкции 18ACIQEP-TNFa mut delVAL13 CAR.CD19.IgG1.DAP12.CD3zeta.IL15

Фиг. 2В

Мутант TNFa delVal13 и delVal13

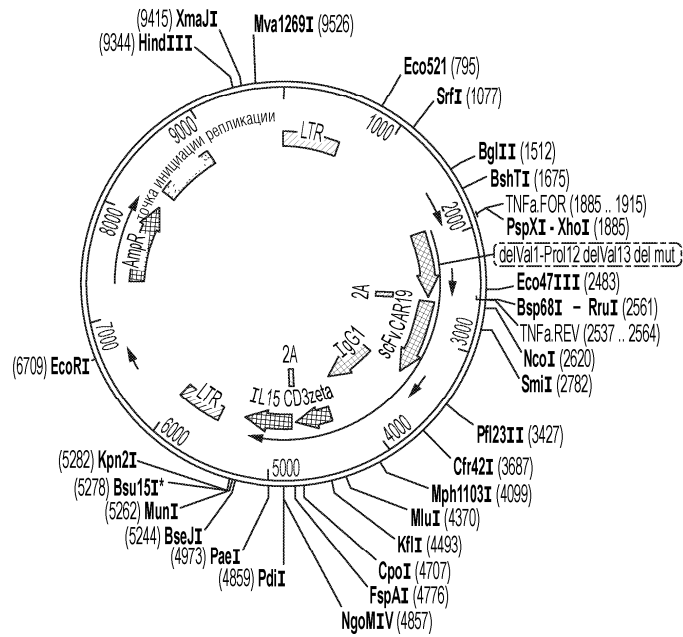


Клонирован V1V13TNFCAR1928ZIL15 (18AC4AZP)

9764 п.о.

Фиг. 2С

Мутант TNFa delVal1-Pro12delVal13 (удалено 13 ак)

