

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392425** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2023.12.14

(51) Int. Cl. *C07K 14/145* (2006.01)  
*C12N 15/867* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.02.25

---

(54) **НАЦЕЛЕННЫЕ НА ЛИМФОЦИТЫ ЛЕНТИВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ**

---

(31) 63/154,639

(32) 2021.02.26

(33) US

(86) PCT/US2022/018027

(87) WO 2022/183072 2022.09.01

(71) Заявитель:  
**КЕЛОНИА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.**  
(US)

(72) Изобретатель:

**Перкинс Молли Р., Фридман Кевин М.**  
(US)

(74) Представитель:

**Гизатуллина Е.М., Христофоров  
А.А., Угрюмов В.М., Тихонина О.В.,  
Строкова О.В., Костюшенкова М.Ю.,  
Гизатуллин Ш.Ф., Джермакян Р.В.**  
(RU)

---

(57) В данном документе представлены лентивирусные векторы, содержащие мутантный гетерологичный оболочечный белок, нацеливающий белок и по меньшей мере один трансген, для доставки в клетку и экспрессии клеткой, характеризующейся нацеливающим белком. Также представлены способы и материалы для получения лентивирусных векторов, описанных в данном документе, способы трансдукции целевых клеток и клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, в соответствии с настоящим изобретением.

---

**A1**

**202392425**

**202392425**

**A1**

## НАЦЕЛЕННЫЕ НА ЛИМФОЦИТЫ ЛЕНТИВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ

### ЗАЯВЛЕНИЕ КАСАТЕЛЬНО ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Перечень последовательностей, связанный с настоящей заявкой, представлен в текстовом формате вместо бумажной копии и тем самым включен в данный документ в описании посредством ссылки. Название текстового файла, содержащего перечень последовательностей, – 930207\_401WO\_SEQUENCE\_LISTING.txt. Текстовый файл размером 158 КБ был создан 25 февраля 2022 г. и подается в электронном виде через EFS-Web.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Лентивирусные векторы играют решающую роль в генно-модифицированных видах клеточной терапии, особенно в Т-клеточных видах терапии. Недавно одобренные Т-клеточные виды терапии основаны на ретровирусных векторах для трансдукции терапевтической молекулы (например, химерного антигенного рецептора (CAR)) в Т-лимфоциты. Сопутствующим риском производства CAR-Т-клеток является трансдукция трансгеном других типов клеток. Применение интегрирующих векторов с тропизмом к широкому спектру клеток, например, лентивирусных векторов, псевдотипированных оболочечным белком VSV-G, может представлять собой серьезную, хотя и редкую проблему для безопасности.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НЕСКОЛЬКИХ ВИДОВ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

**На фиг. 1** представлено схематическое изображение хелперных плазмид, подходящих для применения в системе создания LVV третьего поколения.

**На фиг. 2А-2В** изображены графики (фиг. 2А) и графики FACS (фиг. 2В), показывающие целевое и внецелевое проникновение в Т-клетки Jurkat и В-клетки Raji лентивирусных векторов, несущих оболочку с мутантным VSV-G для отмены связывания рецептора LDL (Trop-002, Trop-051, Trop-052, Trop-055 и Trop-061) и нацеливающий на Т-клетки белок CD80. На фиг. 2А целевое проникновение представлено левым столбцом, а внецелевое проникновение представлено правым столбцом на каждом образце. Связывание нацеливающего на Т-клетки белка с его когнатным лигандом на Т-клетках приводит к проникновению лентивирусного вектора, и измеряют последующую экспрессию репортерного зеленого флуоресцентного белка (GFP).

**На фиг. 3А-3В** изображены графики, показывающие: (фиг. 3А) нацеливающий на Т-клетки белок CD80, экспрессируемый из упаковывающей плазмиды с VSV-G, экспрессируется при относительно эквивалентных уровнях, что и мутантный VSV-G, на поверхности клеток-продуцентов HEK293; и (фиг. 3В) LVV, созданный с помощью данного подхода, может трансдуцировать целевые Т-клетки Jurkat, но не трансдуцировать В-клетки

Raji.

**На фиг. 4** изображены графики, показывающие: (верхний ряд) уровни экспрессии CD80 и мутантного VSV-G на поверхности клеток-продуцентов HEK293T с использованием LVV, полученного путем клонирования нацеливающего белка CD80 в упаковывающей плазмиде с Rev или в упаковывающей плазмиде с мутантным VSV-G; и (внизу) LVV, созданный путем клонирования нацеливающего белка CD80 в упаковывающей плазмиде с Rev или в упаковывающей плазмиде с мутантным VSV-G, трансдуцирует целевые Т-клетки Jurkat.

**На фиг. 5** изображена (слева) экспрессия нацеливающего белка CD80 на поверхности клеток-продуцентов HEK293T с использованием пятиплазмидной упаковывающей системы в зависимости от концентрации плазмиды с CD80; и (справа) LVV, созданный с помощью пятиплазмидной упаковывающей системы, трансдуцирует целевые Т-клетки Jurkat, и эффективность трансдукции была ассоциирована с концентрацией упаковывающей плазмиды с CD80.

**На фиг. 6А-6D** изображены титры нацеливающих на лимфоциты LVV, продуцируемых в прикрепленных HEK293 или суспендированных клетках-продуцентах HEK293. LVV собирали из культуральной среды прикрепленных клеток HEK293 с помощью центрифугирования (фиг. 6А) или с помощью анионообменной хроматографии с последующей тангенциальной проточной фильтрацией (фиг. 6В). LVV собирали из культуральной среды суспендированных клеток HEK293 с помощью анионообменной хроматографии (фиг. 6С). Концентрирование с помощью АЕХ/ТFF приводило к получению препаратов LVV с высоким уровнем чистоты и извлечения (фиг. 6D).

**На фиг. 7** изображена схема тестирования трансдукции Т-клеток в РВМС от здоровых доноров-людей LVV, содержащим трансген ВСМА CAR, или нацеливающим на Т-клетки LVV (антитело к CD3 и CD80), содержащим трансген ВСМА CAR. Графики, показанные в правом нижнем углу, показывают, что даже при низком МОІ нацеливающий на Т-клетки LVV трансдуцировал Т-клетки при более высоком уровне, чем стандартный LVV, и что нацеливающий на Т-клетки LVV способен трансдуцировать Т-клетки без присутствия IL-2 и экзогенных активирующих антител (антитело к CD3 и антитело к CD28) в отличие от стандартного LVV

**На фиг. 8** изображены графики, демонстрирующие экспансию Т-клеток из РВМС, полученных от трех разных доноров и трансдуцированных с использованием стандартного LVV или перенаправленного Т-клетками LVV (антитело к CD3 и CD80) в присутствии или в отсутствие экзогенных активирующих антител к CD3 и антител к CD28.

**На фиг. 9** изображена схема тестирования трансдукции Т-клеток в РВМС от

здоровых доноров-людей LVV, содержащим трансген CD19 CAR, или нацеливающим на Т-клетки LVV (антитело к CD3 и CD80), содержащим трансген CD19 CAR. Графики в правом нижнем углу показывают, что нацеливающий на Т-клетки LVV трансдуцировал Т-клетки при более высоком уровне, чем стандартный LVV, и что нацеливающий на Т-клетки LVV способен трансдуцировать Т-клетки без присутствия экзогенных активирующих антител (антитело к CD3 и антитело к CD28) в отличие от стандартного LVV

На **фиг. 10** представлены графики, показывающие уровни эффективности трансдукции Т-клеток и активации Т-клеток нацеливающими на CD3 белками (12F6 в ориентации VH-VL и ориентации VL-VH), используемыми для создания нацеливающих на Т-клетки LVV.

На **фиг. 11** изображены графики, показывающие, что ВСМА CAR-Т-клетки демонстрировали повышенную экспрессию Т-клеточных эффекторных цитокинов (TNF $\alpha$  – слева; TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  – справа) после культивирования с ВСМА-положительными клеточными линиями, что не наблюдается в случае ВСМА-отрицательных клеточных линий, независимо от того, получены ли они с помощью стандартного LVV или перенаправленного Т-клетками LVV (антитело к CD3 и CD80).

На **фиг. 12А-12В** изображены графики, показывающие доставку трансгена *in vivo* с использованием нацеливающих на Т-клетки LVV: (фиг. 12А) нацеливающий на Т-клетки LVV (антитело к CD3 и CD80) специфически трансдуцирует Т-клетки человека (CD3+), а не В-клетки человека (CD20+) в модели гуманизированной мыши (n=5); и (фиг. 12В) нацеливающий на Т-клетки LVV трансдуцирует как CD8+, так и CD8- (CD4) Т-клетки по сравнению со стандартным LVV, который не выполнял эту функцию.

На **фиг. 13** изображены графики, показывающие, что нацеливающие LVV с CD80 усиливают трансдукцию CD4 Т-клеток по сравнению со стандартными LVV.

На **фиг. 14** изображены графики, показывающие, что нацеливающие на Т-клетки LVV (антитело к CD3 и CD80) трансдуцируют целевые Т-клетки Jurkat, но не трансдуцируют внецелевые опухолевые клетки (Raji, Ramos, Jeko-1 и NALM-6) по сравнению со стандартным LVV.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе описаны сконструированные лентивирусные векторы. Лентивирусные векторы содержат мутантный гетерологичный оболочечный белок, нацеливающий белок и по меньшей мере один трансген для доставки в клетку и экспрессии ей, характеризуемой нацеливающим белком. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий белок выбран для нацеливания на иммунную клетку, включая, например, лимфоцит или Т-клетку. В определенных таких вариантах осуществления лентивирусные



векторы, описанные в данном документе, способны избирательно нацеливаться на полежащие лимфоциты, например, Т-клетки, и эффективно трансдуцировать их. В некоторых вариантах осуществления лентивирусные векторы, описанные в данном документе, способны трансдуцировать и/или активировать Т-клетки в отсутствие экзогенного стимулирующего Т-клетки средства. В некоторых вариантах осуществления лентивирусные векторы, описанные в данном документе, усиливают трансдукцию CD4 Т-клеток по сравнению со стандартными лентивирусными векторами.

В некоторых вариантах осуществления лентивирусные векторы, включающие мутантный env и нацеливающий белок, как описано в данном документе, способны продуцировать продукт на основе LVV с высоким титром по сравнению со стандартным LVV, содержащим другой слитый белок env (например, env Кокал, env парамиксовируса, усеченный VSV-G env).

Также представлены способы и материалы для получения лентивирусных векторов, описанных в данном документе, способы трансдукции целевых клеток и клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления лентивирусный вектор, как описано в данном документе, и/или клетки, трансдуцированные таким вектором, можно применять для лечения заболевания или нарушения, отвечающего на присутствие клеток, экспрессирующих трансген, доставляемый вектором.

## 20 Определения

Перед более подробным изложением настоящего изобретения будет полезным представить определения определенных терминов, которые будут использованы в данном документе, для лучшего его понимания.

В настоящем описании любой диапазон концентрации, процентный диапазон, диапазон отношения или целочисленный диапазон следует понимать как включающий значение любого целого числа в указанном диапазоне и, при необходимости, части целого числа (например, одна десятая и одна сотая часть целого числа), если не указано иное. Кроме того, любой диапазон чисел, приведенный в данном документе в отношении любого физического признака, такого как полимерные субъединицы, размер или толщина, следует понимать как включающий любое целое число в указанном диапазоне, если не указано иное. Используемый в данном документе термин «приблизительно» означает  $\pm 20\%$  указанного диапазона, значения или структуры, если не указано иное. Следует понимать, что термины в единственном числе, используемые в данном документе, относятся к «одному или нескольким» из перечисленных компонентов. Использование альтернативы (например, «или») следует понимать как означающее один из вариантов, оба варианта или

любую из комбинаций в качестве альтернативы. Используемые в данном документе термины «включать», «иметь» и «содержать» используются как синонимы, и эти термины и их варианты следует понимать как неограничивающие.

Каждый из терминов, понятных специалистам в области технологии антител, дается в значении, приобретенном в данной области техники, если в данном описании специально не указано иное. Термин «антитело» используется в самом широком смысле и включает поликлональные и моноклональные антитела. «Антитело» может относиться к интактному антителу, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, а также антигенсвязывающую часть (или антигенсвязывающий домен) интактного антитела, которое имеет или сохраняет способность связывать целевую молекулу. Антитела могут представлять собой встречающиеся в природе, рекомбинантно полученные, генетически сконструированные или модифицированные формы иммуноглобулинов, например, интратела, пептидитела, нанотела, однодоменные антитела, SMIP, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, диатела, триатела, тетратела, tandemный ди-scFv, tandemный три-scFv, ADAPTIR). Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть могут быть отличными от человеческих, химерными, гуманизированными или человеческими, предпочтительно гуманизированными или человеческими. Структура и функция иммуноглобулина рассмотрены, например, в Harlow *et al.*, Eds., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Chapter 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1988). Под «антигенсвязывающей частью» или «антигенсвязывающим доменом» интактного антитела понимается «фрагмент антитела», который указывает на часть интактного антитела и относится к определяющим антиген вариабельным областям или определяющим комплементарность областям интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают без ограничения Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv-фрагменты, Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, диатела, линейные антитела, антитела на основе scFv, VH, и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. «Fab» (антигенсвязывающий фрагмент) представляет собой часть антитела, которая связывается с антигенами и содержит вариабельную область и CH1 тяжелой цепи, связанные с легкой цепью посредством дисульфидной связи между цепями. Антитело может относиться к любому классу или подклассу, включая IgG и его подклассы (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>), IgM, IgE, IgA и IgD.

Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» в контексте антитела относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены (или области) тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) интактного антитела обычно имеют сходные структуры, при

этом каждый домен содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три определяющие комплементарность область (CDR). (См., например, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)).  
5  
Одного домена VH или VL может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, можно выделять, используя домен VH или VL из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов VL или VH соответственно. См., например, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

10  
Термины «определяющая комплементарность область» и «CDR», которые являются синонимами «гипервариабельной области» или «HVR», известны в данной области техники и относятся к несмежным последовательностям аминокислот в переменных областях антитела, которые придают антигену специфичность и/или аффинность связывания. В общем, имеется три CDR в каждой переменной области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три CDR в каждой переменной области легкой цепи (LCDR1, LCDR2, LCDR3).

15  
Используемые в данном документе термины «связывающий домен», «связывающая область» и «связывающий фрагмент» относятся к молекуле, такой как пептид, олигопептид, полипептид или белок, которая обладает способностью специфически и нековалентно связываться, ассоциироваться, объединяться с целевой молекулой, распознавать ее или комбинироваться с ней (например, опухолевым антигеном). Связывающий домен включает  
20  
любого встречающегося в природе, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного партнера по связыванию биологической молекулы или другой мишени, представляющей интерес. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен представляет собой антигенсвязывающий домен, такой как антитело или его функциональный связывающий домен или его антигенсвязывающую часть.  
25  
Иллюстративные связывающие домены включают переменные области одноцепочечных антител (например, домены антител, sFv, scFv, Fab), эктодомены рецепторов (например, TNF- $\alpha$ ), лиганды (например, цитокины, хемокины) или синтетические полипептиды, выбранные по специфической способности связываться с биологической молекулой.

30  
«Молекула главного комплекса гистосовместимости» (молекула МНС) относится к гликопротеину, который доставляет пептидный антиген на поверхность клетки. Молекулы МНС класса I представляют собой гетеродимеры, состоящие из проходящей через мембрану  $\alpha$ -цепи (с тремя  $\alpha$ -доменами) и нековалентно ассоциированного  $\beta$ 2-микроглобулина. Молекулы МНС класса II состоят из двух трансмембранных гликопротеинов,  $\alpha$  и  $\beta$ , оба из которых проходят через мембрану. Каждая цепь имеет два  
35  
домена. Молекулы МНС класса I доставляют пептиды, происходящие из цитозоля, на

поверхность клетки, где комплекс пептид:МНС распознается CD8<sup>+</sup> Т-клетками. Молекулы МНС класса II доставляют пептиды, происходящие из везикулярной системы, на поверхность клетки, где они распознаются CD4<sup>+</sup> Т-клетками. Молекула МНС может происходить от различных видов животных, включая человека, мышь, крысу или других млекопитающих.

«Химерный антигенный рецептор» (CAR) относится к химерному слитому белку, содержащему два или более различных домена, связанных вместе таким образом, как это не встречается в природе в клетке-хозяине и может функционировать как рецептор при экспрессии на поверхности клетки. CAR обычно состоят из внеклеточного домена, содержащего связывающий домен, который связывает целевой антиген, необязательный внеклеточный спейсерный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен (например, содержащий мотив активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM)), и необязательно внутриклеточный костимулирующий домен). В определенных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит ITAM (например, CD3 $\zeta$ ), содержащий внутриклеточный сигнальный домен и внутриклеточный костимулирующий домен (например, 4-1BB). В некоторых вариантах осуществления CAR синтезируется в виде одноцепочечного полипептида или кодируется молекулой нуклеиновой кислоты в виде одноцепочечного полипептида.

Известны различные анализы для идентификации связывающих доменов по настоящему изобретению, которые специфически связываются с конкретной мишенью, а также для определения аффинности связывающих доменов, такие как вестерн-блоттинг, ELISA, аналитическое ультрацентрифугирование, спектроскопия, анализ поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore®), и анализ тетрамеров МНС (см. также, например, Scatchard *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660, 1949; Wilson, *Science* 295:2103, 2002; Wolff *et al.*, *Cancer Res.* 53:2560, 1993; Altman *et al.*, *Science* 274:94-96, 1996; и патенты США №№ 5283173, 5468614 или эквивалент). В данном документе термин «специфически связывается» относится к ассоциации или объединению связывающего домена или его слитого белка с молекулой-мишенью с аффинностью или  $K_a$  (т.е. равновесной константой ассоциации конкретного связывающего взаимодействия с единицами из 1/M), равной или превышающей  $10^5 M^{-1}$ , при этом незначительно связываясь или объединяясь с какими-либо другими молекулами или компонентами в образце.

Термины «антиген» и «Agg» относятся к молекуле, которая способна индуцировать иммунный ответ. Иммунный ответ, который индуцируется, может включать продуцирование антител, активацию специфических иммунологически компетентных клеток или и то, и другое. Антигеном могут служить макромолекулы, в том числе белки,

гликопротеины и гликолипиды. Антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК. Как предполагается в данном документе, антиген не обязательно должен кодироваться (i) исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена или (ii) вообще «геном». Антиген может быть создан или синтезирован, либо антиген  
5 может быть получен из биологического образца. Такой биологический образец может включать без ограничения образец ткани, образец опухоли, клетку или биологическую жидкость.

Термин «эпитоп» или «антигенный эпитоп» включает любую молекулу, структуру, аминокислотную последовательность или белковую детерминанту внутри антигена,  
10 которая специфически связывается когнатной иммуносвязывающей молекулой, такой как антитело или его фрагмент (например, scFv), Т-клеточный рецептор (TCR), CAR или другая связывающая молекула, домен или белок. Эпитопные детерминанты обычно содержат химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и могут иметь определенные трехмерные структурные характеристики, а  
15 также определенные характеристики заряда. Эпитоп может представлять собой линейный эпитоп или конформационный эпитоп.

В данном документе «эффektorный домен» представляет собой внутриклеточную часть слитого белка или химерного рецептора, которая может прямо или косвенно стимулировать биологический или физиологический ответ в клетке, экспрессирующей  
20 эффektorный домен, при получении соответствующего сигнала. В определенных вариантах осуществления эффektorный домен является частью белка или белкового комплекса, который получает сигнал при связывании. В других вариантах осуществления эффektorный домен является частью белка или белкового комплекса, который непосредственно связывается с целевой молекулой, что запускает сигнал от эффektorного  
25 домена. Например, в ответ на связывание CAR с целевой молекулой эффektorный домен может передавать сигнал внутрь клетки-хозяина, вызывая эффektorную функцию. Эффektorный домен может напрямую стимулировать клеточный ответ, если он содержит один или несколько сигнальных доменов или мотивов. В других вариантах осуществления эффektorный домен будет косвенно стимулировать клеточный ответ путем связывания с  
30 одним или несколькими другими белками, которые непосредственно стимулируют клеточный ответ.

«Соединительные аминокислоты» или «соединительные аминокислотные остатки» относятся к одному или нескольким (например, приблизительно 2-20) аминокислотным остаткам между двумя соседними мотивами, областями или доменами полипептида.  
35 Соединительные аминокислоты могут быть получены в результате конструкционных

особенностей химерного белка (например, аминокислотные остатки, образующиеся в результате использования сайта рестрикции во время конструирования молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок).

5 «Заболевание» представляет собой состояние здоровья субъекта, при котором субъект не может поддерживать гомеостаз, и при котором, если заболевание не регрессирует, здоровье субъекта продолжает ухудшаться. В отличие от этого, «нарушение» или «нежелательное состояние» у субъекта представляет собой состояние здоровья, при котором субъект способен поддерживать гомеостаз, но при котором состояние здоровья субъекта менее благоприятно, чем оно было бы при отсутствии нарушения или  
10 нежелательного состояния. При отсутствии лечения нарушение или нежелательное состояние не обязательно приводит к дальнейшему ухудшению состояния здоровья субъекта.

«Молекула нуклеиновой кислоты» и «полинуклеотид» могут находиться в форме РНК или ДНК, которая включает кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК. Молекула  
15 нуклеиновой кислоты может состоять из встречающихся в природе нуклеотидов (таких как дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды), аналогов встречающихся в природе нуклеотидов (например,  $\alpha$ -энантиомерных форм встречающихся в природе нуклеотидов) или их комбинации. Модифицированные нуклеотиды могут иметь модификации или замену сахарных фрагментов или пиримидиновых или пуриновых оснований. Мономеры  
20 нуклеиновых кислот могут быть связаны фосфодиэфирными связями или аналогами таких связей. Аналоги фосфодиэфирных связей включают фосфоротиоатную, фосфородитиоатную, фосфороселеноатную, фосфородиселеноатную, фосфороанилотиоатную, фосфоранилидатную, фосфорамидатную и т.п. Молекула нуклеиновой кислоты может быть двухцепочечной или одноцепочечной, и в случае, если  
25 она является одноцепочечной, то может представлять собой кодирующую цепь или не кодирующую (антисмысловую) цепь. Кодирующая молекула может иметь кодирующую последовательность, идентичную кодирующей последовательности, известной в данной области техники, или может иметь другую кодирующую последовательность, которая в результате избыточности или вырожденности генетического кода или путем сплайсинга  
30 может кодировать один и тот же полипептид.

«Кодирование» относится к внутреннему свойству конкретных полинуклеотидных последовательностей, таких как последовательности ДНК, cDNA и mRNA, выступать в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих либо определенную последовательность нуклеотидов (т.е. tRNA,  
35 tRNA и mRNA) или определенную последовательность аминокислот и возникающие в

результате этого биологические свойства. Таким образом, полинуклеотид кодирует белок, если транскрипция и трансляция mRNA, соответствующей этому полинуклеотиду, приводит к образованию белка в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, так и не кодирующая цепь могут относиться к кодированию белка или другого продукта полинуклеотида. Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность» включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность.

Используемый в данном документе термин «эндогенный» или «интактный» относится к гену, белку, соединению, молекуле или активности, которые обычно присутствуют в хозяине или клетке-хозяине, включая встречающиеся в природе варианты гена, белка, соединения, молекулы или активность.

Используемые в данном документе термины «гомологичный» или «гомолог» относятся к молекуле или активности клетки-хозяина, которая связана происхождением со вторым геном или активностью, например, из той же клетки-хозяина, из другой клетки-хозяина, из другого организма, из другого штамма, из другого вида. Например, гетерологичная молекула или гетерологичный ген, кодирующий эту молекулу, могут быть гомологичны молекуле или гену интактной клетки-хозяина, который кодирует эту молекулу соответственно, и необязательно могут иметь измененную структуру, последовательность, уровень экспрессии или любую их комбинацию.

Используемый в данном документе термин «гетерологичная» молекула, конструкция или последовательность нуклеиновой кислоты относится к молекуле нуклеиновой кислоты или части молекулы нуклеиновой кислоты, которая не является интактной для клетки-хозяина, но может быть гомологичной молекуле нуклеиновой кислоты или части молекулы нуклеиновой кислоты из клетки-хозяина. Источник гетерологичной молекулы, конструкции или последовательности нуклеиновой кислоты может происходить из другого рода или вида. В некоторых вариантах осуществления гетерологичные молекулы нуклеиновой кислоты не встречаются в природе. В определенных вариантах осуществления гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты добавляют (т.е. не эндогенную или интактную) в клетку-хозяина или геном хозяина, например, путем конъюгации, трансформации, трансфекции, трансдукции, электропорации и т.п., при этом добавленная молекула может интегрироваться в геном клетки-хозяина или существовать в виде внехромосомного генетического материала (например, в виде плазмиды или другой формы самореплицирующегося вектора) и могут присутствовать в нескольких копиях. Кроме того, «гетерологичный» относится к неинтактному ферменту,

белку или другой активности, кодируемых неэндогенной молекулой нуклеиновой кислоты, введенной в клетку-хозяина, даже если клетка-хозяин кодирует гомологичный белок или активность.

Используемый в данном документе термин «сконструированный», «рекомбинантный», «мутантный», «модифицированный» или «неприродный» относится к 5 организму, микроорганизму, клетке, молекуле нуклеиновой кислоты или вектору, которые были модифицированы путем введения гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты, или относится к клетке или микроорганизму, которые были генетически сконструированы в результате вмешательства человека, т.е. модифицированы путем введения 10 гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты, или относится к клетке или микроорганизму, которые были модифицированы таким образом, что экспрессия эндогенной молекулы нуклеиновой кислоты или гена являются контролируемой, deregulated или конститутивной, если такие изменения или модификации могут быть внесены с помощью генной инженерии. Создаваемые человеком генетические 15 изменения могут включать, например, модификации, включающие молекулы нуклеиновой кислоты (которые могут включать элемент контроля экспрессии, такой как промотор), кодирующие один или несколько белков, химерные рецепторы или ферменты, или другие добавления молекул нуклеиновой кислоты, делеции, замены или другие функциональные нарушения или дополнения генетического материала клетки. Иллюстративные 20 модификации включают модификации кодирующих областей или их функциональных фрагментов гетерологичных или гомологичных полипептидов из эталонной или исходной молекулы. Дополнительные иллюстративные модификации включают, например, модификации в некодирующих регуляторных областях, в которых модификации изменяют экспрессию гена или оперона.

Используемый в данном документе термин «трансген» относится к гену или 25 полинуклеотиду, кодирующему белок, представляющий интерес (например, CAR), экспрессия которого желательна в клетке-хозяине и который был перенесен в клетку с помощью методик генной инженерии. Трансген может кодировать белки, представляющие терапевтический интерес, а также белки, которые являются репортерами, метками, 30 маркерами, суицидными белками и т.д. Трансген может происходить из природного источника, быть полученным в результате модификации природного гена или из рекомбинантной или синтетической молекулы. В определенных вариантах осуществления трансген является компонентом вектора.

Термин «сверхэкспрессируемый» или «сверхэкспрессия» антигена относится к 35 аномально высокому уровню экспрессии антигена в клетке. Сверхэкспрессируемый



антиген или сверхэкспрессия антигена часто ассоциированы с болезненным состоянием, например, при гематологических злокачественных новообразованиях, и клетками, образующими солидную опухоль в конкретной ткани или органе субъекта. Солидные опухоли или гематологические злокачественные новообразования, характеризующиеся  
5 сверхэкспрессией опухолевого антигена, можно определить с помощью стандартных анализов, известных в данной области техники.

Используемые в данном документе термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид должен содержать  
10 по меньшей мере две аминокислоты и не ограничивается максимальным количеством аминокислот, которые может содержать последовательность белка или пептида. Полипептиды включают в себя любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Используемый в данном документе термин относится как к коротким цепям, которые в данной области техники  
15 также часто называются пептидами, олигопептидами и олигомерами, например, так и к более длинным цепям, которые в данной области техники обычно называются белками, которых существует множество типов. К «полипептидам» относятся, например, биологически активные фрагменты, по сути гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды,  
20 производные, аналоги, гибридные белки, среди прочих. Полипептиды включают природные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды или их комбинации.

Используемый в данном документе термин «зрелый полипептид» или «зрелый белок» относится к белку или полипептиду, который секретируется или локализуется в  
25 клеточной мембране или внутри определенных клеточных органелл (например, эндоплазматической сети, аппарата Гольджи или эндосомы) и включает частично расщепленную N-концевую сигнальную последовательность (например, оставшиеся одну или несколько аминокислот сигнальной последовательности, но меньшее количество, чем вся сигнальная последовательность) или не включает N-концевую сигнальную  
30 последовательность (т.е. N-концевая сигнальная последовательность была полностью удалена, например, в процессе эндогенного расщепления из белка или полипептида).

«Сигнальная последовательность», также обозначаемая «сигнальным пептидом», «лидерной последовательностью», «лидерным пептидом», «сигналом локализации» или «последовательностью локализации», представляет собой короткий пептид (обычно  
35 длиной 13-36 аминокислот), присутствующий на N-конце вновь синтезированных белков,

предназначенных для цитоплазматической мембраны или секреторного пути. Сигнальная последовательность обычно включает короткий участок гидрофильных положительно заряженных аминокислот на N-конце, центральный гидрофобный домен из 5-15 остатков и C-концевую область с сайтом расщепления для сигнальной последовательности У эукариот

5 сигнальная последовательность вызывает транслокацию вновь синтезированного белка в эндоплазматический ретикулум, где он расщепляется сигнальной пептидазой, создавая зрелый белок, который затем направляется к соответствующему месту локализации. Разнообразию длины сигнальной последовательности и аминокислотного состава затрудняет точное предсказание сайта расщепления. Для полипептидных

10 последовательностей, раскрытых в данном документе, где указана сигнальная последовательность, также рассматривается полипептидная последовательность без сигнальной последовательности или с частичной сигнальной последовательностью.

«Процент идентичности» между двумя или более последовательностями нуклеиновой кислоты или аминокислотными последовательностями является функцией

15 количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. % идентичности = количество идентичных положений/общее количество положений x 100), принимая во внимание количество гэпов и длину каждого гэпа, которые необходимо ввести для оптимизации выравнивания двух или более последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя или более

20 последовательностями можно выполнить с использованием математического алгоритма, такого как программы BLAST и Gapped BLAST, с параметрами по умолчанию (например, Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403, 1990; см. также BLASTN на сайте [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)).

«Консервативная замена» в данной области техники известна как замена одной

25 аминокислоты другой аминокислотой, имеющей сходные свойства. Иллюстративные консервативные замены хорошо известны в данной области техники (см., например, WO 97/09433, page 10, published March 13, 1997; Lehninger, *Biochemistry*, Second Edition; Worth Publishers, Inc. NY:NY (1975), pp.71-77; Lewin, *Genes IV*, Oxford University Press, NY and Cell Press, Cambridge, MA (1990), p. 8).

Термин «химерный» относится к любой молекуле нуклеиновой кислоты или белку,

30 которая не является эндогенной и включает комбинацию последовательностей, соединенных или связанных вместе, которые не встречаются в природе соединенными или связанными вместе. Например, химерная молекула нуклеиновой кислоты может содержать нуклеиновые кислоты, кодирующие различные домены множества разных генов. В другом

35 примере химерная молекула нуклеиновой кислоты может содержать регуляторные

последовательности и кодирующие последовательности, полученные из разных источников, или регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, полученные из одного и того же источника, но расположенные таким образом, что это отличается от того, как встречается в природе.

5 Термин «промотор», используемый в данном документе, определяется как последовательность ДНК, распознаваемая синтетическим механизмом клетки или введенным синтетическим механизмом, необходимым для инициации специфической транскрипции полинуклеотидной последовательности.

10 Используемый в данном документе термин «промоторная/регуляторная последовательность» означает последовательность нуклеиновой кислоты, которая необходима для экспрессии генного продукта, функционально связанного с промоторной/регуляторной последовательностью. В некоторых случаях эта последовательность может представлять собой последовательность основного промотора, а в других случаях эта последовательность может включать энхансерную  
15 последовательность и другие регуляторные элементы, которые необходимы для экспрессии генного продукта. Промоторная/регуляторная последовательность может, например, экспрессировать генный продукт тканеспецифичным образом.

«Конститутивный» промотор представляет собой нуклеотидную последовательность, которая при функциональном соединении с полинуклеотидом,  
20 который кодирует или определяет генный продукт, вызывает продуцирование генного продукта в клетке при большинстве или всех физиологических условиях клетки.

«Индуцируемый» промотор представляет собой нуклеотидную последовательность, которая при функциональном соединении с полинуклеотидом, который кодирует или определяет генный продукт, вызывает продуцирование генного продукта в клетке по сути  
25 только тогда, когда в клетке присутствует индуктор, который соответствует промотору.

«Тканеспецифический» промотор представляет собой нуклеотидную последовательность, которая при функциональном соединении с полинуклеотидом, который кодирует или определяет ген, вызывает продуцирование генного продукта в клетке по сути только в том случае, если клетка представляет собой клетку типа ткани,  
30 соответствующего промотору.

Фразы «под транскрипционным контролем» или «функционально связанный», используемый в данном документе, означают, что промотор находится в правильном местоположении и ориентации по отношению к полинуклеотиду для контроля инициации транскрипции РНК-полимеразой и экспрессии полинуклеотида.

35 «Вектор» представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая способна

транспортировать другую нуклеиновую кислоту. Векторами могут быть, например, плазмиды, космиды, вирусы или фаги. Этот термин также следует истолковывать как включающий неплазмидные и невирусные соединения, которые облегчают перенос нуклеиновой кислоты в клетки. «Вектор экспрессии» представляет собой вектор, который способен управлять экспрессией белка, кодируемого одним или несколькими трансгенами, переносимыми вектором, когда он присутствует в подходящей среде. Один или несколько трансгенов, которые должны быть экспрессированы вектором, как описано в данном документе, кодируются в кассете экспрессии.

«Лентивирусный вектор» представляет собой вектор, происходящий из лентивируса, и включает один или несколько лентивирусных пакующих белков и/или один или несколько лентивирусных белков, необходимых для экспрессии одного или нескольких генов, переносимых вектором. Аббревиатура «LVV» используется в данном документе для обозначения лентивирусного вектора (при употреблении в единственном числе), а также нескольких лентивирусных векторов (при употреблении в множественном числе).

«Лентивирус» относится к роду ретровирусов, которые способны инфицировать делящиеся и неделящиеся клетки. Примеры лентивирусов включают без ограничения HIV (вирус иммунодефицита человека, включая HIV типа 1 и HIV типа 2, вирус инфекционной анемии лошадей, вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV) и вирус иммунодефицита обезьян (SIV).

«Ретровирус» относится к РНК-вирусам с одноцепочечной положительно-полярной молекулой РНК. Ретровирусы содержат фермент обратную транскриптазу и фермент интегразу. При попадании в клетку-мишень ретровирусы используют обратную транскриптазу для транскрипции молекулы РНК в молекулу ДНК. Впоследствии фермент интегразы используется для интеграции молекулы ДНК в геном клетки-хозяина. После интеграции в геном клетки-хозяина последовательность ретровируса обозначается провирусом (например, провирусная последовательность или последовательность провируса).

Используемый в данном документе термин «кассета экспрессии» относится к отдельному компоненту нуклеиновой кислоты вектора, содержащему по меньшей мере один трансген и регуляторные последовательности, контролирующие его экспрессию (например, промотор, 3'UTR) в клетке-хозяине. Кассета тандемной экспрессии относится к компоненту нуклеиновой кислоты вектора, содержащему по меньшей мере два трансгена под контролем одного и того же набора регуляторных последовательностей для тандемной экспрессии по меньшей мере двух трансгенов. В определенных вариантах осуществления кассета тандемной экспрессии содержит по меньшей мере два трансгена под контролем

одного и того же промотора. В определенных вариантах осуществления первый трансген и второй трансген разделены участком внутренней посадки рибосомы (IRES), сайтом расщепления фурином или саморасщепляющимся вирусным пептидом 2A для обеспечения коэкспрессии двух белков из одной mRNA.

5 Термин «клетка иммунной системы» или «иммунная клетка» означает любую клетку иммунной системы, происходящую из гемопоэтической стволовой клетки в костном мозге. Гемопоэтические стволовые клетки образуют две основные линии: миелоидные клетки-предшественники (которые образуют миелоидные клетки, такие как моноциты, макрофаги, дендритные клетки, мегакариоциты и гранулоциты) и лимфоидные клетки-предшественники (которые образуют лимфоидные клетки, такие как Т-клетки, В-клетки и естественные клетки-киллеры (NK-клетки)). Иллюстративные клетки иммунной системы включают CD4<sup>+</sup> Т-клетку, CD8<sup>+</sup> Т-клетку, CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> дважды негативную Т-клетку,  $\gamma\delta$  Т-клетку, регуляторную Т-клетку, естественную клетку-киллер и дендритную клетку. Макрофаги и дендритные клетки также могут обозначаться «антигенпрезентирующими клетками» или «APC», которые представляют собой специализированные клетки, которые могут активировать Т-клетки, когда рецептор главного комплекса гистосовместимости (МНС) на поверхности APC, находящийся в комплексе с пептидом, взаимодействует с TCR на поверхности Т-клетки.

15 Термин «лимфоцит» относится к иммунным клеткам лимфоидного происхождения, которые представляют собой клетки, которые демонстрируют по меньшей мере один фенотип, характерный для лимфоцита или его предшественника или прогениторной клетки, который отличает эти клетки от клеток эритроидной или миелоидной линии дифференцировки. Термин «лимфоциты» охватывает Т-клетки, В-клетки и естественные клетки-киллеры (NK).

25 Термин «Т-клетки» относится к клеткам Т-клеточной линии дифференцировки. «Клетки Т-клеточной линии дифференцировки» относятся к клеткам, которые демонстрируют по меньшей мере одну фенотипическую характеристику Т-клетки или ее предшественника или прогениторной клетки, которая отличает эти клетки от других лимфоидных клеток, а также клеток эритроидной или миелоидной линии дифференцировки. Такие фенотипические характеристики могут включать экспрессию одного или нескольких белков, специфичных для Т-клеток (например, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>), или физиологический, морфологический, функциональный или иммунологический признак, специфичный для Т-клетки. Например, клетки Т-клеточной линии дифференцировки могут представлять собой прогениторные клетки или клетки-предшественники, коммитированные в Т-клеточную линию; CD25<sup>+</sup> незрелые и

инактивированные Т-клетки; клетки, которые подверглись коммитированию линии дифференцировки CD4 или CD8; клетки-предшественники тимоцитов, которые являются CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> дважды позитивными; единожды позитивные CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup>; TCRαβ или TCR γδ; или зрелые и функциональные или активированные Т-клетки. Термин «Т-клетки» охватывает наивные Т-клетки (CD45RA<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>, CD45RO<sup>-</sup>), центральные Т-клетки памяти (CD45RA<sup>-</sup>, CD45RO<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>), эффекторные Т-клетки памяти (CD45RA<sup>-</sup>, CD45RO<sup>+</sup>, CCR7<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CD27<sup>-</sup>), инвариантные Т-клетки, ассоциированные со слизистой оболочкой (MAIT), γδ Т-клетки, Treg, естественные Т-клетки-киллеры и тканерезидентные Т-клетки.

10 Термин «естественные клетки-киллеры» или «NK-клетки» относится к крупным гранулярным лимфоцитам (LGL) и представляет собой третий тип клеток, отличающихся от общих лимфоидных предшественников, образующих В- и Т-лимфоциты. Известно, что NK-клетки дифференцируются и созревают в костном мозге, лимфатических узлах, селезенке, миндалинах и тимусе, откуда они затем попадают в кровотоки. NK-клетки отличаются от естественных Т-киллеров-киллеров (NKT) фенотипически, по происхождению и по соответствующим эффекторным функциям; часто активность NKT-клеток способствует активности NK-клеток путем секреции IFNγ. В отличие от NKT-клеток, NK-клетки не экспрессируют Т-клеточные антигенные рецепторы (TCR) или маркер CD3 для всех типов Т-клеток или поверхностные иммуноглобулиновые (Ig) В-клеточные рецепторы, но они обычно экспрессируют поверхностные маркеры CD16 (FcγRIII) и CD56 у человека, NK1.1 или NK1.2 у мышей C57BL/6. До 80% NK-клеток человека также экспрессируют CD8.

Термин «В-клетки» относится к клеткам В-клеточной линии дифференцировки. «Клетки В-клеточной линии дифференцировки» относятся к клеткам, которые демонстрируют по меньшей мере одну фенотипическую характеристику В-клетки или ее предшественника или прогениторной клетки, которая отличает эти клетки от других лимфоидных клеток, а также клеток эритроидной или миелоидной линии дифференцировки. Такие фенотипические характеристики могут включать экспрессию одного или нескольких белков, специфичных для В-клеток (например, клеток, положительных по одному или нескольким из CD19<sup>+</sup>, CD72<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD21<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup>, CD72<sup>+</sup>, CD32b<sup>+</sup>, CD268<sup>+</sup>, CD269<sup>+</sup>, CD267<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup>, CD52<sup>+</sup>, CD138<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>, CD21<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD84<sup>+</sup>, CD257<sup>+</sup>, CD270<sup>+</sup>, CD37<sup>+</sup> и CD74<sup>+</sup>), или физиологический, морфологический, функциональный или иммунологический признак, специфичный для В-клетки. Например, клетки В-клеточной линии дифференцировки могут представлять собой прогениторные клетки или клетки-

предшественники, коммитированными в В-клеточную линию (например, пре-про-В-клетки, про-В-клетки и пре-В-клетки); незрелые и инактивированные В-клетки или зрелые и функциональные или активированные В-клетки. Таким образом, «В-клетки» включают наивные В-клетки, плазматические клетки, регуляторные В-клетки, В-клетки маргинальной зоны, фолликулярные В-клетки, лимфоплазматоидные клетки, плазмобластные клетки и В-клетки памяти (например, CD27+, IgD-).

Термин «цитотоксическая активность», также обозначаемый «цитолитической активностью» по отношению к клетке (например, Т-клетке), которая экспрессирует на своей поверхности иммунный рецептор (например, CAR), означает, что при антигенспецифической передаче сигнала (например, через CAR) клетка индуцирует апоптоз целевой клетки. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическая клетка может индуцировать апоптоз в целевой клетке посредством высвобождения цитотоксинов, таких как перфорин, гранзим и гранулизин, из гранул. Перфорины внедряются в мембрану целевой клетки и образуют поры, которые позволяют воде и солям быстро проникать в целевую клетку. Гранзимы представляют собой сериновые протеазы, индуцирующие апоптоз в целевой клетке. Гранулизин также способен образовывать поры в мембране целевой клетки и является провоспалительной молекулой. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическая клетка может индуцировать апоптоз в целевой клетке посредством взаимодействия лиганда Fas, который активируется на Т-клетке в результате антигенспецифической передачи сигнала, с молекулами Fas, экспрессируемыми на целевой клетке. Fas представляет собой сигнализирующую об апоптозе рецепторную молекулу на поверхности ряда различных клеток.

«Заболевание» представляет собой состояние здоровья субъекта, при котором субъект не может поддерживать гомеостаз, и при котором, если заболевание не регрессирует, здоровье субъекта продолжает ухудшаться. В отличие от этого, «нарушение» или «нежелательное состояние» у субъекта представляет собой состояние здоровья, при котором субъект способен поддерживать гомеостаз, но при котором состояние здоровья субъекта менее благоприятно, чем оно было бы при отсутствии нарушения или нежелательного состояния. При отсутствии лечения нарушение или нежелательное состояние не обязательно приводит к дальнейшему ухудшению состояния здоровья субъекта.

Термин «рак», используемый в данном документе, определяется как заболевание, характеризующееся быстрым и неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Аберрантные клетки могут образовывать солидные опухоли или представлять собой гематологическое злокачественное новообразование. Раковые клетки могут

распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части тела. Примеры различных видов рака включают без ограничения рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почки, рак печени, рак головного мозга, лимфому, лейкоз, рак легких и т.п.

5  
10 Термины «субъект», «пациент» и «индивидуум» используются в данном документе взаимозаменяемо и предназначены для включения живых организмов, у которых может быть индуцирован иммунный ответ (например, млекопитающих). Примеры субъектов включают людей, приматов, коров, лошадей, коз, овец, собак, кошек, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, свиней и их трансгенные виды.

15 «Адоптивная клеточная иммунотерапия» или «адоптивная иммунотерапия» относится к введению встречающихся в природе или генно-инженерных иммунных клеток, специфичных к патологическому антигену (например, Т-клеток). Адоптивная клеточная иммунотерапия может быть аутологичной (иммунные клетки получают от реципиента), аллогенной (иммунные клетки получают от донора того же вида) или сингенной (иммунные клетки получают от донора, генетически идентичного реципиенту).

«Аутологичный» относится к трансплантату (например, органу, ткани, клеткам), полученному от того же субъекта, которому он позже будет повторно введен.