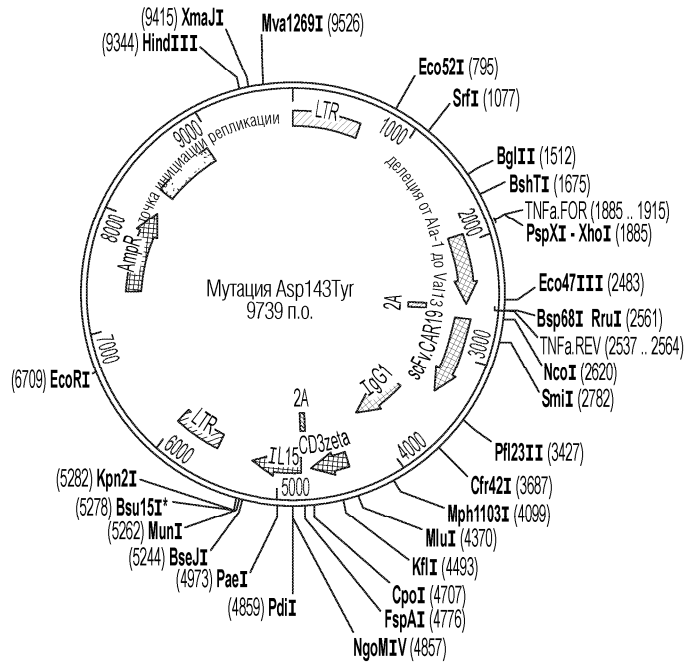


Клонирован Val1Pro12Val13delCAR19IlgG128zIL15

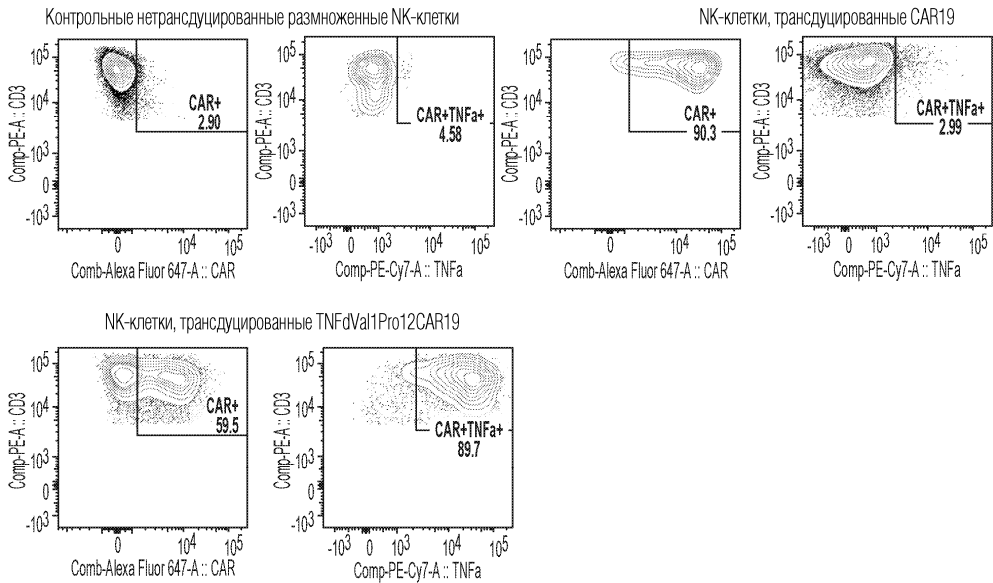
9739 п.о.

Фиг. 2D

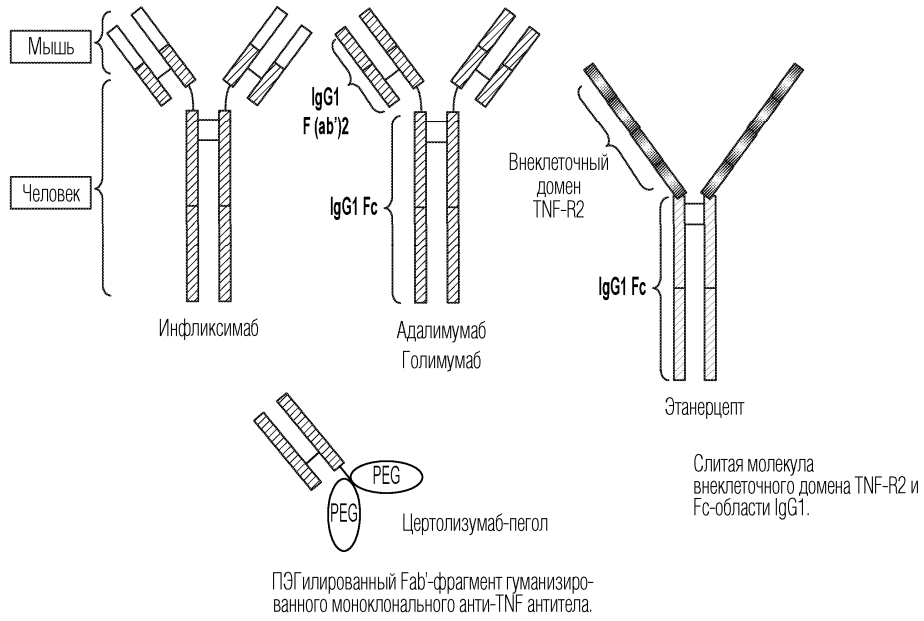
Мутант TNFa delAla -1 - Val13 (удалено 14 ак)



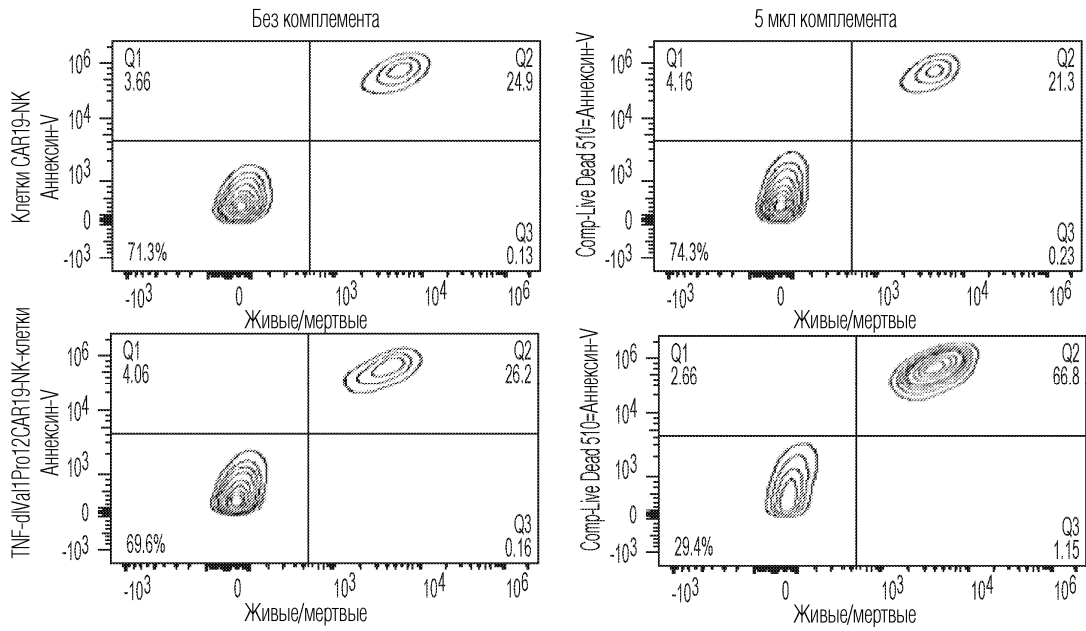
Фиг. 2Е



Фиг. 3

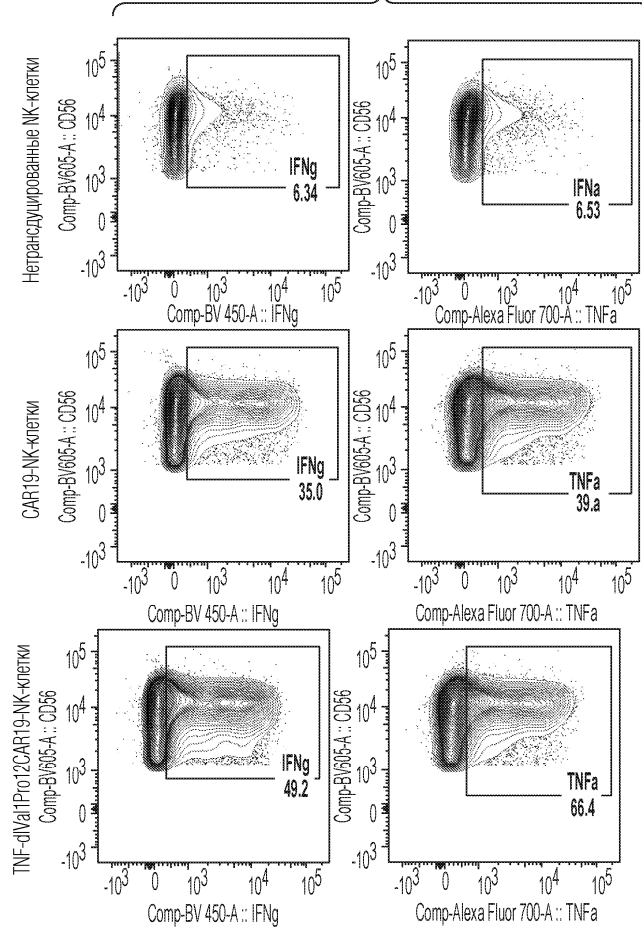