20 «Аллогенный» относится к трансплантату, полученному от другого субъекта того же вида.

«Терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» лентивирусного вектора или клетки, трансдуцированной лентивирусным вектором, как описано в данном документе (например, Т-клетки, экспрессирующей CAR, кодируемый трансгеном лентивирусного вектора), относится к такому количеству лентивирусных частиц или клеток, которое достаточно для того, чтобы привести к нормализации одного или нескольких симптомов заболевания, нарушения или нежелательного состояния, подлежащих лечению.

30 «Лечить» или «лечение» или «нормализовать» относится к медикаментозному лечению заболевания, нарушения или нежелательного состояния субъекта. В целом, подходящую дозу или схему лечения, включающую лентивирусный вектор или клетку, экспрессирующую CAR по настоящему изобретению, вводят в количестве, достаточном для достижения терапевтического или профилактического эффекта. Терапевтический или профилактический/превентивный эффект включает улучшение клинического результата; уменьшение или облегчение симптомов, ассоциированных с заболеванием, нарушением или нежелательным состоянием; уменьшение частоты возникновения симптомов;

35



улучшение качества жизни; более длительный статус без признаков заболевания; уменьшение степени заболевания, нарушения или нежелательного состояния; стабилизацию болезненного состояния; замедление прогрессирования заболевания; ремиссию; выживание; длительное выживание; или любую их комбинацию.

5 Термин «противоопухолевый эффект» относится к биологическому эффекту, который может проявляться уменьшением объема опухоли, уменьшением количества опухолевых клеток, уменьшением количества метастазов, увеличением продолжительности жизни или нормализацией различных физиологических симптомов, ассоциированных с раковым состоянием. «Противоопухолевый эффект» может также  
10 проявляться путем предупреждения гематологического злокачественного новообразования или образования опухоли.

Дополнительные определения представлены в настоящем изобретении.

#### Лентивирусный вектор

Лентивирусы представляют собой род ретровирусов, которые обычно вызывают  
15 медленно развивающиеся заболевания вследствие их способности внедряться в геном хозяина. Модифицированные лентивирусные геномы можно использовать в качестве вирусных векторов для доставки нуклеиновых кислот в клетку-хозяина.

Настоящее изобретение относится к самоинактивирующимся лентивирусным векторам («LVV»), которые включают вирусную оболочку, содержащую мутантный  
20 гетерологичный оболочечный белок и определяющую тропизм молекулу (также обозначаемую «нацеливающим белком»). LVV, описанный в данном документе, дополнительно содержит трансген, при этом LVV способен специфически связываться с целевой иммунной клеткой и трансдуцировать целевую иммунную клетку, так что трансген экспрессируется иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления LVV может  
25 нести более одного трансгена. В дополнительных конкретных вариантах осуществления трансген кодирует химерный антигенный рецептор (CAR).

#### Мутантный вирусный оболочечный белок

Лентивирусные векторы, описанные в данном документе, псевдотипируются с  
30 помощью мутантного гетерологичного вирусного оболочечного белка, который в отсутствие мутации опосредует как клеточное прикрепление, так и слияние с мембраной. В конкретных вариантах осуществления мутантный оболочечный белок включает по меньшей мере одну мутацию, которая ингибирует способность оболочечного белка связывать свою интактную мишень, сохраняя при этом фузогенные свойства оболочечного белка. В конкретных вариантах осуществления гетерологичный оболочечный белок  
35 представляет собой G-белок вируса везикулярного стоматита («VSV-G», «оболочечный

белок VSV-G» или «белок VSV-G»), который включает одну или несколько мутаций, ингибирующих связывание VSV-G с рецептором липопротеинов низкой плотности («LDL-R»), сохраняя при этом фузогенную функцию белка VSV-G.

Касательно способности оболочечного белка связывать свою интактную мишень, термины «ингибировать» и «ингибирует» охватывают как полное устранение связывания оболочечного белка с его интактной мишенью, так и значительное снижение связывания оболочечного белка с его интактной мишенью. В конкретных вариантах осуществления «значительное снижение» относится к снижению, выбранному из снижения на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 15% и по меньшей мере 10% при связывании с интактной мишенью.

Последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности, представленные в таблице 10, представляют собой эталонные последовательности для оболочечного белка VSV-G дикого типа и примеры мутантных оболочечных белков VSV-G в соответствии с настоящим изобретением. SEQ ID NO: 77 представляет собой эталонную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую оболочечный белок VSV-G, а SEQ ID NO: 78 представляет собой аминокислотную последовательность эталонного оболочечного белка VSV-G. SEQ ID NO: 87 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую расщепляемый сигнальный пептид эталонного оболочечного белка VSV-G. SEQ ID NO: 88 представляет собой аминокислотную последовательность расщепляемого сигнального пептида эталонного оболочечного белка VSV-G. SEQ ID NO: 89 представляет собой эталонную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую оболочечный белок VSV-G, без сигнальной последовательности. SEQ ID NO: 90 представляет собой аминокислотную последовательность эталонного оболочечного белка VSV-G без сигнальной последовательности. Положение и природа мутаций VSV-G, раскрытых в данном документе, описаны со ссылкой на последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотную последовательность, представленные SEQ ID NO: 77 без N-концевой сигнальной последовательности SEQ ID NO: 87 и SEQ ID NO: 78 без N-концевой сигнальной последовательности SEQ ID NO: 88 соответственно. Таким образом, ссылка на положение 1 аминокислотной последовательности env VSV-G для идентификации положения мутации относится к положению 17 аминокислотной последовательности VSV-G дикого типа SEQ ID NO: 78, которое представляет собой лизин (K), или положению 1

аминокислотной последовательности VSV-G дикого типа SEQ ID NO: 90.

В некоторых вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G включает мутацию в аминокислотном положении H8, N9, Q10, K47, K50, A51, S183, S179, N180, I182, M184, Y209, I347, T350, T352, E353, R354, вставку TT между N9 и Q10, вставку GGS между H8 и N9, вставку GGS между N9 и Q10, вставку TT между N208 и Y209, вставку GGS между P46 и K47, вставку GGS между N208 и Y209 и/или делецию остатков 1-8. В определенных вариантах осуществления оболочечный белок VSV-G включает две или более мутаций в аминокислотных положениях, выбранных из H8, N9, Q10, K47, K50, A51, S183, S179, N180, I182, M184, Y209, I347, T350, T352, E353, R354, вставки TT между N9 и Q10, вставки GGS между H8 и N9, вставки GGS между N9 и Q10, вставки TT между N208 и Y209, вставки GGS между P46 и K47, вставки GGS между N208 и Y209 и делеции остатков 1-8. В других вариантах осуществления оболочечный белок VSV-G включает три или более мутаций в аминокислотных положениях, выбранных из H8, N9, Q10, K47, K50, A51, S183, S179, N180, I182, M184, Y209, I347, T350, T352, E353, R354, вставки TT между N9 и Q10, вставки GGS между H8 и N9, вставки GGS между N9 и Q10, вставки TT между N208 и Y209, вставки GGS между P46 и K47, вставки GGS между N208 и Y209 и делеции остатков 1-8. В других вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G содержит мутацию H8A, K47A, K47Q, Y209A, R354A и/или R354Q. В других вариантах осуществления оболочечный белок VSV-G включает одну или несколько мутаций, выбранных из N9, Q10, K50, A51, S183, S179, N180, I182, M184, I347, T350, T352 и E353, вставки TT между N9 и Q10, вставки GGS между H8 и N9, вставки GGS между N9 и Q10, вставки TT между N208 и Y209, вставки GGS между P46 и K47, вставки GGS между N208 и Y209 и делеции остатков 1-8. В еще одних вариантах осуществления оболочечный белок VSV-G включает две или более мутации, выбранные из мутаций в одном или нескольких из N9, Q10, K50, A51, S183, S179, N180, I182, M184, I347, T350, T352 и E353, вставки TT между N9 и Q10, вставки GGS между H8 и N9, вставки GGS между N9 и Q10, вставки TT между N208 и Y209, вставки GGS между P46 и K47, вставки GGS между N208 и Y209 и делеции остатков 1-8. В некоторых вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G выбран из одной или нескольких мутаций H8A, N9A, Q10A, K47A, K47Q, N180A, I182A, Y209A, T352A, T352W, E353A, R354A и R354Q. В некоторых вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G выбран из одной или нескольких мутаций H8A, K47A, K47Q, Y209A, R354A и R354Q. В некоторых вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G содержит мутацию K47 и мутацию R354. В некоторых вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G содержит мутацию K47Q и мутацию R354A. В некоторых вариантах осуществления

мутантный оболочечный белок VSV-G содержит мутацию N180, мутацию I182, мутацию T352 и мутацию E353. В некоторых вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G содержит мутацию N180A, мутацию I182A, мутацию T352A и мутацию E353A. В некоторых вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G  
5 содержит мутацию T352 и мутацию E353. В дополнительных вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G содержит мутацию T352W и мутацию E353A. В некоторых вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G содержит мутацию N9, мутацию Q10 и мутацию N180. В некоторых вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G содержит мутацию N9A, мутацию Q10A и мутацию  
10 N180A. В некоторых вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G содержит вставку GGS между H8 и N9 и вставку GGS между N9 и Q10. В некоторых вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G содержит вставку TT между N9 и Q10. В некоторых вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G содержит вставку GGS между P46 и K47. В других вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G описан в Nikolic et al., “Structural basis for the  
15 recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein.” *Nature Comm.*, 2018, 9:1029, соответствующие раскрытия которой включены в данный документ посредством ссылки.

В конкретных вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV  
20 содержит мутацию K47Q и мутацию R354A. В конкретных вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 74.

В конкретных вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV  
25 содержит мутацию N180A, мутацию I182A, мутацию T352A и мутацию E353A. В конкретных вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 93.

В конкретных вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV  
30 содержит мутацию T352W и мутацию E353A. В конкретных вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 95.

В конкретных вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV  
35 содержит мутацию N9A, мутацию Q10A Мутант N180A. В конкретных вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 97.

В конкретных вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV

содержит мутацию по типу вставки TT между N9 и Q10. В конкретных вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 99.

5 В конкретных вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV содержит мутацию по типу вставки GGS между P46 и K47. В конкретных вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 101.

10 В конкретных вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV содержит вставку GGS между H8 и N9 и вставку GGS между N9 и Q10. В конкретных вариантах осуществления мутантный оболочечный белок VSV-G имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 103.

#### Нацеливающий белок

Нацеливающий белок представляет собой мембраносвязанный белок, отображаемый на вирусной оболочке, и содержит внеклеточный домен, который содержит нацеливающий на лимфоциты домен и трансмембранный домен. Нацеливающий на лимфоциты домен представляет собой любой белок или пептид, который имеет аминокислотную последовательность и является партнером по связыванию целевой молекулы или лиганда (например, когнатного белка или лиганда) на клеточной поверхности целевого лимфоцита. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий на лимфоциты домен представляет собой нацеливающий на Т-клетки домен. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий на лимфоциты домен представляет собой нацеливающий на НК-клетки домен. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий на лимфоциты домен представляет собой нацеливающий на В-клетки домен. Например, в некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен нацеливающего белка включает нацеливающий на лимфоциты домен, который специфически связывает белок или лиганд на поверхности определенной популяции клеток, такой как популяция лимфоцитов, характеризующаяся наличием целевого белка или лиганда на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий на лимфоциты домен нацелен на конкретный тип лимфоцитов, таких как, например, Т-клетки, В-клетки или естественные клетки-киллеры (NK). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий белок дополнительно содержит внеклеточный линкер или шарнирный домен, расположенный между трансмембранным доменом и внеклеточным доменом.

35 В некоторых вариантах осуществления нацеливающий белок представляет собой полноразмерный белок или рецептор клеточной поверхности, где каждый компонент (например, каждый из внеклеточного домена, трансмембранного домена и

внутриклеточного домена) получен из одного белка или рецептора. В других вариантах осуществления нацеливающий белок представляет собой химерный белок, имеющий по меньшей мере два компонента, происходящие из другого белка или рецептора. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий белок получен от видов млекопитающих, включая человека, приматов, коров, лошадей, коз, овец, собак, кошек, мышей, крыс, кроликов, морских свинок и свиней. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий белок представляет собой полностью человеческую последовательность. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий белок представляет собой химерную последовательность, содержащую компоненту(ы) человеческой последовательности и компоненту(ы) другого вида или синтетическую(ие) компоненту(ы). В некоторых вариантах осуществления химерный нацеливающий белок может представлять собой полностью синтетический белок. В других вариантах осуществления химерный нацеливающий белок может включать одно или несколько из внеклеточного домена, внеклеточного связывающего домена, трансмембранного домена, внутриклеточного домена, шарнирного домена или линкера, который представляет собой полностью синтетический белок.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий на лимфоциты домен содержит антитело. В таких вариантах осуществления внеклеточный нацеливающий домен может представлять собой полноразмерное антитело, фрагмент антитела, нанотело или одноцепочечный фрагмент Fv (scFv).

В конкретных вариантах осуществления нацеливающая молекула включает нацеливающий на Т-клетки домен, который специфически связывается с поверхностным Т-клеточным маркером, включая, например, Т-клеточный антиген, поверхностный Т-клеточный рецептор или любой другой белок, присутствующий на поверхности целевой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий белок специфически связывается с Т-клеточным маркером, выбранным из CD3, CD28, CD80, 4-1BB, AhR, CD3, CD2, CD7, CD4, CD8, CD25, CD44, CD45RA, CD47, CD62L, CD69, CD94, CD95, CD127, CD161, CD183 (CXCR3), CD184 (CXCR4), CD185 (CXCR5), CD193 (CCR3), CD194 (CCR4), CD195 (CCR5), CD196 (CCR6), CD197 (CCR7), CCR10, PD-1, TCR $\alpha/\beta$ , CD5, CD27, CD45RO, CD45RB, CD57, CD103, CD122, P2RX7, TIGIT, LAG-3, TIM-3, IL6ST и любой их комбинации.

В дополнительных вариантах осуществления нацеливающий белок специфически связывается с  $\gamma\delta$  Т-клеточным маркером, выбранным из  $\gamma\delta$  TCR, Vdelta1, Vdelta2, NKG2D (KLRK1, CD314) и любой их комбинации.

В других вариантах осуществления нацеливающий белок специфически связывается

с NK-T-клеточным маркером, выбранным из инвариантного TCR (Va24-Ja18), CD185 (CXCR5), CXCR6, IL-21R и любой их комбинации.

В других вариантах осуществления нацеливающий белок специфически связывается с маркером клеток MAIT, выбранным из Va7.2, Ja33, CXCR6, IL-18R, KLRB1 (CD161), VLA4 (альфа4-бета1-интегрин) и любой их комбинации.

В других вариантах осуществления нацеливающий белок специфически связывается с NK-клеточным маркером, выбранным из CD56, NKp46, CD16, KIR(s), белков NKG2 (например, NKG2D (KLRK1, CD314)), KLRB1 (CD161), KLRD1 (cd94), IL2Rb (CD122), IL-21R, SLAMF6 (CD352), SLAMF7 (CD319), IL-18R и любой их комбинации.

В других вариантах осуществления нацеливающий белок специфически связывается с B-клеточным маркером, выбранным из CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD38, CD40, CD72, CD32b, CD268, CD269, CD267, CD86, CD80, CD52, CD138, CD27, CD28, CD23, CD84, CD257, CD270, CD37, CD74 и CD269 и любой их комбинации.

В вариантах осуществления нацеливающий белок специфически связывается с лимфоцитарным маркером (например, B-клеточным и T-клеточным), выбранным из CD80, CD27, CD28 и любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающего белка линкер расположен между трансмембранным доменом и нацеливающим на лимфоциты доменом. Линкер представляет собой аминокислотный линкер и может представлять собой жесткий линкер, гибкий линкер или олигомеризованный линкер. Жесткий линкер представляет собой аминокислотную последовательность, которая лишена гибкости (например, может содержать по меньшей мере один пролин). В некоторых вариантах осуществления жесткий линкер содержит стебель рецептора фактора роста тромбоцитов (PDGFR) или стебель CD8a. В некоторых вариантах осуществления стебель PDGFR содержит аминокислотную последовательность, содержащую AVGQDTQEVIVVPHSLPFK (SEQ ID NO: 104). В некоторых вариантах осуществления стебель PDGFR содержит аминокислотную последовательность, содержащую ASAKPTTTPAPRPPTPARTIASQPLSLRPEAARPAAGGAVHTRGLDFAK (SEQ ID NO: 105).

Гибкий линкер представляет собой аминокислотную последовательность, которая имеет много степеней свободы (например, может содержать множество аминокислот с небольшими боковыми цепями, например, глицин или аланин). В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер содержит аминокислотную последовательность, содержащую GAPGAS. В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер содержит аминокислотную последовательность, состоящую из GAPGSGGGSGGGGSAS (SEQ ID

NO: 106). В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер содержит аминокислотную последовательность, содержащую GGGGS. В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер содержит аминокислотную последовательность, содержащую GGGS. В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер содержит аминокислотную последовательность, содержащую (GAPGAS)<sub>N</sub>, (G<sub>3</sub>S)<sub>N</sub> или (G<sub>4</sub>S)<sub>N</sub>, где N представляет собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше.

Олигомеризованный линкер представляет собой аминокислоту, которая может олигомеризоваться с другой родственной аминокислотой. В некоторых вариантах осуществления олигомеризованный линкер представляет собой аминокислотную последовательность, которая может образовывать димер, тример или тетрамер. В некоторых вариантах осуществления олигомеризованный линкер содержит шарнирный домен IgG4 (например, ESKYGPPCPPCPAVGQDTQEVIVVPHSLPFK (SEQ ID NO: 107)). В некоторых вариантах осуществления олигомеризованный линкер содержит аминокислотную последовательность, которая может образовывать тетрамерную свернутую спираль (например, ASGGGGSGELAAIKQELAAIKKELAAIKWELAAIKQGAG (SEQ ID NO: 108)). В некоторых вариантах осуществления олигомеризованный линкер содержит аминокислотную последовательность, которая может образовывать димерную свернутую спираль (например, ASESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 109)).

Нацеливающий белок обычно содержит сигнальную последовательность (также обозначаемую сигнальным пептидом последовательности локализации). Сигнальная последовательность может располагаться на N- или C-конце нацеливающего белка. Функция сигнальной последовательности заключается в перемещении нацеливающего белка к мембране, которая выступает в качестве оболочки лентивирусного вектора. Неограничивающие примеры сигнальных последовательностей, которые могут быть включены в нацеливающий белок, как описано в данном документе, включают лидерную последовательность Ig каппа (например, лидерную последовательность мышинового Ig каппа, содержащую: METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 110)), последовательность сигнального пептида CD8a (например, сигнальный пептид CD8a, содержащий: MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 12)), и последовательность сигнального пептида B2M (например, последовательность сигнального пептида B2M, содержащую MSRSVALAVLALLSLSGLEA (SEQ ID NO: 123)). В определенных вариантах осуществления зрелый нацеливающий белок имеет частично расщепленную сигнальную последовательность, которая сохраняет одну или несколько аминокислот полноразмерной сигнальной последовательности. В других вариантах осуществления расщепление сигнальной пептидазой приводит к полному удалению сигнальной последовательности, что



приводит к образованию зрелого нацеливающего белка, у которого полностью отсутствует сигнальная последовательность.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий белок представляет собой белок CD80. Если нацеливающий белок представляет собой белок CD80, он может содержать внеклеточный домен в соответствии с SEQ ID NO: 6. В таких вариантах осуществления белок CD80 может содержать сигнальный пептид в соответствии с SEQ ID NO: 4 и трансмембранный и внутриклеточный домен в соответствии с SEQ ID NO: 8. В конкретном варианте осуществления нацеливающий белок CD80, включенный в лентивирусный вектор, как описано в данном документе, содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 2 без сигнального пептида SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления, где нацеливающий белок представляет собой белок CD80, он может содержать внеклеточный домен, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 6. В таких вариантах осуществления белок CD80 может содержать сигнальный пептид, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 4, и/или трансмембранный и внутриклеточный домен, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 8. В конкретном варианте осуществления нацеливающий белок CD80, включенный в лентивирусный вектор, как описано в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 2 без сигнального пептида SEQ ID NO: 4.