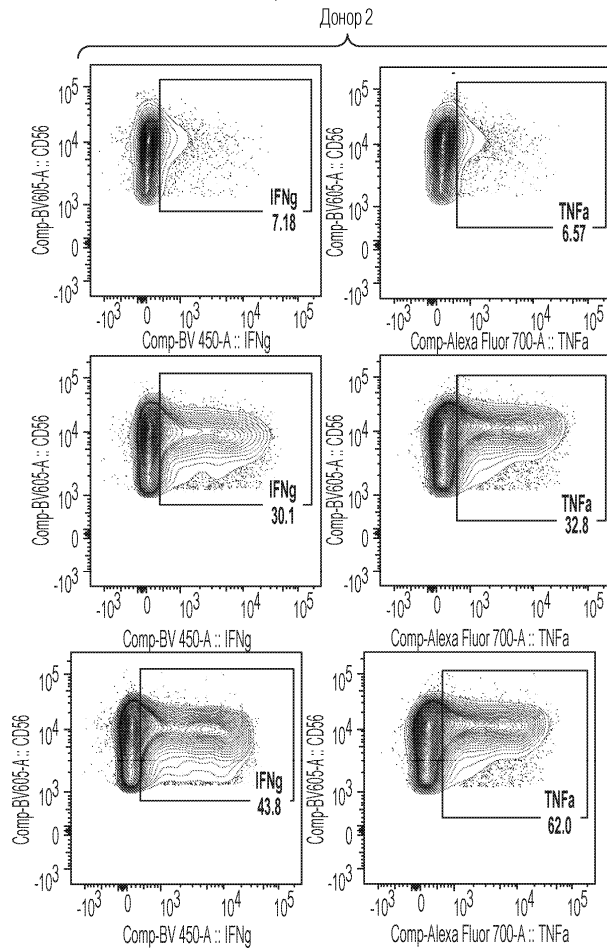
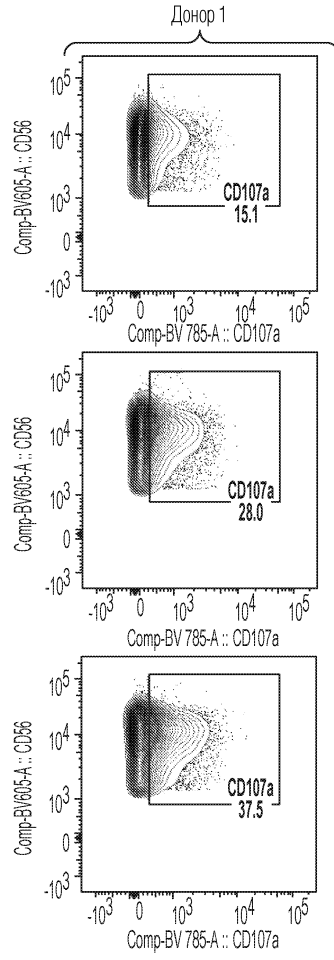
Фиг. 4А

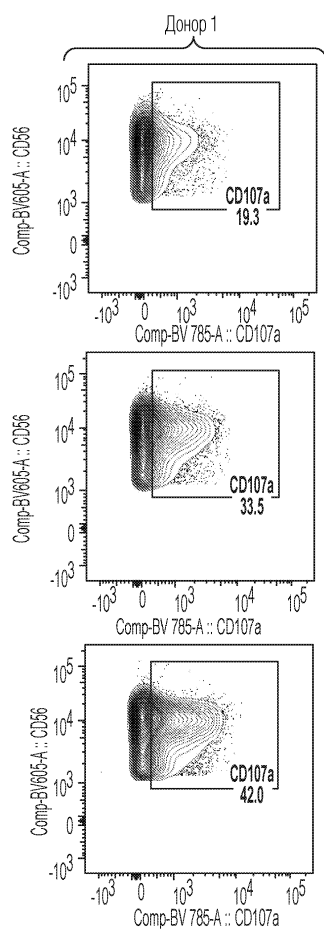


Фиг. 4В

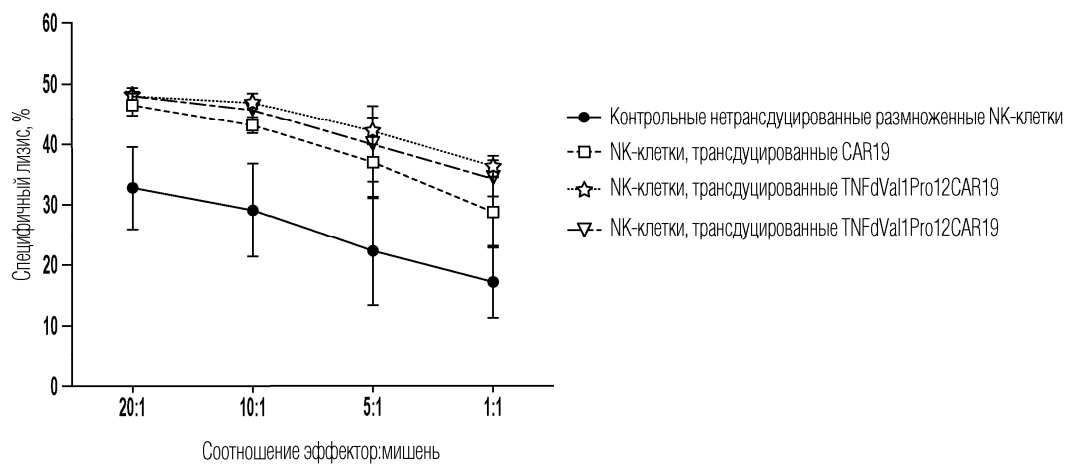
Донор 1



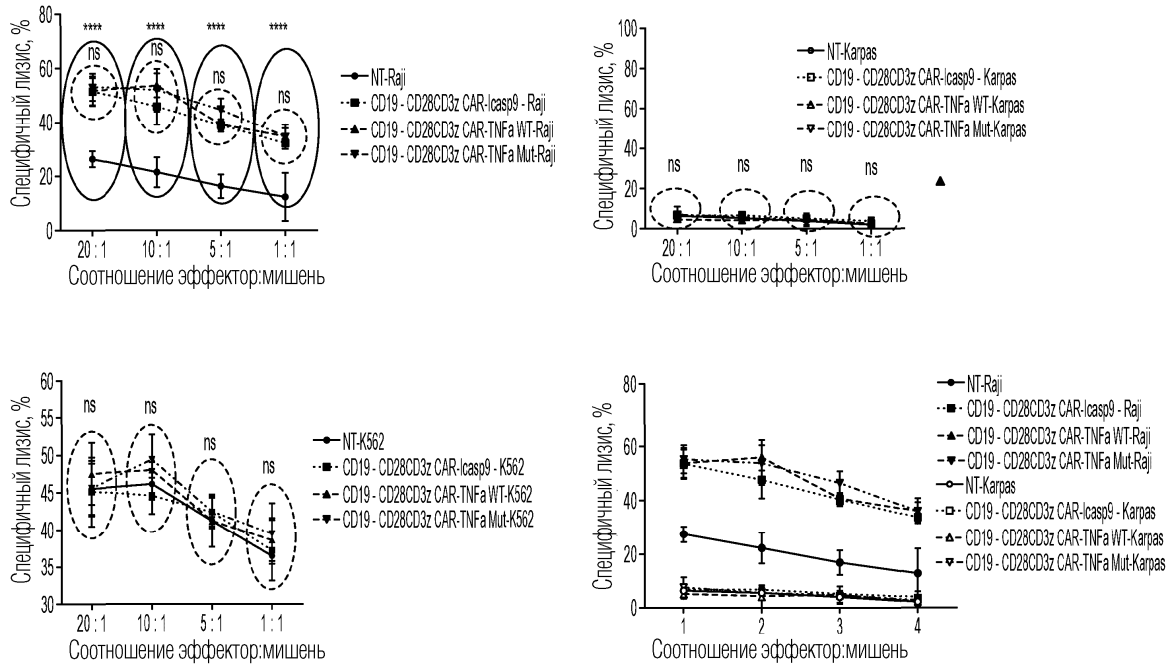




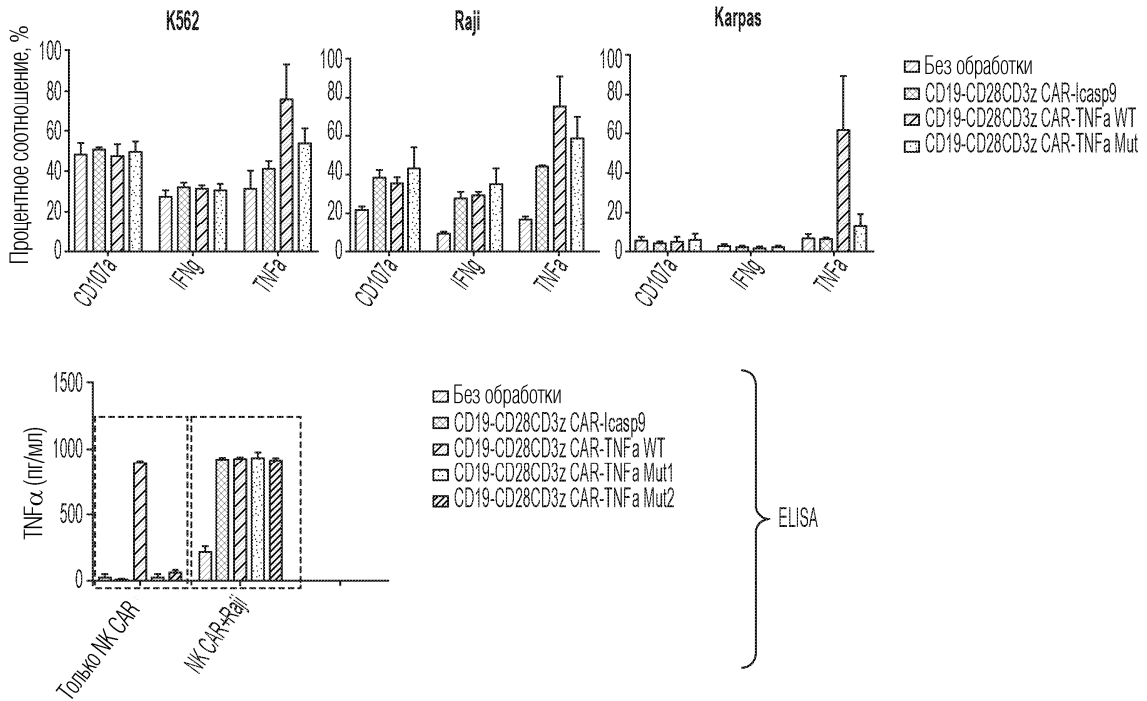
Фиг. 5А



Фиг. 5В



Фиг. 6



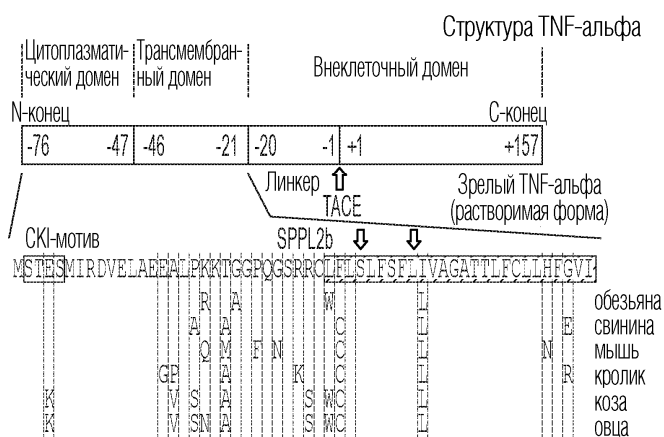
Фиг. 7

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRD
 LSLISPLAQAAHVANVQAEGLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKQ
 QGCPSTHVLTTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRL
 SAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

Одиночная черта представляет сайты связывания для TNF-рецепторов 1 и 2 - эти сайты могут быть мутированы, чтобы помешать связыванию TNF-альфа со своими рецепторами.

Двойная черта указывает мишень петлю E-F для взаимодействия с Fab-фрагментами адалимумабом и инфликсимабом. В отличие от этого EF-петли не участвуют в комплексных взаимодействиях TNF α с TNFR1 или TNFR2.