**ТАБЛИЦА 1. Нацеливающая на Т-клетки молекула CD80**

Полноразмерная молекула	
Нуклеотид	Аминокислота (сигнальный пептид подчеркнут)
ATGGGTCATACACGCCGCCAAGGAAC	<u>MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVL</u> AGL
CTCACCATCTAAGTGCCCATATCTGAA	<u>SHFCSGVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSV</u>
TTTCTTTCAACTTCTCGTGCTGGCGGG	EELAQTRIWQKEKMKMVL TMMSGDMN
GCTCAGTCATTTCTGCAGTGGGGTCAT	IWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEG
TCACGTTACTAAAGAGGTCAAGGAGG	TYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVK

<p>TCGCAACATTGAGTTGTGGCCATAAC  GTATCAGTTGAAGAACTCGCGCAGAC  ACGGATTTACTGGCAAAGGAAAAGA  AGATGGTGTGACAATGATGAGCGGT  GACATGAACATTTGGCCAGAGTACAA  AAATCGAACGATATTCGATATAACCA  ATAACTTGTCATAGTAATACTTGCCT  TGCGACCTTCTGACGAGGGAACGTAT  GAATGTGTAGTGCTTAAGTATGAAAA  AGATGCCTTTAAGCGGGAACACTTGG  CTGAGGTTACACTCTCCGTTAAGGCG  GACTTTCCTACGCCGTCTATATCCGAC  TTCGAGATACCCACTTCTAACATTCGA  CGCATCATTTGCTCAACCTCAGGTGGT  TTCCAGAGCCTCACTTGAGCTGGCTG  GAGAATGGCGAAGAACTTAACGCAAT  CAATACCACGGTGTCCCAAGACCCGG  AGACAGAGCTGTACGCCGTGTCATCC  AAACTGGATTTTAACATGACGACAAA  TCATAGTTTCATGTGTCTGATCAAATA  TGGGCATCTCAGGGTGAATCAGACTT  TTAATTGGAACACTACCAAACAAGAG  CACTTCCAGATAATCTGTTGCCAAGC  TGGGCGATAACTCTTATCTCCGTCAAC  GGTATCTTCGTAATTTGCTGCCTCACC  TATTGTTTCGCGCCTCGATGCCGAGAA  (SEQ ID NO: 1)</p>	<p>ADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEP  HLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYA  VSSKLDNFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVN  QTFNWNTTKQEHFPDNLPSWAITLISV  NGIFVICCLTYCFAPRCRE (SEQ ID NO:  2)</p>
<b>Сигнальный пептид CD80</b>	
<p><b>Нуклеотид</b></p> <p>ATGGGTCATACACGCCGCCAAGGAAC  CTCACCATCTAAGTGCCCATATCTGAA  TTTCTTTCAACTTCTCGTGCTGGCGGG  GCTCAGTCATTTCTGCAGTGGGGTTC  (SEQ ID NO: 3)</p>	<p><b>Аминокислота</b></p> <p>MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLGL  SHFCSGV (SEQ ID NO: 4)</p>
<b>Внеклеточный домен (ECD) CD80</b>	

<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
ATTCACGTTACTAAAGAGGTCAAGGA GGTCGCAACATTGAGTTGTGGCCATA ACGTATCAGTTGAAGAACTCGCGCAG ACACGGATTTACTGGCAAAAGGAAAA GAAGATGGTGTGACAATGATGAGCG GTGACATGAACATTTGGCCAGAGTAC AAAAATCGAACGATATTCGATATAAC CAATAACTTGTCCATAGTAATACTTGC CTTGCGACCTTCTGACGAGGGAACGT ATGAATGTGTAGTGCTTAAGTATGAA AAAGATGCCTTTAAGCGGGAACACTT GGCTGAGGTTACACTCTCCGTTAAGG CGGACTTTCCTACGCCGTCTATATCCG ACTTCGAGATACCCACTTCTAACATTC GACGCATCATTTGCTCAACCTCAGGT GGTTTCCCAGAGCCTCACTTGAGCTG GCTGGAGAATGGCGAAGAАCTTAACG CAATCAATACCACGGTGTCCCAAGAC CCGGAGACAGAGCTGTACGCCGTGTC ATCCAAACTGGATTTTAAACATGACGA CAAATCATAGTTTCATGTGTCTGATCA AATATGGGCATCTCAGGGTGAATCAG ACTTTTAATTGGAACACTACCAAACA AGAGCACTTCCCAGATAATCTGTTGC CAAGC (SEQ ID NO:5)	IHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTR IYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKN RTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVL KYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFPTPSIS DFEIPTS NIRRIICSTSGGFPEPHLSWLEN GEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDF NMTTNHSFMCLIKYGH LRVNQTFNWNT TKQEHFPD NLLPS (SEQ ID NO: 6)
<b>Трансмембранный и внутриклеточный домен CD80</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
TGGGCGATAACTCTTATCTCCGTCAAC GGTATCTTCGTAATTTGCTGCCTCACC TATTGTTTCGCGCCTCGATGCCGAGAA (SEQ ID NO: 7)	WAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRE (SEQ ID NO: 8)

В некоторых вариантах осуществления лентивирусные векторы, содержащие нацеливающий белок CD80, демонстрируют усиленную трансдукцию CD4 Т-клеток по сравнению с CD8 Т-клетками в относительном процентном отношении к общему

количеству CD4 и CD8 Т-клеток по сравнению с трансдукцией стандартным LVV. Используемый в данном документе «стандартный лентивирусный вектор» или «стандартный LVV» относится к лентивирусному вектору, который не содержит мутантный оболочечный белок VSV-G и нацеливающий на лимфоциты белок по  
5 настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления стандартный LVV образуется с использованием системы упаковки LVV 3-го поколения. В некоторых вариантах осуществления лентивирусные векторы, содержащие нацеливающий белок CD80, усиливают трансдукцию CD4 Т-клеток по сравнению с CD8 Т-клетками в относительном процентном отношении к общему количеству CD4 и CD8 Т-клеток на по  
10 меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или больше по сравнению со стандартным LVV.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий белок представляет собой нацеливающий антитело к CD3 белок. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий на CD3 белок представляет собой антитело или его связывающий фрагмент,  
15 включая, например, scFv. Если нацеливающий белок представляет собой нацеливающий на CD3 белок, он может содержать scFv к CD3, имеющий переменную область легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 14, линкер G<sub>3</sub>S в соответствии с SEQ ID NO: 16 и переменную область тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий на CD3 белок содержит scFv к CD3, имеющий  
20 переменную область легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 115, линкер G<sub>3</sub>S в соответствии с SEQ ID NO: 16 и переменную область тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 113. Нацеливающий на CD3 белок, как описано в данном документе, может содержать сигнальный пептид в соответствии с SEQ ID NO: 12 и шарнирный и трансмембранный домен в соответствии с SEQ ID NO: 20. В конкретном варианте  
25 осуществления нацеливающий на CD3 белок, включенный в лентивирусный вектор, как описано в данном документе, содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 10 без сигнального пептида SEQ ID NO: 12. В другом конкретном варианте осуществления нацеливающий на CD3 белок, включенный в лентивирусный вектор, как описано в данном документе, содержит аминокислотную  
30 последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 117 или SEQ ID NO: 117 без сигнального пептида SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления, где нацеливающий белок представляет собой нацеливающий на CD3 белок, он может содержать scFv к CD3, имеющий переменную область легкой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%,  
35 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется

идентичностью с SEQ ID NO: 14, и вариабельную область тяжелой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 18. Нацеливающий на CD3 белок, как описано, может содержать сигнальный пептид, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 12, и шарнирный и трансмембранный домен, которые на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуются идентичностью с SEQ ID NO: 20. В конкретном варианте осуществления нацеливающий на CD3 белок, включенный в лентивирусный вектор, как описано в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуются идентичностью с SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 10 без сигнального пептида SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления, где нацеливающий белок представляет собой нацеливающий на CD3 белок, он может содержать scFv к CD3, имеющий вариабельную область легкой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 115, и вариабельную область тяжелой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 113. Нацеливающий на CD3 белок, как описано, может содержать сигнальный пептид, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 12, и шарнирный и трансмембранный домен, которые на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуются идентичностью с SEQ ID NO: 20. В конкретном варианте осуществления нацеливающий на CD3 белок, включенный в лентивирусный вектор, как описано в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуются идентичностью с SEQ ID NO: 117 или SEQ ID NO: 117 без сигнального пептида SEQ ID NO: 12.

**ТАБЛИЦА 2. Нацеливающие на CD3 Т-клеток молекулы**

Полноразмерная молекула антитела к CD3 (УСТН1)	
Нуклеотид	Аминокислота (сигнальный пептид)

	подчеркнут)
ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTC	<u>MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQ</u>
CTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC	TTSSLSASLGDRVTISCRASQDIRNYLN
GCCAGGCCGGACATCCAGATGACCCA	WYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSK
GACCACCTCCTCCCTGTCTGCCTCTCTG	FSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQ
GGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAG	GNTLPWTFAGGTKLEIKRAGGGSGGGS
GGCAAGTCAGGACATTAGAAATTATTT	GGGSGGGSEVQLQQSGPELVKPGASM
AAACTGGTATCAACAGAAACCAGATG	KISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKN
GAACTGTAAACTCCTGATCTACTACA	LEWMGLINPYKGVSTYNQKFKDKATL
CATCAAGATTAACTCAGGAGTCCCAT	TVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCA
CAAAGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGA	RSGYYGDSDWYFDVWGAGTTVTVSST
ACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAAC	TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA
CTGGAGCAAGAGGATATTGCCACTTAC	AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG
TTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCG	VLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 10)
TGGACGTTGCTGGAGGCACCAAGCTG	
GAAATCAAACGGGCTGGAGGCGGTAG	
TGGCGGTGGATCAGGTGGAGGCAGCG	
GTGGCGGATCTGAGGTGCAGCTCCAGC	
AGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTG	
GAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGG	
CTTCTGGTACTCATTCACTGGCTACA	
CCATGAACTGGGTGAAGCAGAGTCAT	
GGAAAGAACCTTGAGTGGATGGGACT	
TATTAATCCTTACAAAGGTGTTAGTAC	
CTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGG	
CCACATTAAGTGTAGACAAGTCATCCA	
GCACAGCCTACATGGAACCTCCTCAGTC	
TGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATT	
ACTGTGCAAGATCGGGGTACTACGGTG	
ATAGTGACTGGTACTTCGATGTCTGGG	
GCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCT	
CAACCACtACaCCAGCaCCtaGACCACCA	
ACACCTGCGCCaACCATCGCaTCGCAGC	
CaCTGTCTCTGCGCCCAGAGGCaTGCCG	
GCCAGCaGctGGGGGCGCAGTGCACAC	

aAGGGGGCTGGACTTCGCaTGTGATAT CTACATCTGGGCaCCaTTGGCaGGGACT TGTGGGGTCCCTTCTCCTGTCACCTGGTT ATCACCTTTACTGC (SEQ ID NO: 9)	
<b>Сигнальный пептид CD8a</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTC CTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC GCCAGGCCG (SEQ ID NO: 11)	MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:12)
<b>Варибельная область легкой цепи нацеливающего на CD3 белка (UCHL1)</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
GACATCCAGATGACCCAGACCACCTCC TCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGA GTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAG GACATTAGAAATTATTTAAACTGGTAT CAACAGAAACCAGATGGAACCTGTAA ACTCCTGATCTACTACACATCAAGATT ACACTCAGGAGTCCCATCAAAGTTCAG TGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTC TCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGA GGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACA GGGTAATACGCTTCCGTGGACGTTTCGC TGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC GGGCT (SEQ ID NO: 13)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDI RNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHS GVPSKFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAT YFCQQGNTLPWTFAGGKLEIKRA (SEQ ID NO:14)
<b>Линкер G3S</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
GGAGGCGGTAGTGGCGGTGGATCAGG TGGAGGCAGCGGTGGCGGATCT (SEQ ID NO: 15)	GGSGGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO:16)
<b>Варибельная область тяжелой цепи нацеливающего на CD3 белка (UCHL1)</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
GAGGTGCAGCTCCAGCAGTCTGGACCT GAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATG AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTAC	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGY SFTGYTMNWVKQSHGKNLEWMGLINP YKGVSTYNQKFKDKATLTVDKSSSTAY

TCATTCACTGGCTACACCATGAACTGG GTGAAGCAGAGTCATGGAAAGAACCT TGAGTGGATGGGACTTATTAATCCTTA CAAAGGTGTTAGTACCTACAACCAGA AGTTCAAGGACAAGGCCACATTAACT GTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTAC ATGGAACCTCCTCAGTCTGACATCTGAG GACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGA TCGGGGTACTACGGTGATAGTACTGG TACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACC ACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 17)	MELLSLTSEDSAVYYCARSGYYGDS WYFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 18)
<b>Шарнирная область и трансмембранный домен CD8a</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
ACCACTACACCAGCACCTAGACCACCA ACACCTGCGCCAACCATCGCATCGCAG CCTGTCTCTGCGCCAGAGGCATGC CGGCCAGCAGCTGGGGGCGCAGTGCA CACAAGGGGGCTGGACTTCGCATGTG ATATCTACATCTGGGCACCATTTGGCAG GGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCAC TGTTATCACCTTTACTGC (SEQ ID NO: 19)	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTC GVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 20)
<b>Варибельная область тяжелой цепи нацеливающего на CD3 белка (12F6)</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
CAAGTGCAGCTCCAGCAGAGCGGGCGC TGAGCTGGCCCGGCCGGCGCCAGCGT GAAGATGAGCTGTAAAGCCAGCGGCT ATACATTTACCAGCTACACCATGCACT GGGTCAAGCAGCGGCCTGGCCAGGGC CTGGAATGGATTGGATATATCAACCCC AGCAGCGGCTACACCAAGTACAACCA GAAATTC AAGGACAAGGCCACCCTGA CCGCCGACAAGAGCTCCTCAACAGCCT	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASG YTFTSYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINP SSGYTKYNQKFKDKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARWQDYDVYF DYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 113)



ACATGCAACTGAGCAGCCTGACCAGC GAGGATAGCGCCGTGTACTACTGCGCC AGATGGCAGGACTACGACGTGTACTTC GACTACTGGGGCCAAGGCACAACACT GACCGTGTCCAGC (SEQ ID NO: 112)	
<b>Варибельная область легкой цепи нацеливающего на CD3 белка (12F6)</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
CAGATCGTGCTGAGCCAGTCCCCAGCC ATCCTGTCTGCCAGCCCTGGCGAGAAG GTGACCATGACCTGCAGAGCCTCTTCT TCTGTTTCCTACATGCACTGGTATCAG CAAAAGCCCGGCAGCTCTCCTAAGCCT TGGATCTACGCCACAAGCAACCTGGCT AGCGGCGTGCTGCTCGCTTCAGCGGC AGCGGCAGCGGCACCAGCTACAGCCT GACCATCAGCAGAGTGGAAGCCGAGG ACGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGT GGTCCTCTAATCCTCCAACATTCGGCG GCGGCACCAAGCTGGAAACCAAAAGA (SEQ ID NO: 114)	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV SYMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASG VPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAAT YYCQQWSSNPPTFGGGTKLETKR (SEQ ID NO: 115)
<b>Полноразмерная молекула нацеливающего на CD3 белка (12F6)</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота (сигнальный пептид подчеркнут)</b>
ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTC CTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC GCCAGGCCGCAAGTGCAGCTCCAGCA GAGCGGCGCTGAGCTGGCCCGGCCCG GCGCCAGCGTGAAGATGAGCTGTAAA GCCAGCGGCTATACATTTACCAGCTAC ACCATGCACTGGGTCAAGCAGCGGCCT GGCCAGGGCCTGGAATGGATTGGATA TATCAACCCAGCAGCGGCTACACCAA GTACAACCAGAAATTCAAGGACAAGG CCACCCTGACCGCCGACAAGAGCTCCT	<u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u> QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASG YTFTSYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINP SSGYTKYNQKFKDKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARWQDYDVYF DYWGQGTTLTVSSGGGSGGGSGGGSG GGS QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV SYMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASG VPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAAT YYCQQWSSNPPTFGGGTKLETKRITTP

CAACAGCCTACATGCAACTGAGCAGC  
CTGACCAGCGAGGATAGCGCCGTGTA  
CTACTGCGCCAGATGGCAGGACTACG  
ACGTGTACTTCGACTACTGGGGCCAAG  
GCACAACACTGACCGTGTCCAGCGGA  
GGCGGTAGTGGCGGTGGATCAGGTGG  
AGGCAGCGGTGGCGGATCTCAGATCG  
TGCTGAGCCAGTCCCCAGCCATCCTGT  
CTGCCAGCCCTGGCGAGAAGGTGACC  
ATGACCTGCAGAGCCTCTTCTTCTGTTT  
CCTACATGCACTGGTATCAGCAAAAGC  
CCGGCAGCTCTCCTAAGCCTTGGATCT  
ACGCCACAAGCAACCTGGCTAGCGGC  
GTGCCTGCTCGCTTCAGCGGCAGCGGC  
AGCGGCACCAGCTACAGCCTGACCATC  
AGCAGAGTGGAAGCCGAGGACGCCGC  
CACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTC  
TAATCCTCCAACATTCGGCGGCGGCAC  
CAAGCTGGAAACCAAAAGAACCACTA  
CACCAGCACCTAGACCACCAACACCTG  
CGCCAACCATCGCATCGCAGCCACTGT  
CTCTGCGCCCAGAGGCATGCCGGCCAG  
CAGCTGGGGGCGCAGTGCACACAAGG  
GGGCTGGACTTCGCATGTGATATCTAC  
ATCTGGGCACCATTGGCAGGGACTTGT  
GGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATC  
ACCCTTTACTGC (SEQ ID NO: 116)

APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG  
AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL  
LSLVITLYC (SEQ ID NO: 117)

В дополнительных вариантах осуществления лентивирусный вектор в соответствии с настоящим описанием может содержать несколько нацеливающих белков или один нацеливающий белок, имеющий множество различных нацеливающих на лимфоциты доменов. Например, лентивирусные векторы, описанные в данном документе, могут содержать по меньшей мере два нацеливающих белка, при этом каждый из нацеливающих белков имеет нацеливающий на НК-клетки домен, который специфически связывает другую мишень. В другом примере лентивирусные векторы, описанные в данном документе, могут содержать по меньшей мере два нацеливающих белка, при этом каждый

из нацеливающих белков имеет нацеливающий домен на Т-клетки, который специфически связывает другую мишень. В другом примере лентивирусные векторы, описанные в данном документе, могут содержать по меньшей мере два нацеливающих белка, при этом каждый из нацеливающих белков имеет нацеливающий на В-клетки домен, который специфически связывает другую мишень. В еще одном примере лентивирусные векторы, описанные в данном документе, могут содержать по меньшей мере два нацеливающих белка, при этом первый нацеливающий белок имеет нацеливающий на Т-клетки домен и второй нацеливающий белок имеет нацеливающий на НК-клетки домен. В еще одном примере лентивирусные векторы, описанные в данном документе, могут содержать по меньшей мере два нацеливающих белка, при этом первый нацеливающий белок имеет нацеливающий на Т-клетки домен и второй нацеливающий белок имеет нацеливающий на В-клетки домен. В еще одном примере лентивирусные векторы, описанные в данном документе, могут содержать по меньшей мере два нацеливающих белка, при этом первый нацеливающий белок имеет нацеливающий на В-клетки домен и второй нацеливающий белок имеет нацеливающий на НК-клетки домен. В альтернативных вариантах осуществления лентивирусные векторы, описанные в данном документе, включают один нацеливающий белок, имеющий два или более различных нацеливающих на лимфоциты домена, два или более различных нацеливающих на Т-клетки домена, два или более различных нацеливающих на НК-клетки домена или два или более различных нацеливающих на В-клетки домена (например, биспецифический или мультиспецифический нацеливающий белок). В любых таких вариантах осуществления нацеливающие на Т-лимфоциты домены, включенные в нацеливающие белки, могут быть выбраны из любых описанных в данном документе. В еще одном примере лентивирусные векторы, описанные в данном документе, могут содержать по меньшей мере два нацеливающих белка, при этом первый нацеливающий белок имеет нацеливающий на лимфоциты домен и второй нацеливающий белок имеет нацеливающий на Т-клетки домен. В еще одном примере лентивирусные векторы, описанные в данном документе, могут содержать по меньшей мере два нацеливающих белка, при этом первый нацеливающий белок имеет нацеливающий на лимфоциты домен и второй нацеливающий белок имеет нацеливающий на В-клетки домен.

В иллюстративном варианте осуществления лентивирусный вектор, имеющий множество нацеливающих белков, содержит нацеливающий белок CD80 и нацеливающий на CD3 белок, как подробно описано в таблице 1 и таблице 2 соответственно. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий белок CD80 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 2 без сигнального пептида SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий на CD3

белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 10 без сигнального пептида SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий на CD3 белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 117 или SEQ ID NO: 117 без сигнального пептида SEQ ID NO: 12. Если лентивирусный вектор содержит нацеливающий белок CD80 и нацеливающий на CD3 белок, нацеливающие белки могут кодироваться отдельными векторами экспрессии, используемыми при получении лентивирусного вектора. В качестве альтернативы, как нацеливающий белок CD80, так и нацеливающий на CD3 белок, могут кодироваться на кассете тандемной экспрессии, обеспечивая одну кассету экспрессии в одном векторе экспрессии, который обеспечивает экспрессию обоих нацеливающих белков для продуцирования лентивирусного вектора. Иллюстративные варианты осуществления последовательностей нуклеиновой кислоты и соответствующих аминокислотных последовательностей для нацеливающего белка CD80 и нацеливающего на CD3 белка, экспрессируемых из одной и той же кассеты экспрессии, представлены в таблице 3. В таком варианте осуществления два нацеливающих белка могут быть связаны с помощью саморасщепляющегося пептида P2A. В таблице 3 представлена иллюстративная нуклеиновая кислота, которую можно использовать в кассете тандемной экспрессии, которая содержит связывающий белок CD80, связанный со связывающим CD3 белком посредством последовательности P2A. В конкретном варианте осуществления последовательность P2A кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 29, а аминокислотная последовательность последовательности P2A имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления кассета тандемной экспрессии, которая содержит связывающий белок CD80, связанный со связывающим CD3 белком, содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 21 или на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID: 21. В некоторых вариантах осуществления кассета тандемной экспрессии, которая содержит связывающий белок CD80, связанный со связывающим CD3 белком, кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 22 без сигнального пептида SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления кассета тандемной экспрессии, которая содержит связывающий белок CD80, связанный со связывающим CD3 белком, кодирует

аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризующуюся идентичностью с SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 22 без сигнального пептида SEQ ID NO: 24.