Фиг. 8



P01375

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSRTPSDKP
 VAVHVANVQAEGLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKQGGCPSTHVLTTHTISRIAVSYQTKVNLLSAI
 KSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL

Внутрицитоплазматический домен (одиночная черта)

STES, область, содержащая четыре аминокислоты сайта киназы I (SKI) (-STES-)

Трансмембранный домен представляет собой FSFLIVAGATTLFCLLHFGVI

Сайт расщепления SPPL2b (подчеркнут двойной чертой)

Линкер представляет собой GPQREEFPRDLSLISPLAQA

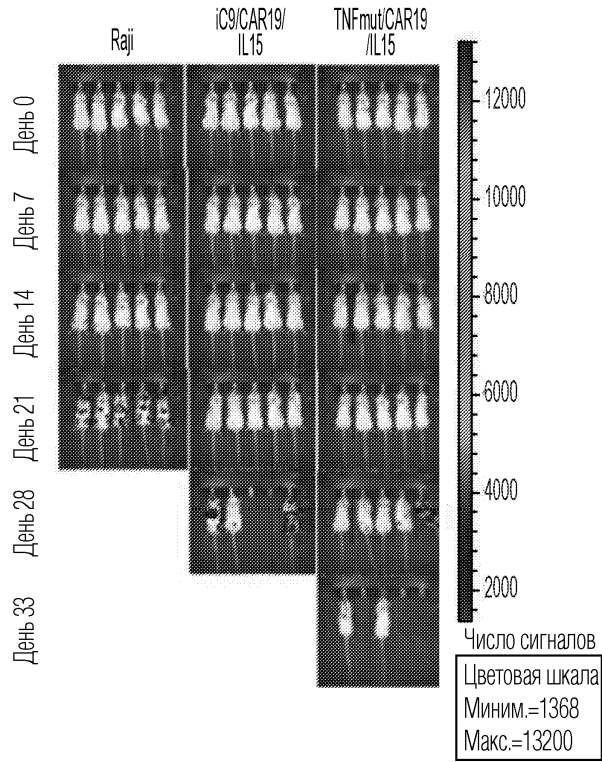
Сайт расщепления TACE представляет собой VRSSRTPSDKPV

Фиг. 9

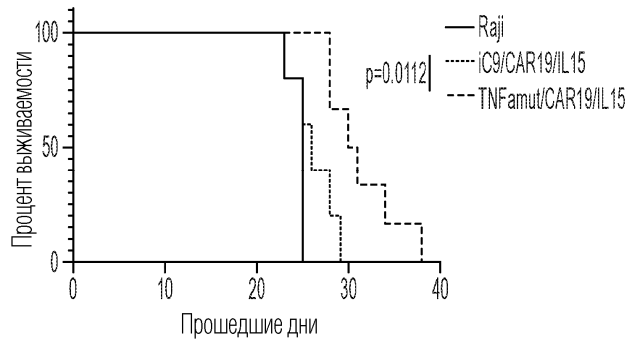
atgagcactgaaaTGCATCCCGGAAGGGGTCTGGCACgaggagcgctccccagaagacagggggccccagggct
 ccaggcgggtgcttgttctctcagcctcttctctctctgatcgtggcagggccaccacgctcttctTcctgctgcactttgagtgatcgccc
 ccagaggggaagagttccccagggacctctctctaatacagcctctggccgagcccatggttagcaaacctcaagctgaggggcagct
 ccagtggtgtaaccggccgccaatgccctctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgccatcagagggcctgt
 acctcatctactccaggtctcttcaaggccaaggctgcccctccaccatgtctctcaccacaccatcagccgatcgccgtctcc
 CaccagaccaaggtcaacctctctTCgccatcaagagccctgccagagggagaccccagagggggctgagggccaagcctggat
 gagccatctatctgggaggggtcttccagctggagaagggtagccgactcaTcgctgagatcaatcgcccgactatctcTactttgccc
 agtAtgggcaggtctactttgggatcattgcctgtcg

MSTEMHPRGRGSHWEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLSLISPLAQAAHVAN
 VQAEGLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKQGGCPSTHVLTTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSP
 CQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIALS

Фиг. 10



Фиг. 11А



Фиг. 11В