5 **ТАБЛИЦА 3. Коэкспрессируемые CD80 и нацеливающие на CD3 Т-клеток молекулы**

<b>Полноразмерная молекула</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота (сигнальный пептид подчеркнут)</b>
ATGGGTCATACACGCCGCCAAGGAAC	<u>MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVL</u> AG
CTCACCATCTAAGTGCCCATATCTGAA	<u>LSHFCSGV</u> IHVTKEVKEVATLSCGHNV
TTTCTTTCAACTTCTCGTGCTGGCGGG	VEELAQTRIWQKEKMKVLTMMSGD
GCTCAGTCATTTCTGCAGTGGGGTCAT	MNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPS
TCACGTTACTAAAGAGGTCAAGGAGG	DEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTL
TCGCAACATTGAGTTGTGGCCATAACG	SVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGG
TATCAGTTGAAGAACTCGCGCAGACAC	FPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPET
GGATTTACTGGCAAAGGAAAAGAAG	ELYAVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGH
ATGGTGTTGACAATGATGAGCGGTGAC	LRVNQTFNWNTTKQEHFPDNLPSWAI
ATGAACATTTGGCCAGAGTACAAAAA	TLISVNGIFVICCLTYCFAPRCREGSGAT
TCGAACGATATTCGATATAACCAATAA	NFSLLKQAGDVEENPGM <u>ALPVTALLL</u>
CTTGTCATAGTAATACTTGCCTTGCG	<u>PLALLLHAARP</u> DIQMTQTTSSLSASLGD
ACCTTCTGACGAGGGAACGTATGAATG	RVTISCRASQDIRNYLNWYQQKPDGTV
TGTAGTGCTTAAGTATGAAAAAGATGC	KLLIYYTSRLHSGVPSKFSGSGSGTDYS
CTTTAAGCGGGAACACTTGGCTGAGGT	LTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFAG
TACACTCTCCGTTAAGGCGGACTTTCC	GTKLEIKRAGGGSGGGSGGGSGGGSEV
TACGCCGTCTATATCCGACTTCGAGAT	QLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYST
ACCCACTTCTAACATTCGACGCATCAT	GYTMNWVKQSHGKNLEWMGLINPYK
TTGCTCAACCTCAGGTGGTTTCCCAGA	GVSTYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYME
GCCTCACTTGAGCTGGCTGGAGAATGG	LLSLTSEDSAVYYCARSGYYGDSDWYF
CGAAGAACTTAACGCAATCAATACCA	DVWGAGTTVTVSSTTPAPRPPTPAPTI
CGGTGTCCAAGACCCGGAGACAGAG	ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF
CTGTACGCCGTGTCATCCAAACTGGAT	ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
TTAACATGACGACAAATCATAGTTTC	(SEQ ID NO: 22)
ATGTGTCTGATCAAATATGGGCATCTC	
AGGGTGAATCAGACTTTTAATTGGAAC	
ACTACCAAACAAGAGCACTTCCCAGAT	

AATCTGTTGCCAAGCTGGGCGATAACT  
CTTATCTCCGTCAACGGTATCTTCGTA  
ATTTGCTGCCTCACCTATTGTTTCGCGC  
CTCGATGCCGAGAAGGCAGCGGGCGCC  
ACCAACTTCTCCCTGCTGAAGCAGGCC  
GGCGACGTGGAAGAAAACCCTGGCCC  
CATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCT  
CCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC  
CGCCAGGCCGGACATCCAGATGACCC  
AGACCACCTCCTCCCTGTCTGCCTCTCT  
GGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCA  
GGGCAAGTCAGGACATTAGAAATTATT  
TAAACTGGTATCAACAGAAACCAGAT  
GGAAGTGTAAACTCCTGATCTACTAC  
ACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCA  
TCAAAGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGA  
ACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAAC  
CTGGAGCAAGAGGATATTGCCACTTAC  
TTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCG  
TGGACGTTTCGCTGGAGGCACCAAGCTG  
GAAATCAAACGGGCTGGAGGCGGTAG  
TGGCGGTGGATCAGGTGGAGGCAGCG  
GTGGCGGATCTGAGGTGCAGCTCCAGC  
AGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTG  
GAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGG  
CTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACA  
CCATGAACTGGGTGAAGCAGAGTCAT  
GGAAAGAACCTTGAGTGGATGGGACT  
TATTAATCCTTACAAAGGTGTTAGTAC  
CTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGG  
CCACATTAAGTGTAGACAAGTCATCCA  
GCACAGCCTACATGGAACCTCCTCAGTC  
TGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATT  
ACTGTGCAAGATCGGGGTACTACGGTG  
ATAGTGACTGGTACTTCGATGTCTGGG

GCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCT CAACCACtACaCCAGCaCCtaGACCACCA ACACCtGCGCCaACCATCGCaTCGCAGC CaCTGTctCTGCGCCCAGAGGCaTGCCG GCCAGCaGctGGGGGCGCAGTGCACAC aAGGGGGCTGGACTTCGCaTGTGATAT CTACATCTGGGCaCCaTTGGCaGGGACT TGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTT ATCACCTTTACTGC (SEQ ID NO: 21)	
<b>Сигнальный пептид CD80</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
ATGGGTCATACACGCCGCCAAGGAAC CTCACCATCTAAGTGCCCATATCTGAA TTTCTTTCAACTTCTCGTGCTGGCGGG GCTCAGTCATTTCTGCAGTGGGGTC (SEQ ID NO: 23)	MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAG LSHFCSGV (SEQ ID NO: 24)
<b>Внеклеточный домен (ECD) CD80</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
ATTACGTTACTAAAGAGGTCAAGGA GGTCGCAACATTGAGTTGTGGCCATAA CGTATCAGTTGAAGAACTCGCGCAGAC ACGGATTTACTGGCAAAAGGAAAAGA AGATGGTGTTGACAATGATGAGCGGT GACATGAACATTTGGCCAGAGTACAA AAATCGAACGATATTCGATATAACCAA TAACTTGTCCATAGTAATACTTGCCTT GCGACCTTCTGACGAGGGAACGTATG AATGTGTAGTGCTTAAGTATGAAAAG ATGCCTTTAAGCGGGAACACTTGGCTG AGGTTACACTCTCCGTTAAGGCGGACT TTCCTACGCGTCTATATCCGACTTCG AGATACCCACTTCTAACATTCGACGCA TCATTTGCTCAACCTCAGGTGGTTTCC	IHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQT RIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEY KNRTIFDITNLSIVILALRPSDEGTYES VVLKYEKDAFKREHLAEVTLVKADFP TPSISDFEIPSNIRRIICSTSGGFPEPHLS WLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSS KLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTF NWNTTKQEHFPDNLPS (SEQ ID NO: 26)

CAGAGCCTCACTTGAGCTGGCTGGAGA ATGGCGAAGAACTTAACGCAATCAAT ACCACGGTGTCCCAAGACCCGGAGAC AGAGCTGTACGCCGTGTCATCCAAACT GGATTTTAACATGACGACAAATCATAG TTTCATGTGTCTGATCAAATATGGGCA TCTCAGGGTGAATCAGACTTTTAATTG GAACACTACCAAACAAGAGCACTTCC CAGATAATCTGTTGCCAAGC (SEQ ID NO: 25)	
<b>Трансмембранный и внутриклеточный домен CD80</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
TGGGCGATAACTCTTATCTCCGTCAAC GGTATCTTCGTAATTTGCTGCCTCACCT ATTGTTTCGCGCCTCGATGCCGAGAA (SEQ ID NO: 27)	WAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRE (SEQ ID NO: 28)
<b>Саморасщепляющийся пептид P2A</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
GGCAGCGGCGCCACCAACTTCTCCCTG CTGAAGCAGGCCGCGACGTGGAAGA AAACCCTGGCCCC (SEQ ID NO: 29)	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 30)
<b>Сигнальный пептид CD8a</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTC CTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC GCCAGGCCG (SEQ ID NO: 31)	MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 32)
<b>Варибельная область легкой цепи нацеливающего на CD3 белка</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
GACATCCAGATGACCCAGACCACCTCC TCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGA GTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAG GACATTAGAAATTATTTAAACTGGTAT CAACAGAAACCAGATGGAACCTGTAA ACTCCTGATCTACTACACATCAAGATT	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDI RNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHS GVPSKFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAT YFCQQGNTLPWTFAGGKLEIKRA (SEQ ID NO: 34)



ACACTCAGGAGTCCCATCAAAGTTCAG TGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTC TCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGA GGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACA GGGTAATACGCTTCCGTGGACGTTTCGC TGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC GGGCT (SEQ ID NO:33)	
<b>Линкер G3S</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
GGAGGCGGTAGTGGCGGTGGATCAGG TGGAGGCAGCGGTGGCGGATCT (SEQ ID NO: 35)	GGGSGGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 36)
<b>Варибельная область тяжелой цепи нацеливающего на CD3 белка</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
GAGGTGCAGCTCCAGCAGTCTGGACCT GAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATG AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTAC TCATTCACTGGCTACACCATGAACTGG GTGAAGCAGAGTCATGGAAAGAACCT TGAGTGGATGGGACTTATTAATCCTTA CAAAGGTGTTAGTACCTACAACCAGA AGTTCAAGGACAAGGCCACATTAACT GTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTAC ATGGAACCTCCTCAGTCTGACATCTGAG GACTCTGCAGTCTATTAAGTGTGCAAGA TCGGGGTACTACGGTGATAGTACTGG TACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACC ACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 37)	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGY SFTGYTMNWVKQSHGKNLEWMGLINP YKGVSTYNQKFKDKATLTVDKSSSTAY MELLSLTSEDSAVYYCARSQYYGDS DYFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 38)
<b>Шарнирная область и трансмембранный домен CD8a</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
ACCACTACACCAGCACCTAGACCACCA ACACCTGCGCCAACCATCGCATCGCAG CCTGTCTCTGCGCCAGAGGCATGC	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC GVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 40)

CGGCCAGCAGCTGGGGGCGCAGTGCA CACAAGGGGGCTGGACTTCGCATGTG ATATCTACATCTGGGCACCATTTGGCAG GGACTTGTGGGGTTCCTTCTCCTGTCAC TGGTTATCACCTTTACTGC (SEQ ID NO: 39)	
--	--

Трансген

Лентивирусные векторы, описанные в данном документе, содержат трансген, кодирующий один или несколько белков, которые доставляются в лимфоцит (например, Т-клетку, В-клетку или NK-клетку) и экспрессируются им, на который нацелен вектор. В конкретных вариантах осуществления трансген кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), который содержит: внеклеточный домен, содержащий связывающий домен, который специфически связывается с целевой молекулой; внутриклеточный сигнальный домен, где внутриклеточный сигнальный домен содержит мотив активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM); и трансмембранный домен, соединяющий внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен.

Связывающие домены, подходящие для применения в CAR по настоящему изобретению, включают любой антигенсвязывающий полипептид. Связывающий домен может содержать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включая, например, полноразмерную тяжелую цепь, фрагмент Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, sFv, домен V<sub>H</sub>, домен V<sub>L</sub>, dAb, V<sub>HH</sub>, CDR и scFv, специфичные для антигена целевого заболевания. В определенных вариантах осуществления CAR-связывающий домен является мышинным, химерным, человеческим или гуманизированным. В дополнительных вариантах осуществления CAR-связывающий домен представляет собой scFv, имеющий области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, которые являются человеческими или гуманизированными. В дополнительных вариантах осуществления CAR-связывающий домен представляет собой scFv, имеющий линкер (GGGS)<sub>N</sub> или (GGGGS)<sub>N</sub>, где N=1-10, соединяющий области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>. В других вариантах осуществления CAR-связывающий домен представляет собой scFv, имеющий линкер, содержащий SEQ ID NO: 64, соединяющий области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>.

Целевая молекула, которая связывается внеклеточным доменом CAR по настоящему изобретению, может быть обнаружена на целевой клетке или в ассоциации с ней. Иллюстративные целевые клетки включают раковую клетку, клетку, ассоциированную с аутоиммунным заболеванием или нарушением, нейродегенеративным заболеванием или воспалительным заболеванием или нарушением, инфекционным микроорганизмом (например, бактерией, вирусом или грибом), и инфицированную клетку (например,

инфицированную вирусом клетку). Клетка инфекционного организма, такого как паразит млекопитающих, также рассматривается как целевая клетка.

Внеклеточный домен, включенный в CAR, как описано в данном документе, может включать связывающий домен, который нацелен на одну или несколько целевых молекул.

5 В определенных вариантах осуществления CAR содержит связывающий домен, который специфически связывает опухолевый антиген. В некоторых таких вариантах осуществления CAR-связывающий домен специфически связывает одно или несколько из CD19, BCMA, рецептора альфа-фолата, 5T4, интегрин Ab, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD20, CD22, CD23, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD52, CD70, CD79a, CD79b, 10 CD80, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EpCAM, FAP, фетального AchR, FLT3, Fra, GD2, GD3, глипикана-3 (GPC3), HLA-A1 + MAGE1, HLA-A2 + MAGE1, HLA-A3 + MAGE1, HLA-A1 + NY-ESO-1, HLA-A2 + NY-ESO-1, HLA-A3 + NY-ESO-1, HLADR, IL-11Ralpha, IL-13 Ralpha2, Lambda, Lewis-Y, Кappa, мезотелина, Muc1, Muc16, NCAM, лигандов NKG2d, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, 15 ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEM, VEGFR2, BAFF-R, клаудина 18.2, CD86, FcRL5, GPRC5 и TACI.

В определенных вариантах осуществления внеклеточный домен CAR, кодируемый трансгеном лентивирусных векторов, описанных в данном описании, необязательно содержит внеклеточный несигнальный спейсер или линкерный домен между связывающим 20 доменом и трансмембранным доменом. При включении такой спейсерный или линкерный домен может располагать связывающий домен вдали от поверхности клетки-хозяина, чтобы дополнительно обеспечить надлежащий контакт, связывание и активацию между клетками. Внеклеточный спейсерный домен обычно расположен между внеклеточным связывающим доменом и трансмембранным доменом CAR. Длина внеклеточного спейсера может 25 варьироваться для оптимизации связывания целевой молекулы на основе выбранной целевой молекулы, выбранного связывающего эпитопа, размера связывающего домена и аффинности (см., например, Guest *et al.*, *J. Immunother.* 28:203-11, 2005; публикацию РСТ № WO 2014/031687). В определенных вариантах осуществления внеклеточный спейсерный домен представляет собой шарнирную область иммуноглобулина (например, IgG1, IgG2, 30 IgG3, IgG4, IgA, IgD). Шарнирная область иммуноглобулина может представлять собой шарнирную область иммуноглобулина дикого типа или измененную шарнирную область иммуноглобулина дикого типа. Измененная шарнирная область IgG4 описана в публикации РСТ № WO 2014/031687, шарнирная область которой включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления 35 внеклеточный спейсерный домен содержит модифицированную шарнирную область IgG4,

имеющую аминокислотную последовательность ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 118).

Другие примеры шарнирных областей, которые можно использовать в CAR, описанных в данном документе, включают шарнирную область из внеклеточных областей мембранных белков типа 1, таких как CD8a, CD4, CD28 и CD7, которые могут представлять собой дикий тип или их варианты. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный спейсерный домен содержит весь или часть домена Fc иммуноглобулина, выбранного из: домена CH1, домена CH2, домена CH3 или их комбинаций (см., например, публикацию PCT WO2014/031687, где спейсеры которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В дополнительных вариантах осуществления внеклеточный спейсерный домен может содержать стеблевую область лектина типа C типа II (внеклеточный домен, расположенный между доменом лектина типа C и трансмембранным доменом). Лектины типа C типа II включают CD23, CD69, CD72, CD94, NKG2A и NKG2D. CAR по настоящему изобретению содержат трансмембранный домен, который соединяет внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен и расположен между ним. Трансмембранный домен обычно имеет длину от приблизительно 15 до приблизительно 30 аминокислот. Трансмембранный домен представляет собой гидрофобную альфа-спираль, которая располагается поперек мембраны клетки-хозяина и заякоряет CAR в мембране клетки-хозяина. Трансмембранный домен может быть непосредственно слит со связывающим доменом или с внеклеточным спейсерным доменом, при наличии. В определенных вариантах осуществления трансмембранный домен получен из интегрального мембранного белка (например, рецептора, молекулы кластера дифференцировки (CD), фермента, транспортера, молекулы клеточной адгезии или тому подобного). Трансмембранный домен может быть выбран из той же молекулы, что и внеклеточный домен или внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления каждый из трансмембранного домена и внеклеточного домена выбран из разных молекул. В некоторых вариантах осуществления каждый из трансмембранного домена и внутриклеточного сигнального домена выбран из разных молекул. В еще одних вариантах осуществления каждый из трансмембранного домена, внеклеточного домена и внутриклеточного сигнального домена выбран из разных молекул.

Иллюстративные трансмембранные домены для применения в CAR по настоящему изобретению включают CD28, CD2, CD4, CD8a, CD5, CD3ε, CD3δ, CD3ζ, CD9, CD16, CD22, CD25, CD27, CD33, CD37, CD40, CD45, CD64, CD79A, CD79B, CD80, CD86, CD95 (Fas), CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD154 (CD40L), CD200R, CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD272 (BTLA), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), CD279 (PD-1), CD300, CD357 (GITR), A2aR, DAP10, FcRα, FcRβ, FcRγ, Fyn,

GAL9, KIR, Lck, LAT, LRP, NKG2D, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, PTCH2, ROR2, Ryk, Slp76, SIRP $\alpha$ , pT $\alpha$ , TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TIM3, TRIM, LPA5 и трансмембранный домен Zap70. Иллюстративный трансмембранный домен CD8a с шарнирной областью CD8a содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

5           Внутриклеточный сигнальный домен CAR представляет собой внутриклеточный эффекторный домен, способный передавать функциональные сигналы клетке в ответ на связывание внеклеточного домена CAR с целевой молекулой, и активирует по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций или ответов иммунной клетки, например, Т-клетки, сконструированной для экспрессии CAR. В некоторых вариантах осуществления  
10   CAR индуцирует функцию Т-клетки, такую как цитолитическую активность или Т-хелперную активность, такую как секреция цитокинов или других факторов. Внутриклеточный сигнальный домен может представлять собой любую часть внутриклеточной сигнальной молекулы, которая сохраняет достаточную сигнальную активность. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен  
15   получен из компонента антигенного рецептора (например, TCR) или костимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления используется полноразмерный внутриклеточный сигнальный домен антигенного рецептора или костимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления используется усеченная часть внутриклеточного сигнального домена антигенного рецептора или костимулирующей  
20   молекулы при условии, что усеченная часть сохраняет достаточную активность в отношении передачи сигнала. В дополнительных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен представляет собой вариант полноразмерной или усеченной части внутриклеточного сигнального домена костимулирующей молекулы рецептора антигена при условии, что этот вариант сохраняет достаточную активность в  
25   отношении передачи сигнала (т.е. является функциональным вариантом).

В определенных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит сигнальный домен, содержащий мотив активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM). Сигнальный домен, содержащий ITAM, обычно содержит по меньшей мере один (один, два, три, четыре или больше) ITAM, которые относятся к  
30   консервативному мотиву YXXL/I-X<sub>6-8</sub>-YXXL/I. Сигнальный домен, содержащий ITAM, может инициировать передачу сигнала в отношении Т-клеточной активации после связывания антигена или взаимодействия лиганда. Сигнальные домены ITAM включают, например, внутриклеточные сигнальные домены CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ , CD5, CD22, CD79a, CD278 (ICOS), DAP10, DAP12, FcR $\gamma$  и CD66d. Иллюстративные сигнальные  
35   домены CD3 $\zeta$ , которые можно применять в CAR по настоящему изобретению, содержат

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 122.

Внутриклеточные сигнальные домены CAR необязательно содержат костимулирующий сигнальный домен, который при активации в сочетании с первичным или классическим (например, управляемым ITAM) сигналом активации стимулирует или усиливает Т-клеточный ответ, такой как Т-клеточная активация, выработка цитокинов, пролиферация, дифференцировка, выживание, эффекторная функция или их комбинации. Костимулирующие сигнальные домены для применения в CAR включают, например, CD27, CD28, CD40L, GITR, NKG2C, CARD1, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX-40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD226, CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, LFA-1, LIGHT, NKG2C, NKD2C, SLP76, TRIM, ZAP70 или любую их комбинацию. В конкретном варианте осуществления костимулирующий сигнальный домен включает сигнальный домен OX40, CD2, CD27, CD28, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) или 4-1BB (CD137). Иллюстративный костимулирующий сигнальный домен 4-1BB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54. В определенных вариантах осуществления CAR содержит один, два или более костимулирующих сигнальных домена. В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению представляет собой CAR первого поколения, CAR второго поколения или CAR третьего поколения. CAR первого поколения обычно имеет внутриклеточный сигнальный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен CD3 $\zeta$ , Fc $\gamma$ RI или другой ITAM-содержащий активирующий домен для обеспечения сигнала Т-клеточной активации. CAR второго поколения дополнительно содержат костимулирующий сигнальный домен (например, костимулирующий сигнальный домен эндогенного Т-клеточного костимулирующего рецептора, такого как CD28, 4-1BB или ICOS). CAR третьего поколения содержат ITAM-содержащий активирующий домен, первый костимулирующий сигнальный домен и второй костимулирующий сигнальный домен.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько из внеклеточного домена, связывающего домена, линкера, трансмембранного домена, внутриклеточного сигнального домена или костимулирующего домена содержит соединительные аминокислоты. «Соединительные аминокислоты» или «остатки соединительных аминокислот» относятся к одному или нескольким (например, приблизительно 2-20) аминокислотным остаткам между двумя соседними доменами, мотивами, областями, модулями или фрагментами белка, например, между связывающим доменом и соседним линкером, между трансмембранным доменом и соседним внеклеточным или внутриклеточным доменом или на одном или обоих концах линкера, который связывает два

домена, мотива, области, модуля или фрагмента (например, между линкером и соседним связывающим доменом или между линкером и соседним шарниром). Соединительные аминокислоты могут возникать в результате разработки конструкции слитого белка (например, аминокислотные остатки, образующиеся в результате использования сайта рестрикции или саморасщепляющихся пептидных последовательностей во время конструирования полинуклеотида, кодирующего слитый белок). Например, трансмембранный домен слитого белка может содержать одну или несколько соединительных аминокислот на аминоконце, карбоксиконце или на обоих.

В конкретных вариантах осуществления трансген кодирует молекулу CAR к CD19. В таких вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен может содержать scFv, как подробно описано в таблице 4, имеющий вариабельную область легкой цепи антитела к CD19 SEQ ID NO: 46, линкер G4S SEQ ID NO: 48 и вариабельную область тяжелой цепи антитела к CD19 SEQ ID NO: 50. CAR к CD19, применимый в контексте настоящего описания, может содержать шарнир CD8a и трансмембранный домен SEQ ID NO: 52. В определенных вариантах осуществления CAR к CD19 содержит костимулирующий домен 4-1BB в соответствии с SEQ ID NO: 54 и эффекторный домен CD3 $\zeta$  в соответствии с SEQ ID NO: 56. В конкретном варианте осуществления CAR к CD19, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 42 без сигнального пептида SEQ ID NO: 44.

В других вариантах осуществления трансген кодирует молекулу CAR к CD19, и внеклеточный связывающий домен может содержать scFv, имеющий вариабельную область легкой цепи антитела к CD19, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 46, и вариабельную область тяжелой цепи антитела к CD19, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 50. CAR к CD19, применимый в контексте настоящего описания, может содержать шарнир CD8a и трансмембранный домен, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 52. В определенных вариантах осуществления CAR к CD19 содержит костимулирующий домен 4-1BB, который содержит на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 54, и эффекторный домен CD3 $\zeta$ , который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID

NO: 56. В конкретном варианте осуществления CAR к CD19, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% , 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 42 без сигнального пептида SEQ ID NO: 44.

5

**ТАБЛИЦА 4. Молекула CAR к CD19**

Полноразмерная молекула	
Нуклеотид	Аминокислота (сигнальный пептид подчеркнут)
ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTC	<u>MALPVTALLLPLALLLHAARPD</u> IQMTQ
CTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC	TTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLN
GCCAGGCCGGACATCCAGATGACACA	WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSR
GACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTG	FSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQ
GGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAG	GNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGS
GGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTT	GGGGSEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCT
AAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATG	VSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGV
GAACTGTAAACTCCTGATCTACCATA	IWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQV
CATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCAT	FLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGS
CAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGA	YAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTP
ACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAAC	APTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG
CTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTAC	LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLL SLVITL
TTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCG	YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE
TACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCT	DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP
GGAGATCACAGGTGGaGGTGGaTCGGG	AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
CGGTGGTGGGTTCGGGTGGCGGCGGAT	RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
CTGAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGA	KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDL
CCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGC	YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ
CTGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGG	ID NO: 42)
GTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGC	
TGGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGT	
CTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGG	
TAGTGAAACCACATACTATAATTCAGC	
TCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAA	
GGACAACSTCCAAGAGCCAAGTTTTCTT	
AAAAATGAACAGTCTGCAAACSTGATG	



ACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAAC ATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTA TGGACTACTGGGGCCAAGGAACCTCA GTCACCGTCTCCTCAACCACtACaCCAG CaCCtaGACCACCAACACCtGCGCCaACC ATCGCaTCGCAGCCaCTGTcTCTGCGCC CAGAGGCaTGCCGGCCAGCaGcTGGGG GCGCAGTGCACACaAGGGGGCTGGACT TCGCaTGTGATATCTACATCTGGGCaCC aTTGGCaGGGACTTGTGGGGTCCTTCTC CTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGC AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTA TATATTCAAACAACCATTTATGAGACC AGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATG GCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAG AAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTG AAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCC CGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGC TCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAA GAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAG AGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGG GGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTC AGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAG AAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAG TGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCC GGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTT TACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAG GACACCTACGACGCCCTTCACATGCAG GCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO: 41)	
<b>Сигнальный пептид CD8a</b>	
<b>Нуклеотид</b> ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTC CTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC GCCAGGCCG (SEQ ID NO: 43)	<b>Аминокислота</b> MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 44)
<b>Вариабельная область легкой цепи нацеливающего на CD19 белка</b>	

<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
GACATCCAGATGACACAGACTACATCC TCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGA GTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAG GACATTAGTAAATATTTAAATTGGTAT CAGCAGAAACCAGATGGAACCTGTAA ACTCCTGATCTACCATAACATCAAGATT AACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAG TGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTC TCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGA AGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACA GGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCGG AGGGGGGACCAAGCTGGAGATCACA (SEQ ID NO: 45)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDI SKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAT YFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT (SEQ ID NO: 46)
<b>Линкер G4S</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
GGTGGaGGTGGaTCGGGCGGTGGTGGG TCGGGTGGCGGCGGATCT (SEQ ID NO: 47)	GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 48)
<b>Вариабельная область тяжелой цепи нацеливающего на CD19 белка</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
GAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACC TGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCT GTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGT CTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTG GATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCT GGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTA GTGAAACCACATACTATAATTCAGCTC TCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGG ACAACCTCAAGAGCCAAGTTTTCTTAA AAATGAACAGTCTGCAAACCTGATGAC ACAGCCATTTACTACTGTGCCAACAT TATTAACCGGTGGTAGCTATGCTATG GACTACTGGGGCCAAGGAACCTCAGT	EVKQLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVS LPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIVGSE TTYYNALSRLTIKDNSKSQVFLKMN SLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDY WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 50)

CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 49)	
<b>Шарнирная область и трансмембранный домен CD8a</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
ACCACTACACCAGCACCTAGACCACCA ACACCTGCGCCAACCATCGCATCGCAG CCTGTCTCTGCGCCCAGAGGCATGC CGGCCAGCAGCTGGGGGCGCAGTGCA CACAAGGGGGCTGGACTTCGCATGTG ATATCTACATCTGGGCACCATTTGGCAG GGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTAC TGGTTATCACCTTTACTGC (SEQ ID NO: 51)	TTTPAPRPPTPARTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC GVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 52)
<b>Костимулирующий домен 4-1BB</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTA TATATTCAAACAACCATTTATGAGACC AGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATG GCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAG AAGAAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID NO: 53)	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 54)
<b>Эффекторный домен CD3 дзета №1</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGA CGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGA ACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAG GACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGA GATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGA ACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAA CTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGC CTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCG AGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGAT GGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCC ACCAAGGACACCTACGACGCCCTTAC	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR (SEQ ID NO: 56)

ATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO: 55)	
---------------------------------------	--

В других вариантах осуществления трансген кодирует молекулу CAR к ВСМА. В таких вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен может содержать scFv, как подробно описано в таблице 5, имеющий вариабельную область легкой цепи антитела к ВСМА SEQ ID NO: 62, линкер SEQ ID NO: 64 и вариабельную область тяжелой цепи антитела к ВСМА SEQ ID NO: 66. CAR к ВСМА, применимый в контексте настоящего описания, может содержать шарнир CD8a и трансмембранный домен SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления CAR к ВСМА содержит костимулирующий домен 4-1BB в соответствии с SEQ ID NO: 54 и эффекторный домен CD3 $\zeta$  в соответствии с SEQ ID NO: 122. В конкретном варианте осуществления CAR к ВСМА, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 58 или SEQ ID NO: 58 без сигнального пептида SEQ ID NO: 60.

В некоторых вариантах осуществления трансген кодирует молекулу CAR к ВСМА. В таких вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен может содержать scFv, имеющий вариабельную область легкой цепи антитела к ВСМА, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 62, и вариабельную область тяжелой цепи антитела к ВСМА, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 66. CAR к ВСМА, применимый в контексте настоящего описания, может содержать шарнир CD8a и трансмембранный домен, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 52. В определенных вариантах осуществления CAR к ВСМА содержит костимулирующий домен 4-1BB, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 54, и эффекторный домен CD3 $\zeta$ , который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 122. В конкретном варианте осуществления CAR к ВСМА, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% , 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 58 или SEQ ID NO: 58 без сигнального пептида SEQ ID NO: 60.

**ТАБЛИЦА 5. Молекула CAR к ВСМА**

<b>Полноразмерная молекула</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота (сигнальный пептид подчеркнут)</b>
ATGGCACTCCCCGTCACCGCCCTTCTC	<u>MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQS</u>
TTGCCCCCTCGCCCTGCTGCTGCATGCT	PPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHL
GCCAGGCCCGACATTGTGCTCACTCAG	IHWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVP
TCACCTCCCAGCCTGGCCATGAGCCTG	ARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYY
GGAAAAAGGGCCACCATCTCCTGTAG	CLQSR TIPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKP
AGCCAGTGAGTCCGTCACAATCTTGGG	GSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVK
GAGCCATCTTATTCAGTGGTATCAGCA	ISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLK
GAAGCCCGGGCAGCCTCCAACCCTTCT	WMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLE
TATTCAGCTCGCGTCAAACGTCCAGAC	TSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYS
GGGTGTACCTGCCAGATTTTCTGGTAG	YAMDYWGQGTSVTVSSAAATTPAPR
CGGGTCCCGCACTGATTTTACACTGAC	PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
CATAGATCCAGTGGAAGAAGACGATG	HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL
TGGCCGTGTATTATTGTCTGCAGAGCA	VITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTT
GAACGATTCCTCGCACATTTGGTGGGG	QEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSA
GTAATAAGCTGGAGATTAAGGGAAGC	DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV
ACGTCCGGCTCAGGGAAGCCGGGCTC	LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
CGGCGAGGGAAGCACGAAGGGGCAAA	ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
TTCAGCTGGTCCAGAGCGGACCTGAGC	DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
TGAAAAAACCCGGCGAGACTGTTAAG	(SEQ ID NO: 58)
ATCAGTTGTAAAGCATCTGGCTATAACC	
TTCACCGACTACAGCATAAATTGGGTG	
AAACGAGCCCCTGGAAAGGGCCTCAA	
ATGGATGGGTTGGATCAATACCGAAA	
CTAGGGAGCCTGCTTATGCATATGACT	
TCCGCGGGAGATTCGCCTTTTCACTCG	
AGACATCTGCCTCTACTGCTTACCTCC	
AAATAACAACCTCAAGTATGAAGAT	
ACAGCCACTTACTTTTGCGCCCTCGAC	
TATAGTTACGCCATGGACTACTGGGGA	
CAGGGAACCTCCGTTACCGTCAGTTCC	
GCGGCCGCAACCACAACACCTGCTCCA	

AGGCCCCCACACCCGCTCCAACCTATA  
 GCCAGCCAACCATTGAGCCTCAGACCT  
 GAAGCTTGCAGGCCCGCAGCAGGAGG  
 CGCCGTCCATACGCGAGGCCTGGACTT  
 CGCGTGTGATATTTATATTTGGGCACC  
 TTTGGCCGGAACATGTGGGGTGTGCT  
 TCTCTCCCTTGTGATCACTCTGTATTGT  
 AAGCGCGGGAGAAAGAAGCTCCTGTA  
 CATCTTCAAGCAGCCTTTTATGCGACC  
 TGTGCAAACCACTCAGGAAGAAGATG  
 GGTGTTTCATGCCGCTTCCCCGAGGAGG  
 AAGAAGGAGGGTGTGAACTGAGGGTG  
 AAATTTTCTAGAAGCGCCGATGCTCCC  
 GCATATCAGCAGGGTCAGAATCAGCTC  
 TACAATGAATTGAATCTCGGCAGGCGA  
 GAAGAGTACGATGTTCTGGACAAGAG  
 ACGGGGCAGGGATCCCGAGATGGGGG  
 GAAAGCCCCGAGAAAAAATCCTCAG  
 GAGGGGTTGTACAATGAGCTGCAGAA  
 GGACAAGATGGCTGAAGCCTATAGCG  
 AGATCGGAATGAAAGGCGAAAGACGC  
 AGAGGCAAGGGGCATGACGGTCTGTA  
 CCAGGGTCTCTCTACAGCCACCAAGGA  
 CACTTATGATGCGTTGCATATGCAAGC  
 CTTGCCACCCCGC (SEQ ID NO: 57)

**Сигнальный пептид CD8a**

<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
ATGGCACTCCCCGTCACCGCCCTTCTC TTGCCCTCGCCCTGCTGCTGCATGCT GCCAGGCC (SEQ ID NO: 59)	MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 60)

**Варибельная область легкой цепи нацеливающей на ВСМА молекулы**

<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
GACATTGTGCTCACTCAGTCACCTCCC AGCCTGGCCATGAGCCTGGGAAAAAG	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESV TILGSHLIHWYQQKPGQPPTLLIQLASN

GGCCACCATCTCCTGTAGAGCCAGTGA GTCCGTCACAATCTTGGGGAGCCATCT TATTCAGTGGTATCAGCAGAAGCCCGG GCAGCCTCCAACCCTTCTTATTCAGCT CGCGTCAAACGTCCAGACGGGTGTACC TGCCAGATTTTCTGGTAGCGGGTCCCG CACTGATTTTACACTGACCATAGATCC AGTGGAAGAAGACGATGTGGCCGTGT ATTATTGTCTGCAGAGCAGAACGATTC CTCGCACATTTGGTGGGGGTAATAAGC TGGAGATTAAG (SEQ ID NO: 61)	VQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEED DVAVYYCLQSRRTIPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 62)
<b>Линкер 218</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
GGAAGCACGTCCGGCTCAGGGAAGCC GGGCTCCGGCGAGGGAAGCACGAAGG GG (SEQ ID NO: 63)	GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 64)
<b>Варибельная область тяжелой цепи нацеливающей на ВСМА молекулы</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
CAAATTCAGCTGGTCCAGAGCGGACCT GAGCTGAAAAAACCCGGCGAGACTGT TAAGATCAGTTGTAAAGCATCTGGCTA TACCTTACCGACTACAGCATAAATTG GGTGAAACGAGCCCCTGGAAAGGGCC TCAAATGGATGGGTGGATCAATACCG AAACTAGGGAGCCTGCTTATGCATATG ACTTCCGCGGGAGATTCGCCTTTTCAC TCGAGACATCTGCCTCTACTGCTTACC TCCAAATAAACAACCTCAAGTATGAA GATACAGCCACTTACTTTTGCGCCCTC GACTATAGTTACGCCATGGACTACTGG GGACAGGGAACCTCCGTTACCGTCAGT TCC (SEQ ID NO: 65)	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYT FTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTE TREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQ INNLYEDTATYFCALDYSYAMDYWG QGTSVTVSS (SEQ ID NO: 66)
<b>Шарнирная область и трансмембранный домен CD8a</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>

ACCACAACACCTGCTCCAAGGCCCCCC ACACCCGCTCCAАCTАTАGCCAGCCAA CCATTGAGCCTCAGACCTGAAGCTTGC AGGCCCGCAGCAGGAGGCCGCCGTCCA TACGCGAGGCCTGGACTTCGCGTGTGA TATTTATATTTGGGCACCTTTGGCCGG AACATGTGGGGTGTGCTTCTCTCCCT TGTGATCACTCTGTATTGT (SEQ ID NO: 119)	TTTPAPRPPTPAPTІASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC GVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 52)
<b>Костимулирующий домен 4-1ВВ</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
AAGCGCGGGAGAAAGAAGCTCCTGTA CATCTTCAAGCAGCCTTTTATGCGACC TGTGCAAACCACTCAGGAAGAAGATG GGTGTTCA TGCCGCTTCCCCGAGGAGG AAGAAGGAGGGTGTGAACTG (SEQ ID NO: 120)	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 54)
<b>Эффекторный домен CD3 дзета №2</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
AGGGTGAAATTTTCTAGAAGCGCCGAT GCTCCCGCATATCAGCAGGGTCAGAAT CAGCTCTACAATGAATTGAATCTCGGC AGGCGAGAAGAGTACGATGTTCTGGA CAAGAGACGGGGCAGGGATCCCGAGA TGGGGGGAAAGCCCCGGAGAAAAAAT CCTCAGGAGGGGTTGTACAATGAGCTG CAGAAGGACAAGATGGCTGAAGCCTA TAGCGAGATCGGAATGAAAGGCGAAA GACGCAGAGGCAAGGGGCATGACGGT CTGTACCAGGGTCTCTCTACAGCCACC AAGGACACTTATGATGCGTTGCATATG CAAGCCTTGCCACCCCGC (SEQ ID NO: 121)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDITYDAL HMQALPPR (SEQ ID NO: 122)

CAR по настоящему изобретению могут содержать полинуклеотидные последовательности, полученные от любых видов млекопитающих, включая людей,



приматов, коров, лошадей, коз, овец, собак, кошек, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, свиней, их трансгенных видов или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор является мышинным, химерным, человеческим или гуманизированным.

## 5 Способы получения лентивирусных векторов

Способы получения LVV представлены в данном документе. LVV были разработаны на основе ретровирусного генома с помощью объединения его компонентов в рекомбинантной векторы на основе плазмидной ДНК. Векторы на основе плазмидной ДНК затем можно трансфицировать в линии клеток-продуцентов для переноса генов, 10 необходимых для производства лентивирусных частиц. Системы упаковки LVV обычно включают плазмиду-переносчик, кодирующую трансген, представляющий интерес, плазмиду с оболочкой (например, VSV-G) и упаковывающую(ие) плазмиду(ы). Системы упаковки LVV второго поколения содержат одну упаковывающую плазмиду, кодирующую гены Gag, Pol, Rev и Tat, и отдельную плазмиду Env. В некоторых вариантах 15 осуществления в способах, описанных в данном документе, для получения LVV используют векторную систему третьего поколения. Системы производства векторов третьего поколения повышают безопасность упаковывающих систем LVV 2-го поколения и обычно представляют собой четыре плазмидные системы, которые включают трансгенную плазмиду в комбинации с тремя упаковывающими плазмидами: VSV-G, 20 GagPol и Rev. Таким образом, Rev и GagPol разделены на две плазмиды. Tat также удаляется из упаковывающих систем LVV 3-го поколения с помощью добавления химерного 5'-LTR, слитого с гетерологичным промотором (например, промотором CMV или RSV) на плазмиде-переносчике. Ген gag кодирует предшественник полипротеина Gag, включающий структурные белки лентивируса, включая матрикс, капсид и нуклеокапсид. 25 Ген pol кодирует полипротеин-предшественник Pol, обеспечивающий ферментативные функции лентивируса, необходимые для репликации, включая протеазу, обратную транскриптазу и интегразу. Ген rev кодирует белок Rev, который связывается с элементом ответа Rev (RRE), обеспечивая ядерный экспорт несплайсированной и однократно сплайсированной РНК HIV во время репликации вируса. Полипротеины-предшественники 30 Gag и Pol расщепляются во время образования вирусных частиц.

Клетки-продуценты, которые можно использовать для создания LVV по настоящему изобретению, включают клетки почки эмбриона человека (НЕК) 293 и их производные. Клетки-продуценты могут представлять собой линию прикрепленных клеток, такую как клетки-продуценты НЕК293Т, или линию суспензионных клеток, такую как клетки- 35 продуценты НЕК293Т/17 SF.

Трансгенную плазмиду объединяют с тремя упаковывающими плазмидами: плазмидой с GagPol, плазмидой с env VSV-G и плазмидой с Rev, и используют для трансфекции клеток-продуцентов, таких как клетки-продуценты HEK293. В некоторых вариантах осуществления клетки-продуценты трансфицируют плазмидой с трансгеном, плазмидой с GagPol, плазмидой с env VSV-G и плазмидой с Rev в определенном соотношении. В некоторых вариантах осуществления соотношения упаковывающих плазмид определяют по массе. В некоторых вариантах осуществления масса каждой плазмиды с трансгеном и плазмиды с GagPol превышает массу каждой плазмиды с env VSV-G и плазмиды с Rev. В некоторых вариантах осуществления определенное соотношение плазмиды с трансгеном, плазмиды с GagPol, плазмиды с env VSV-G и плазмиды с Rev составляет от приблизительно 1:1:1:1 до приблизительно 5:4:1:1. В некоторых вариантах осуществления клетки-продуценты трансфицируют плазмидой с трансгеном, плазмидой с GagPol, плазмидой с env VSV-G и плазмидой с Rev в определенном соотношении от приблизительно 2:1:1:1 до приблизительно 5:4:1:1. В некоторых вариантах осуществления клетки-продуценты трансфицируют плазмидой с трансгеном, плазмидой с GagPol, плазмидой с env VSV-G и плазмидой с Rev в определенном соотношении, составляющем приблизительно 2:1:1:1. В некоторых вариантах осуществления клетки-продуценты трансфицируют плазмидой с трансгеном, плазмидой с GagPol, плазмидой с env VSV-G и плазмидой с Rev в определенном соотношении, составляющим приблизительно 3:1:1:1. В некоторых вариантах осуществления клетки-продуценты трансфицируют плазмидой с трансгеном, плазмидой с GagPol, плазмидой с env VSV-G и плазмидой с Rev в определенном соотношении, составляющим 3,125:3,125:2,5:1,25. В некоторых вариантах осуществления клетки-продуценты трансфицируют плазмидой с трансгеном, плазмидой с GagPol, плазмидой с env VSV-G и плазмидой с Rev в определенном соотношении, составляющим приблизительно 4:2:1:1. В некоторых вариантах осуществления клетки-продуценты трансфицируют плазмидой с трансгеном, плазмидой с GagPol, плазмидой с env VSV-G и плазмидой с Rev в определенном соотношении, составляющим приблизительно 5:4:1:1. Продуктивные лентивирусные частицы собирают из среды для культивирования клеток-продуцентов. Иллюстративные материалы и способы получения частиц LVV описаны в *Production of Lentiviral Vectors*, Merten et al., *Molecular Therapy – Methods & Clinical Development* (2016), 3, 16017, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Производственные системы третьего поколения используют для исследований и разработок, а также в клинических целях. Схематические изображения хелперных плазмид, подходящих для применения в системе создания LVV третьего поколения, представлены на **фиг. 1**.

Трансгенная плаزمида кодирует единственный генетический материал, который переносится в лимфоциты (например, Т-клетки или НК-клетки), на которые нацелен полученный LVV, и содержит лентивирусный остов, содержащий кассету экспрессии трансгена, фланкированную функционирующими в цис-положении элементами для инкапсидации, обратной транскрипции и интеграции. В конкретных вариантах осуществления трансгенная плазмида содержит делецию элемента U3 3'-LTR, которая вызывает потерю транскрипционной способности вирусного LTR после переноса в целевые клетки. Кассета экспрессии, включенная в плазмиду с трансгеном, может кодировать один гетерологичный белок (например, один CAR, как описано в данном документе) или множество гетерологичных белков (например, несколько CAR, как описано в данном документе) для введения в целевую клетку и экспрессии ею.

В некоторых вариантах осуществления четырехплазмидной системы LVV плазмиды с env VSV-G содержит кассету тандемной экспрессии, которая кодирует мутантный оболочечный белок VSV-G и нацеливающий белок, как раскрыто в данном документе. В конкретных вариантах осуществления кассета тандемной экспрессии, включенная в плазмиду с env VSV-G, содержит полинуклеотид, который кодирует первый сигнальный пептид, полинуклеотид, который кодирует нацеливающий белок, полинуклеотид, который кодирует одно из внутреннего сайта связывания рибосомы (IRES), сайта расщепления фурином или вирусного пептида 2A, полинуклеотид, который кодирует второй сигнальный пептид, и полинуклеотид, который кодирует мутантный оболочечный белок VSV-G. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий мутантный оболочечный белок VSV-G, расположен в положении 5' от полинуклеотида, кодирующего нацеливающий белок. В других вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий мутантный оболочечный белок VSV-G, расположен в положении 3' от полинуклеотида, кодирующего нацеливающий белок. Полинуклеотид, который кодирует целевой белок, и полинуклеотид, который кодирует мутантный VSV-G, разделены в тандемной кассете полинуклеотидом, который кодирует IRES, сайт расщепления фурином или вирусный пептид 2A, что обеспечивает коэкспрессию двух белков из одной mRNA. В определенных вариантах осуществления вирусный пептид 2A представляет собой пептид свиного тешовируса-1 (P2A), вируса *Thosea asigna* (T2A), вируса ринита А лошадей (E2A), вируса ящера (F2A) или их вариант. Конкретные примеры аминокислотных и нуклеотидных последовательностей вирусных пептидов 2A представлены в таблице 7

**Таблица 7. Последовательности 2A**

Пептид T2A из капсидного белка вируса <i>Thosea asigna</i>	EGRGSLTCDG VEENPGP (SEQ	GAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAAC ATGCGGGGACGTGGAGGAAAATC
--	----------------------------	--

	ID NO: 79)	CCGGCCCC (SEQ ID NO: 80)
Пептид P2A из полипротеина тешовируса-1 свиней	ATNFSLLKQAG DVEENPGP (SEQ ID NO: 81)	GCCACGAACTTCTCTCTGTAAAG CAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAA CCCCGGTCCT (SEQ ID NO: 82)
Пептид F2A из полипротеина вируса ящура	VKQTLNFDLLK LAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 83)	GTGAAACAGACTTTGAATTTTGAC CTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTC GAGTCCAACCCTGGGCCC (SEQ ID NO: 84)
Пептид E2A из полипротеина риновируса А лошадей	QCTNYALLKLA GDVESNPGP (SEQ ID NO: 85)	CAGTGTACTAATTATGCTCTCTTG AAATTGGCTGGAGATGTTGAGAG CAACCCAGGTCCC (SEQ ID NO: 86)

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ получения нацеленного на лимфоциты лентивирусного вектора в соответствии с любым из предыдущих пунктов, при этом способ включает: трансфицирование клетки-продуцента плазмидой с GagPol, плазмидой с Rev, плазмидой с трансгеном и плазмидой с env VSV-G, где плазида с GagPol содержит один или несколько полинуклеотидов, кодирующих лентивирусный ген gag и лентивирусный ген pol, и способна экспрессировать лентивирусный полипротеин gag и лентивирусный полипротеин pol в клетке-продуценте; плазида Rev содержит полинуклеотид, кодирующий ген лентивирусного rev, и способна экспрессировать лентивирусный белок rev в клетке-продуценте; трансгенная плазида содержит кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, кодирующий CAR; и плазида с env VSV-G содержит кассету тандемной экспрессии, где кассета тандемной экспрессии содержит полинуклеотид, кодирующий мутантный оболочечный белок VSV-G, как раскрыто в данном документе, и полинуклеотид, кодирующий нацеливающий на лимфоциты белок, как описано в данном документе, и плазмиду с env VSV-G, способную экспрессировать мутантный оболочечный белок VSV-G и нацеливающий на лимфоциты белок в клетке-продуценте; культивирование клетки-продуцента в культуральной среде; и сбор лентивирусного вектора из культуральной среды.

В некоторых вариантах осуществления клетки-продуценты трансфицируют плазмидой с трансгеном, плазмидой с GagPol, плазмидой с env VSV-G и плазмидой с Rev в определенном соотношении. В некоторых вариантах осуществления определенное соотношение плазмиды с трансгеном, плазмиды с GagPol, плазмиды с env VSV-G и плазмиды с Rev составляет от приблизительно 1:1:1:1 до приблизительно 5:4:1:1. В некоторых вариантах осуществления клетки-продуценты трансфицируют плазмидой с трансгеном, плазмидой с GagPol, плазмидой с env VSV-G и плазмидой с Rev в соотношении

от приблизительно 2:1:1:1 до приблизительно 5:4:1:1. В некоторых вариантах осуществления клетки-продуценты трансфицируют плазмидой с трансгеном, плазмидой с GagPol, плазмидой с env VSV-G и плазмидой с Rev в определенном соотношении, составляющем приблизительно 2:1:1:1. В некоторых вариантах осуществления клетки-продуценты трансфицируют плазмидой с трансгеном, плазмидой с GagPol, плазмидой с env VSV-G и плазмидой с Rev в определенном соотношении, составляющем приблизительно 3:1:1:1. В некоторых вариантах осуществления клетки-продуценты трансфицируют плазмидой с трансгеном, плазмидой с GagPol, плазмидой с env VSV-G и плазмидой с Rev в определенном соотношении, составляющем приблизительно 3,125:3,125:2,5:1,25. В некоторых вариантах осуществления клетки-продуценты трансфицируют плазмидой с трансгеном, плазмидой с GagPol, плазмидой с env VSV-G и плазмидой с Rev в определенном соотношении, составляющем приблизительно 4:2:1:1. В некоторых вариантах осуществления клетки-продуценты трансфицируют плазмидой с трансгеном, плазмидой с GagPol, плазмидой с env VSV-G и плазмидой с Rev в определенном соотношении, составляющем приблизительно 5:4:1:1.

В одном варианте осуществления кассета тандемной экспрессии плазмиды с env VSV-G кодирует нацеливающий на CD3 белок и мутантный оболочечный белок VSV-G. Например, в конкретном варианте осуществления кассета тандемной экспрессии может содержать полинуклеотид, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 67, которая кодирует аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 68. Такой вариант осуществления описан более подробно в таблице 8. В другом варианте осуществления кассета тандемной экспрессии может содержать полинуклеотид, который на приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 67 без сигнального пептида SEQ ID NO: 31, который кодирует аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 68 без сигнального пептида SEQ ID NO: 32. Как показано в таблице 8, нацеливающий на CD3 белок отделяется от мутантного оболочечного белка VSV-G посредством саморасщепляющегося пептида P2A. В определенных вариантах осуществления этот пептид P2A может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 69, и пептид P2A может иметь аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 70.

5 **Таблица 8. Нацеливающая на CD3 молекула, коэкспрессируемая с мутантным VSV-G**

<b>Полноразмерная молекула</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота (сигнальный пептид подчеркнут)</b>
ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTC	<u>MALPVTALLLPLALLLHAAR</u> PDIQMTQ
CTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC	TTSSLASLGDRVTISCRASQDIRNYLN
GCCAGGCCGGACATCCAGATGACCCA	WYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSK
GACCACCTCCTCCCTGTCTGCCTCTCTG	FSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQ
GGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAG	GNTLPWTFAGGTKLEIKRAGGGSGGGS
GGCAAGTCAGGACATTAGAAATTATTT	GGGSGGGSEVQLQQSGPELVKPGASMK
AAACTGGTATCAACAGAAACCAGATG	ISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLE
GAAGTGTAAACTCCTGATCTACTACA	WMGLINPYKGVSTYNQKFKDKATLTV
CATCAAGATTAACTCAGGAGTCCCAT	DKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARS
CAAAGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGA	GYYGDSDWYFDVWGAGTTVTVSSTTT
ACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAAC	PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG
CTGGAGCAAGAGGATATTGCCACTTAC	GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
TTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCG	LLSLVITLYCGSGATNFSLLKQAGDVEE
TGGACGTTGCTGGAGGCACCAAGCTG	<u>NPGPMKCLLYLAFLFIGV</u> NCKFTIVFPH
GAAATCAAACGGGCTGGAGGCGGTAG	NQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHN
TGGCGGTGGATCAGGTGGAGGCAGCG	DLIGTALQVKMPQSHKAIQADGWMCH
GTGGCGGATCTGAGGTGCAGCTCCAGC	ASKWVTTCDFRWYGPKYITHSIRSFTPS
AGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTG	VEQCKESIEQTKQGTWLNPGFPPQSCG
GAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGG	YATVTDAAEAVIVQVTPHHVLVDEYTGE
CTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACA	WVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTTWHS
CCATGAACTGGGTGAAGCAGAGTCAT	DYKVKGLCDSNLISMDITFFSEDELSS
GGAAAGAACCTTGAGTGGATGGGACT	LGKEGTGFRSNYFAYETGGKACKMQY
TATTAATCCTTACAAAGGTGTTAGTAC	CKHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAAR
CTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGG	FPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERIL
CCACATTAAGTGTAGACAAGTCATCCA	DYSLCQETWSKIRAGLPISPVDLSYLAP
GCACAGCCTACATGGAACCTCCTCAGTC	KNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRVDIA
TGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATT	APILSRMVGMISGTTTEAELWDDWAPY

ACTGTGCAAGATCGGGTACTACGGTG  
ATAGTGACTGGTACTTCGATGTCTGGG  
GCCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCT  
CAACCACTACACCAGCACCTAGACCAC  
CAACACCTGCGCCAACCATCGCATCGC  
AGCCACTGTCTCTGCGCCCAGAGGCAT  
GCCGGCCAGCAGCTGGGGGCGCAGTG  
CACACAAGGGGGCTGGACTTCGCATGT  
GATATCTACATCTGGGCACCATTGGCA  
GGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCA  
CTGGTTATCACCTTTACTGCGGCAGC  
GGCGCCACCAACTTCTCCCTGCTGAAG  
CAGGCCGGCGACGTGGAAGAAAACCC  
TGGCCCCATGAAGTGTCTGCTGTACCT  
GGCGTTCCTGTTTATCGGGGTGAACTG  
CAAGTTCACTATCGTGTTTCCGCACAA  
CCAAAAGGGCAACTGGAAAAACGTGC  
CTTCAAATTACCATTATTGCCCCAGCA  
GCTCGGACCTGAACTGGCACAATGACC  
TCATTGGAACCGCGCTGCAGGTGAAG  
ATGCCACAGAGCCACAAGGCTATCCA  
GGCTGACGGATGGATGTGCCACGCGTC  
AAAATGGGTGACTACCTGCGATTTCCG  
CTGGTACGGACCAAATAACATCACGC  
ACAGCATCAGATCATTACCCCCGTCAG  
TGGAACAATGCAAAGAATCCATCGAA  
CAGACTAAGCAGGGAACCTGGCTGAA  
CCCTGGATTTCCGCCGAGTCGTGTGG  
GTACGCAACCGTGACCGATGCAGAGG  
CCGTGATCGTGCAAGTCACGCCGCATC  
ACGTGCTTGTGGACGAGTACACCGGA  
GAATGGGTCGATTCCCAGTTCATCAAC  
GGCAAGTGCTCCA ACTACATTTGCCCA  
ACCGTGCACAACAGCACTACTTGGCAT  
AGCGACTACAAAGTGAAGGGTCTGTG

EDVEIGPNGVLR TSSGYKFPLYMIGHG  
MLDSDLHLSSKAQVFEHPHIQDAASQL  
PDDESLFFGDTGLSKNPIELVEGWSSW  
KSSIASFFFIIIGLIIGLFLVLRVGIHLCKL  
KHTKKRQIYTDIEMNRLGK (SEQ ID  
NO: 68)

TGATTCCAACCTGATCTCCATGGATAT  
CACTTTCTTCTCGGAAGACGGCGAACT  
GTCCTCACTGGGCAAAGAAGGAACTG  
GGTTTCGCTCAAATTACTTCGCCTACG  
AAACTGGAGGAAAAGCCTGCAAGATG  
CAGTACTGCAAGCACTGGGGCGTGAG  
ACTACCAGCGGTGTCTGGTTCGAGAT  
GGCCGATAAGGACCTGTTTGCAGCAGC  
GAGATTCCCGGAATGCCCTGAGGGATC  
GAGCATCTCCGCTCCAAGCCAACTTC  
AGTGGACGTGAGCCTGATCCAGGACG  
TGGAACGGATTCTCGACTACTCGCTGT  
GCCAGGAGACCTGGTCGAAGATCAGA  
GCGGGACTGCCATCTCACCGGTGGAC  
CTGTCCTACCTGGCGCCAAAGAATCCG  
GGCACTGGACCGGCGTTCACCATCATC  
AACGGCACCTCAAATACTTCGAGACG  
CGGTACATCCGGGTGGACATCGCAGCT  
CCGATCCTCTCCCGGATGGTGGGAATG  
ATCTCGGGGACTACTACCGAAGCCGA  
GCTCTGGGACGACTGGGCACCTTACGA  
GGATGTCGAGATCGGACCTAACGGAG  
TGCTCCGGACCTCCTCCGGGTACAAGT  
TCCCTCTGTACATGATCGGCCATGGCA  
TGCTGGACTCGGATCTGCATCTGTCGT  
CCAAAGCACAGGTGTTTGAACACCCAC  
ACATTCAAGACGCCGCCAGCCAGCTGC  
CGGACGATGAGTCGCTGTTCTTCGGAG  
ACACGGGCTTGTCAAAGAATCCCATCG  
AGCTGGTGGAAAGGATGGTTTTCATCCT  
GGAAAAGCAGCATCGCTTCATTCTTCT  
TCATCATTGGCCTGATCATCGGCCTAT  
TTCTAGTCCTGCGGGTGGGAATTCATC  
TGTGCATCAAGCTCAAGCACACTAAGA  
AGCGGCAAATCTACACTGATATCGAG



ATGAATCGCCTGGGCAAG (SEQ ID NO: 67)	
<b>Сигнальный пептид CD8a</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTC CTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC GCCAGGCCG (SEQ ID NO: 31)	MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 32)
<b>Варибельная область легкой цепи нацеливающего на CD3 белка</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
GACATCCAGATGACCCAGACCACCTCC TCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGA GTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAG GACATTAGAAATTATTTAAACTGGTAT CAACAGAAACCAGATGGAACCTGTAA ACTCCTGATCTACTACACATCAAGATT ACACTCAGGAGTCCCATCAAAGTTCAG TGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTC TCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGA GGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACA GGGTAATACGCTTCCGTGGACGTTTCGC TGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC GGGCT (SEQ ID NO: 33)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDI RNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHS GVPSKFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAT YFCQQGNTLPWTFAGGKLEIKRA (SEQ ID NO: 34)
<b>Линкер G3S</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
GGAGGCGGTAGTGGCGGTGGATCAGG TGGAGGCAGCGGTGGCGGATCT (SEQ ID NO: 35)	GGGSGGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 36)
<b>Варибельная область тяжелой цепи нацеливающего на CD3 белка</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
GAGGTGCAGCTCCAGCAGTCTGGACCT GAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATG AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTAC TCATTCACTGGCTACACCATGAACTGG GTGAAGCAGAGTCATGGAAAGAACCT	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGY SFTGYTMNWVKQSHGKNLEWMGLINP YKGVSTYNQKFKDKATLTVDKSSSTAY MELLSLTSEDSAVYYCARSGYYGDS WYFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:

TGAGTGGATGGGACTTATTAATCCTTA CAAAGGTGTTAGTACCTACAACCAGA AGTTCAAGGACAAGGCCACATTAАСТ GTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTAC ATGGAАСТCCTCAGTCTGACATCTGAG GACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGA TCGGGGTACTACGGTGATAGTGAСТGG TACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACC ACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 37)	38)
<b>Шарнирная область и трансмембранный домен CD8a</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
ACCACTACACCAGCACCTAGACCACCA ACACCTGCGCCAACCATCGCATCGCAG CCTGTCTCTGCGCCAGAGGCATGC CGGCCAGCAGCTGGGGGCGCAGTGCA CACAAGGGGGCTGGACTTCGCATGTG ATATCTACATCTGGGCACCATTGGCAG GGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCAC TGGTTATCACCTTTACTGC (SEQ ID NO: 39)	TTTPAPRPPTPAPTIAAQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC GVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 40)
<b>Саморасщепляющийся пептид P2A</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
GGCAGCGGCGCCACCAACTTCTCCCTG CTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAAGA AAACCCTGGCCCC (SEQ ID NO: 69)	GSGATNFSLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 70)
<b>Сигнальная последовательность VSV-G</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
ATGAAGTGTCTGCTGTACCTGGCGTTC CTGTTTATCGGGGTGAACTGC (SEQ ID NO: 71)	MKCLLYLAFLFIGVNC (SEQ ID NO: 72)
<b>Мутантный VSV-G (Trop-002)</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
AAGTTCACTATCGTGTTCGCGACAAC	KFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSS

CAAAAGGGCAACTGGAAAAACGTGCC  
TTCAAATTACCATTATTGCCCCAGCAG  
CTCGGACCTGAACTGGCACAATGACCT  
CATTGGAACCGCGCTGCAGGTGAAGA  
TGCCACAGAGCCACAAGGCTATCCAG  
GCTGACGGATGGATGTGCCACGCGTCA  
AAATGGGTGACTACCTGCGATTTCCGC  
TGGTACGGACCAAATAACATCACGCA  
CAGCATCAGATCATTACCCCGTCAGT  
GGAACAATGCAAAGAATCCATCGAAC  
AGACTAAGCAGGGAACCTGGCTGAAC  
CCTGGATTTCCGCCGAGTCGTGTGGG  
TACGCAACCGTGACCGATGCAGAGGC  
CGTGATCGTGCAAGTCACGCCGCATCA  
CGTGCTTGTGGACGAGTACACCGGAG  
AATGGGTGCGATTCCCAGTTCATCAACG  
GCAAGTGCTCCAACACTACATTTGCCAA  
CCGTGCACAACAGCACTACTTGGCACA  
GCGACTACAAAGTGAAGGGTCTGTGT  
GATTCCAACCTGATCTCCATGGATATC  
ACTTTCTTCTCGGAAGACGGCGAACTG  
TCCTCACTGGGCAAAGAAGGAACTGG  
GTTTCGCTCAAATACTTCGCCTACGA  
AACTGGAGGAAAAGCCTGCAAGATGC  
AGTACTGCAAGCACTGGGGCGTGAGA  
CTACCCAGCGGTGTCTGGTTCGAGATG  
GCCGATAAGGACCTGTTTGCAGCAGCG  
AGATTCCCGGAATGCCCTGAGGGATCG  
AGCATCTCCGCTCCAAGCCAAACTTCA  
GTGGACGTGAGCCTGATCCAGGACGT  
GGAACGGATTCTCGACTACTCGCTGTG  
CCAGGAGACCTGGTCGAAGATCAGAG  
CGGGACTGCCCATCTCACCGGTGGACC  
TGTCTACCTGGCGCCAAAGAATCCGG  
GCACTGGACCGGCGTTCACCATCATCA

SDLNWHNDLIGTALQVKMPQSHKAIQA  
DGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITH  
SIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTWLNPGF  
PPQSCGYATVTDAAEAVIVQVTPHHVLV  
DEYTG EWVDSQFINGKCSNYICPTVHN  
STTWHS DYKVKGLCDSNLISMDITFFSE  
DGELSSLGKEGTGFRSNYFAYETGGKA  
CKMQYCKHWGVRLPSGVWFEMADKD  
LFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLI  
QDVERILDYSLCQETWSKIRAGLPISPV  
DLSYLAPKNPGTGP AFTIINGTLKYFETR  
YIRVDIAAPILSRMVGMISGTTTEAELW  
DDWAPYEDVEIGPNGVLR TSSGYKFPL  
YMIGHGMLDSDLHLSSKAQVFEHPHIQ  
DAASQLPDES LFFGDTGLSKNPIELVE  
GWFSSWKSSIASFFFIIGLIIGLFLVLRVG  
IHLCIK LKHTKKRQIYTDIEMNRLGK

(SEQ ID NO: 74)

ACGGCACCCCTCAAATACTTCGAGACGC GGTACATCCGGGTGGACATCGCAGCTC CGATCCTCTCCCGGATGGTGGGAATGA TCTCGGGGACTACTACCGAAGCCGAGC TCTGGGACGACTGGGCACCTTACGAGG ATGTCGAGATCGGACCTAACGGAGTG CTCCGGACCTCCTCCGGGTACAAGTTC CCTCTGTACATGATCGGCCATGGCATG CTGGACTCGGATCTGCATCTGTCTGTC AAAGCACAGGTGTTTGAACACCCACA CATTCAAGACGCCGCCAGCCAGCTGCC GGACGATGAGTCGCTGTTCTTCGGAGA CACGGGCTTGTCAAAGAATCCCATCGA GCTGGTGGAAGGATGGTTTTTCATCCTG GAAAAGCAGCATCGCTTCATTCTTCTT CATCATTTGGCCTGATCATCGGCCTATT TCTAGTCCTGCGGGTGGGAATTCATCT GTGCATCAAGCTCAAGCACACTAAGA AGCGGCAAATCTACACTGATATCGAG ATGAATCGCCTGGGCAAG (SEQ ID NO: 73)	
---	--

В другом варианте осуществления кассета тандемной экспрессии плазмиды с env VSV-G кодирует нацеливающий белок CD80 и мутантный оболочечный белок VSV-G. Например, в конкретном варианте осуществления кассета тандемной экспрессии может содержать полинуклеотид в соответствии с SEQ ID NO: 75, который кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76. Такой вариант осуществления описан более подробно в таблице 9. Как показано в таблице 9, нацеливающий белок CD80 отделяется от мутантного оболочечного белка VSV-G посредством саморасщепляющегося пептида P2A, кодируемого SEQ ID NO: 69 и имеющего аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления, где кассета тандемной экспрессии плазмиды с env VSV-G кодирует нацеливающий белок CD80 и мутантный оболочечный белок VSV-G, кассета тандемной экспрессии может содержать полинуклеотид, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 75, которая кодирует

аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 76. В определенных вариантах осуществления нацеливающий белок CD80 отделяется от мутантного оболочечного белка VSV-G посредством саморасщепляющегося пептида P2A, кодирующего последовательность нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 69, и саморасщепляющийся пептид P2A содержит аминокислоту, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 70.

**Таблица 9. Нацеливающая на Т-клетки молекула CD80, коэкспрессируемая с мутантной полноразмерной молекулой**

Полноразмерная молекула	
Нуклеотид	Аминокислота (сигнальная последовательность подчеркнута)
ATGGGTCATACACGCCGCCAAGGAAC	<u>MGHTRROGTSPSKCPYLNFFQLLVL</u> AG
CTCACCATCTAAGTGCCCATATCTGAA	<u>LSHFCSGVIHVTK</u> EVKEVATLSCGHNV
TTTCTTTCAACTTCTCGTGCTGGCGGG	VEELAQTRIWQKEK <del>K</del> MVLTMMSGD
GCTCAGTCATTTCTGCAGTGGGGTCAT	MNIWPEYKNRTIFDITN <del>N</del> SIVILALRPS
TCACGTTACTAAAGAGGTCAAGGAGG	DEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTL
TCGCAACATTGAGTTGTGGCCATAACG	SVKADFPTPSISDFEIP <del>T</del> SNIRRIICSTSGG
TATCAGTTGAAGAACTCGCGCAGACAC	FPEPHLSWLENGEELNAIN <del>T</del> TVSQDPET
GGATTTACTGGCAAAGGAAAAGAAG	ELYAVSSKLDFNMTTNH <del>S</del> FMCLIKYGH
ATGGTGTGACAATGATGAGCGGTGAC	LRVNQTFNWNTTKQEHFPD <del>N</del> LLPSWAI
ATGAACATTTGGCCAGAGTACAAAAA	TLISVNGIFVICCLTYCFAP <del>R</del> CREGSGAT
TCGAACGATATTCGATATAACCAATAA	NFSLLKQAGDVEENPG <del>M</del> KCLLYLAFL
CTTGTCATAGTAATACTTGCCTTGCG	<u>FIGVNC</u> KFTIVFPHNQKGNWKNVPSNY
ACCTTCTGACGAGGGAACGTATGAATG	HYCPSSDLNWHNDLIG <del>T</del> ALQVKMPQS
TGTAGTGCTTAAGTATGAAAAGATGC	HKAIQADGWMCHASKW <del>V</del> TTCDFRWY
CTTTAAGCGGGAACACTTGGCTGAGGT	GPKYITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQG
TACACTCTCCGTTAAGGCGGACTTTCC	TWLNPGFPPQSCGYATV <del>T</del> DAEAVIVQV
TACGCCGTCTATATCCGACTTCGAGAT	TPHHVLVDEYTG <del>E</del> WVDSQFINGKCSNY
ACCCACTTCTAACATTCGACGCATCAT	ICPTVHNSTTWHSDYK <del>V</del> GLCDSNLIS
TTGCTCAACCTCAGGTGGTTTCCCAGA	MDITFFSE <del>D</del> GELSSLGKEGTGFRS <del>N</del> YFA

GCCTCACTTGAGCTGGCTGGAGAATGG  
CGAAGAACTTAACGCAATCAATACCA  
CGGTGTCCCAAGACCCGGAGACAGAG  
CTGTACGCCGTGTCATCCAAACTGGAT  
TTAACATGACGACAAATCATAGTTTC  
ATGTGTCTGATCAAATATGGGCATCTC  
AGGGTGAATCAGACTTTTAATTGGAAC  
ACTACCAAACAAGAGCACTTCCCAGAT  
AATCTGTTGCCAAGCTGGGCGATAACT  
CTTATCTCCGTCAACGGTATCTTCGTA  
ATTTGCTGCCTCACCTATTGTTTCGCGC  
CTCGATGCCGAGAAGGCAGCGGCGCC  
ACCAACTTCTCCCTGCTGAAGCAGGCC  
GGCGACGTGGAAGAAAACCCTGGCCC  
CATGAAGTGTCTGCTGTACCTGGCGTT  
CCTGTTTATCGGGGTGAACTGCAAGTT  
CACTATCGTGTTTCCGCACAACCAAAA  
GGGCAACTGGAAAAACGTGCCTTCAA  
ATTACCATTATTGCCCCAGCAGCTCGG  
ACCTGAACTGGCACAATGACCTCATTG  
GAACCGCGCTGCAGGTGAAGATGCCA  
CAGAGCCACAAGGCTATCCAGGCTGA  
CGGATGGATGTGCCACGCGTCAAAT  
GGGTGACTACCTGCGATTTCCGCTGGT  
ACGGACCAAATAACATCACGCACAGC  
ATCAGATCATTACCCCGTCAGTGGAA  
CAATGCAAAGAATCCATCGAACAGAC  
TAAGCAGGGAACCTGGCTGAACCCTG  
GATTTCCGCCGAGTCGTGTGGGTACG  
CAACCGTGACCGATGCAGAGGCCGTG  
ATCGTGCAAGTCACGCCGCATCACGTG  
CTTGTGGACGAGTACACCGGAGAATG  
GGTCGATTCCCAGTTCATCAACGGCAA  
GTGCTCCAACACTACATTTGCCCAACCGT  
GCACAACAGCACTACTTGGCACAGCG

YETGGKACKMQYCKHWGVRLPSGVW  
FEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQ  
TSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWSKIR  
AGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIING  
TLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVGMI  
TTEAELWDDWAPYEDVEIGPNGVLR  
TS  
SGYKFPLYMIGHGMLDSDLHLSSKAQV  
FEHPHIQDAASQLPDDESFFGDTGLSK  
NPIELVEGWFFSSWKSSIASFFFII  
GLIIGLF  
LVLRVGIHLCKIKLKHTRQIYTDIEMN  
RLGK

(SEQ ID NO: 76)

ACTACAAAGTGAAGGGTCTGTGTGATT  
CCAACCTGATCTCCATGGATATCACTT  
TCTTCTCGGAAGACGGCGAACTGTCCT  
CACTGGGCAAAGAAGGAACTGGGTTT  
CGCTCAAATTACTTCGCCTACGAAACT  
GGAGGAAAAGCCTGCAAGATGCAGTA  
CTGCAAGCACTGGGGCGTGAGACTAC  
CCAGCGGTGTCTGGTTCGAGATGGCCG  
ATAAGGACCTGTTTGCAGCAGCGAGAT  
TCCCGGAATGCCCTGAGGGATCGAGC  
ATCTCCGCTCCAAGCCAACTTCAGTG  
GACGTGAGCCTGATCCAGGACGTGGA  
ACGGATTCTCGACTACTCGCTGTGCCA  
GGAGACCTGGTCGAAGATCAGAGCGG  
GACTGCCCATCTCACCGGTGGACCTGT  
CCTACCTGGCGCCAAAGAATCCGGGC  
ACTGGACCGGCGTTCACCATCATCAAC  
GGCACCTCAAATACTTCGAGACGCGG  
TACATCCGGGTGGACATCGCAGCTCCG  
ATCCTCTCCCGGATGGTGGGAATGATC  
TCGGGGACTACTACCGAAGCCGAGCTC  
TGGGACGACTGGGCACCTTACGAGGA  
TGTCGAGATCGGACCTAACGGAGTGCT  
CCGGACCTCCTCCGGGTACAAGTTCCC  
TCTGTACATGATCGGCCATGGCATGCT  
GGA CT CGGATCTGCATCTGTCGTCCAA  
AGCACAGGTGTTTGAACACCCACACAT  
TCAAGACGCCGCCAGCCAGCTGCCGG  
ACGATGAGTCGCTGTTCTTCGGAGACA  
CGGGCTTGTC AAAGAATCCCATCGAGC  
TGGTGGAAGGATGGTTTTTCATCCTGGA  
AAAGCAGCATCGCTTCATTCTTCTTCA  
TCATTGGCCTGATCATCGGCCTATTTCT  
AGTCCTGCGGGTGGGAATTCATCTGTG  
CATCAAGCTCAAGCACACTAAGAAGC

GGCAAATCTACACTGATATCGAGATGA ATCGCCTGGGCAAG (SEQ ID NO: 75)	
<b>Сигнальный пептид CD80</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
ATGGGTCATACACGCCGCAAGGAAC CTCACCATCTAAGTGCCCATATCTGAA TTTCTTTCAACTTCTCGTGCTGGCGGG GCTCAGTCATTTCTGCAGTGGGGTC (SEQ ID NO: 3)	MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAG LSHFCSGV (SEQ ID NO: 4)
<b>Внеклеточный домен (ECD) CD80</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
ATTACGTTACTAAAGAGGTCAAGGA GGTCGCAACATTGAGTTGTGGCCATAA CGTATCAGTTGAAGAACTCGCGCAGAC ACGGATTTACTGGCAAAAAGGAAAAGA AGATGGTGTGACAATGATGAGCGGT GACATGAACATTTGGCCAGAGTACAA AAATCGAACGATATTCGATATAACCAA TAACTTGTCCATAGTAATACTTGCCTT GCGACCTTCTGACGAGGGAACGTATG AATGTGTAGTGCTTAAGTATGAAAAG ATGCCTTTAAGCGGGAACACTTGGCTG AGGTTACACTCTCCGTTAAGGCGGACT TTCCTACGCCGTCTATATCCGACTTCG AGATACCACTTCTAACATTCGACGCA TCATTTGCTCAACCTCAGGTGGTTTCC CAGAGCCTCACTTGAGCTGGCTGGAGA ATGGCGAAGAACTTAACGCAATCAAT ACCACGGTGTCCCAAGACCCGGAGAC AGAGCTGTACGCCGTGTCATCCAACT GGATTTTAACATGACGACAAATCATAG TTTCATGTGTCTGATCAAATATGGGCA TCTCAGGGTGAATCAGACTTTTAATTG	IHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQT RIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEY KNRTIFDITNLSIVILALRPSDEGTYEC VVLKYEKDAFKREHLAEVTLVSKADFP TPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLS WLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSS KLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTF NWNTTKQEHPDNLLPS (SEQ ID NO: 6)



GAACACTACCAAACAAGAGCACTTCC CAGATAATCTGTTGCCAAGC (SEQ ID NO: 5)	
<b>Трансмембранный и внутриклеточный домен CD80</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
TGGGCGATAACTCTTATCTCCGTCAAC GGTATCTTCGTAATTTGCTGCCTCACCT ATTGTTTCGCGCCTCGATGCCGAGAA (SEQ ID NO: 7)	WAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRE (SEQ ID NO: 8)
<b>Саморасщепляющийся P2A</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
GGCAGCGGCGCCACCAACTTCTCCCTG CTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAAGA AAACCCTGGCCCC (SEQ ID NO: 69)	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 70)
<b>Сигнальная последовательность VSV-G</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
ATGAAGTGTCTGCTGTACCTGGCGTTC CTGTTTATCGGGGTGAACTGC (SEQ ID NO: 71)	MKCLLYLAFLFIGVNC (SEQ ID NO: 72)
<b>Мутантный VSV-G</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
AAGTTCACTATCGTGTTTCCGCACAAC CAAAAGGGCAACTGGAAAAACGTGCC TTCAAATTACCATTATTGCCCCAGCAG CTCGGACCTGAACTGGCACAATGACCT CATTGGAACCGCGCTGCAGGTGAAGA TGCCACAGAGCCACAAGGCTATCCAG GCTGACGGATGGATGTGCCACGCGTCA AAATGGGTGACTACCTGCGATTTCCGC TGGTACGGACCAAAATACATCACGCA CAGCATCAGATCATTACCCCGTCAGT GGAACAATGCAAAGAATCCATCGAAC AGACTAAGCAGGGAACCTGGCTGAAC CCTGGATTTCCGCCGCAGTCGTGTGGG	KFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSS SDLNWHNDLIGTALQVKMPQSHKAIQA DGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITH SIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTWLNPGF PPQSCGYATVTDAAEVIVQVTPHHVLV DEYTGEWVDSQFINGKCSNYICPTVHN STTWHSYKVKGLCDSNLISMDITFFSE DGELSSLGKEGTGFRSNYFAYETGGKA CKMQYCKHWGVRLPSGVWFEMADKD LFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLI QDVERILDYSLCQETWSKIRAGLPISPV DLSYLAPKNPGTGPFTIINGTLKYFETR YIRVDIAAPILSRMVGMISSGTTEAELW

TACGCAACCGTGACCGATGCAGAGGC  
CGTGATCGTGCAAGTCACGCCGCATCA  
CGTGCTTGTGGACGAGTACACCGGAG  
AATGGGTCGATTCCCAGTTCATCAACG  
GCAAGTGCTCCAACACTACATTTGCCCAA  
CCGTGCACAACAGCACTACTTGGCACA  
GCGACTACAAAGTGAAGGGTCTGTGT  
GATTCCAACCTGATCTCCATGGATATC  
ACTTTCTTCTCGGAAGACGGCGAACTG  
TCCTCACTGGGCAAAGAAGGAACTGG  
GTTTCGCTCAAATTACTTCGCCTACGA  
AACTGGAGGAAAAGCCTGCAAGATGC  
AGTACTGCAAGCACTGGGGCGTGAGA  
CTACCCAGCGGTGTCTGGTTCGAGATG  
GCCGATAAGGACCTGTTTGCAGCAGCG  
AGATTCCCGGAATGCCCTGAGGGATCG  
AGCATCTCCGCTCCAAGCCAACTTCA  
GTGGACGTGAGCCTGATCCAGGACGT  
GGAACGGATTCTCGACTACTCGCTGTG  
CCAGGAGACCTGGTCGAAGATCAGAG  
CGGGACTGCCCATCTCACCGGTGGACC  
TGTCTACCTGGCGCCAAAGAATCCGG  
GCACTGGACCGGCGTTCACCATCATCA  
ACGGCACCCCTCAAATACTTCGAGACGC  
GGTACATCCGGGTGGACATCGCAGCTC  
CGATCCTCTCCCGGATGGTGGGAATGA  
TCTCGGGGACTACTACCGAAGCCGAGC  
TCTGGGACGACTGGGCACCTTACGAGG  
ATGTTCGAGATCGGACCTAACGGAGTG  
CTCCGGACCTCCTCCGGGTACAAGTTC  
CCTCTGTACATGATCGGCCATGGCATG  
CTGGACTCGGATCTGCATCTGTCTGTC  
AAAGCACAGGTGTTTGAACACCCACA  
CATTCAAGACGCCGCCAGCCAGCTGCC  
GGACGATGAGTCGCTGTTCTTCGGAGA

DDWAPYEDVEIGPNGVLRRTSSGYKFPL  
YMIGHGMLDSDLHLSSKAQVFEHPHIQ  
DAASQLPDDESLEFFGDTGLSKNPIELVE  
GWFSSWKSSIASFFFIIGLIIGLFLVLRVG  
IHLCIKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK

(SEQ ID NO: 74)

CACGGGCTTGTCAAAGAATCCCATCGA GCTGGTGGAAGGATGGTTTTTCATCCTG GAAAAGCAGCATCGCTTCATTCTTCTT CATCATTTGGCCTGATCATCGGCSTATT TCTAGTCCTGCGGGTGGGAATTCATCT GTGCATCAAGCTCAAGCACACTAAGA AGCGGCAAATCTACACTGATATCGAG ATGAATCGCCTGGGCAAG (SEQ ID NO: 73)	
--	--

В другом варианте осуществления касета тандемной экспрессии плазмиды с env VSV-G кодирует нацеливающий белок CD80, нацеливающий на CD3 белок и мутантный оболочечный белок VSV-G. Например, в конкретном варианте осуществления касета тандемной экспрессии может содержать нацеливающий полинуклеотид CD80 в соответствии с SEQ ID NO: 1, который кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В конкретном варианте осуществления касета тандемной экспрессии может содержать нацеливающий на CD3 полинуклеотид в соответствии с SEQ ID NO: 9, который кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. Такой вариант осуществления описан более подробно в таблице 3. Как показано в таблице 3, нацеливающий белок CD80 отделяется от нацеливающего на CD3 белка посредством саморасщепляющегося пептида P2A, кодируемого SEQ ID NO: 29, имеющей аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 30.

В некоторых вариантах осуществления, где касета тандемной экспрессии плазмиды с env VSV-G кодирует нацеливающий белок CD80, нацеливающий на CD3 белок и мутантный оболочечный белок VSV-G, касета тандемной экспрессии может содержать полинуклеотид, кодирующий нацеливающий белок CD80 и нацеливающий на CD3 белок, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 21, которая кодирует аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 22. В определенных вариантах осуществления нацеливающий белок CD80 отделяется от нацеливающего на CD3 белка посредством саморасщепляющегося пептида P2A, кодирующего последовательность нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 29, и саморасщепляющийся пептид P2A

содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 30.

5 В некоторых вариантах осуществления, где кассета тандемной экспрессии плазмиды с env VSV-G кодирует нацеливающий белок CD80, нацеливающий на CD3 белок и мутантный оболочечный белок VSV-G, нацеливающий белок CD80 и нацеливающий на CD3 белок отделяется от мутантного оболочечного белка VSV-G посредством саморасщепляющегося пептида 2A.

10 В некоторых вариантах осуществления четырехплазмидной системы LVV плазида с GagPol содержит кассету тандемной экспрессии, которая кодирует предшественник полипротеина Gag и предшественник полипротеина Pol, а также нацеливающий белок, как раскрыто в данном документе. В конкретных вариантах осуществления кассета тандемной экспрессии, включенная в плазмиду с GagPol, содержит полинуклеотид, который кодирует первый сигнальный пептид, полинуклеотид, который кодирует нацеливающий белок, 15 полинуклеотид, который кодирует одно из внутреннего сайта связывания рибосомы (IRES), сайта расщепления фурином или вирусного пептида 2A, полинуклеотид, который кодирует второй сигнальный пептид, и полинуклеотид, который кодирует предшественник полипротеина Gag и предшественник полипротеина Pol. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий предшественник полипротеина Gag и предшественник полипротеина Pol, расположен в положении 5' от полинуклеотида, кодирующего нацеливающий белок. В других вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий предшественник полипротеина Gag и предшественник полипротеина Pol, расположен в положении 3' от полинуклеотида, кодирующего нацеливающий белок. Полинуклеотид, который кодирует нацеливающий белок, и полинуклеотид, который 25 кодирует предшественник полипротеина Gag и предшественник полипротеина Pol, разделены в тандемной кассете полинуклеотидом, который кодирует IRES, сайт расщепления фурином или вирусный пептид 2A, что позволяет осуществлять коэкспрессию предшественника полипротеина Gag и предшественника полипротеина Pol и нацеливающего белка из одной mRNA. В определенных вариантах осуществления вирусный пептид 2A представляет собой пептид свиного тешовируса-1 (P2A), вируса *Thosea asigna* (T2A), вируса ринита А лошадей (E2A), вируса ящура (F2A) или их вариант. Конкретные примеры аминокислотных и нуклеотидных последовательностей вирусных пептидов 2A представлены в таблице 7

35 В некоторых вариантах осуществления плазмиду с GagPol, содержащую кассету тандемной экспрессии, кодирующую предшественник полипротеина Gag и

предшественник полипротеина Pol и нацеливающий белок, трансфицируют в клетки-продуценты при более высокой молярной концентрации, чем плаزمиды env VSV-G. В некоторых вариантах осуществления плазмиду с GagPol, содержащую каскету тандемной экспрессии, кодирующую предшественник полипротеина Gag и предшественник полипротеина Pol и нацеливающий белок, трансфицируют в клетки-продуценты при более низкой молярной концентрации, чем плазмиду с env VSV-G.

В одном варианте осуществления каскета тандемной экспрессии плазмиды с GagPol кодирует нацеливающий на CD3 белок и предшественник полипротеина Gag и предшественник полипротеина Pol. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий на CD3 белок отделяется от предшественника полипротеина Gag и предшественника полипротеина Pol посредством саморасщепляющегося пептида P2A.

В другом варианте осуществления каскета тандемной экспрессии плазмиды с GagPol кодирует нацеливающий белок CD80 и предшественник полипротеина Gag и предшественник полипротеина Pol. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий белок CD80 отделяется от предшественника полипротеина Gag и предшественника полипротеина Pol посредством саморасщепляющегося пептида P2A.

В некоторых вариантах осуществления четырехплазмидной системы LVV плазмиды с Rev содержит каскету тандемной экспрессии, которая кодирует белок Rev и нацеливающий белок, как описано в данном документе. В конкретных вариантах осуществления каскета тандемной экспрессии, включенная в плазмиду Rev, содержит полинуклеотид, который кодирует первый сигнальный пептид, полинуклеотид, который кодирует нацеливающий белок, полинуклеотид, который кодирует одно из внутреннего сайта связывания рибосомы (IRES), сайта расщепления фурином или вирусного пептида 2A, полинуклеотид, который кодирует второй сигнальный пептид, и полинуклеотид, который кодирует белок Rev. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий белок Rev, расположен в положении 5' от полинуклеотида, кодирующего нацеливающий белок. В других вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий белок Rev, расположен в положении 3' от полинуклеотида, кодирующего нацеливающий белок. Полинуклеотид, который кодирует нацеливающий белок, и полинуклеотид, который кодирует белок Rev, разделены в тандемной каскете полинуклеотидом, который кодирует IRES, сайт расщепления фурином или вирусный пептид 2A, что позволяет осуществлять коэкспрессию белка Rev и нацеливающего белка с помощью одной mRNA. В определенных вариантах осуществления вирусный пептид 2A представляет собой пептид свиного тешовируса-1 (P2A), вируса *Thosea asigna* (T2A), вируса ринита А лошадей (E2A), вируса ящура (F2A) или их вариант. Конкретные примеры аминокислотных и

нуклеотидных последовательностей вирусных пептидов 2А представлены в таблице 7

В некоторых вариантах осуществления плазмиду с Rev содержащую кассету тандемной экспрессии, кодирующую белок Rev и нацеливающий белок, трансфицируют в клетки-продуценты при более высокой молярной концентрации, чем плазида env VSV-G.

5 В некоторых вариантах осуществления плазмиду с Rev, содержащую кассету тандемной экспрессии, кодирующую белок Rev и нацеливающий белок, трансфицируют в клетки-продуценты при более низкой молярной концентрации, чем плазмиду с env VSV-G.

10 В одном варианте осуществления кассета тандемной экспрессии плазмиды с Rev кодирует нацеливающий на CD3 белок и белок Rev. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий на CD3 белок отделяется от белка Rev посредством саморасщепляющегося пептида P2A.

15 В другом варианте осуществления кассета тандемной экспрессии плазмиды с GagPol кодирует нацеливающий белок CD80 и белок Rev. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий белок CD80 отделяется от белка Rev посредством саморасщепляющегося пептида P2A.

Примеры мутантных последовательностей VSV-G, которые можно применять в четырехплазмидной лентивирусной векторной системе 3-го поколения по настоящему изобретению, представлены в таблице 10.

**Таблица 10. Эталонные и мутантные последовательности VSV-G WT**

<b>VSV-G WT</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота (сигнальная последовательность подчеркнута)</b>
ATGAAGTGTCTGCTGTACCTGGCGTTCC	<u>МКСLЛYLAFLFIGVNC</u> KFTIVFPHNQK
TGTTTATCGGGGTGAACTGCAAGTTCAC	GNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLI
TATCGTGTTTCCGCACAACCAAAAGGG	GTALQVKMPKSHKAIQADGWMCHAS
CAACTGGAAAACGTGCCTTCAAATTA	KWVTTCDFRWYGPKYITHSIRSFTPSV
CCATTATTGCCCCAGCAGCTCGGACCTG	EQCKESIEQTKQGTWLNPGFPPQSCGY
AACTGGCACAATGACCTCATTGGAACC	ATVTDAEAVIVQVTPHHVLVDEYTGE
GCGCTGCAGGTGAAGATGCCAAAGAGC	WVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTTWHS
CACAAGGCTATCCAGGCTGACGGATGG	DYKVKGLCDSNLISMDITFFSEDGELSS
ATGTGCCACGCGTCAAAATGGGTGACT	LGKEGTGFRSNYFAYETGGKACKMQY
ACCTGCGATTTCCGCTGGTACGGACCA	CKHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAA
AAATACATCACGCACAGCATCAGATCA	RFPECEPSSISAPSQTSVDVSLIQDVER
TTCACCCCGTCAGTGGAACAATGCAAA	ILDYSLCQETWSKIRAGLPISPVDLSYL
GAATCCATCGAACAGACTAAGCAGGGA	APKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRV

ACCTGGCTGAACCCTGGATTTCCGCCGC  
AGTCGTGTGGGTACGCAACCGTGACCG  
ATGCAGAGGCCGTGATCGTGCAAGTCA  
CGCCGCATCACGTGCTTGTGGACGAGT  
ACACCGGAGAATGGGTCGATTCCCAGT  
TCATCAACGGCAAGTGCTCCA ACTACA  
TTTGCCCAACCGTGCACAACAGCACTA  
CTTGGCACAGCGACTACAAAGTGAAGG  
GTCTGTGTGATTCCAACCTGATCTCCAT  
GGATATCACTTTCTTCTCGGAAGACGGC  
GAACTGTCTCACTGGGCAAAGAAGGA  
ACTGGGTTTCGCTCAAATTA CTTCGCCT  
ACGAAACTGGAGGAAAAGCCTGCAAG  
ATGCAGTACTGCAAGCACTGGGGCGTG  
AGACTACCCAGCGGTGTCTGGTTCGAG  
ATGGCCGATAAGGACCTGTTTGCAGCA  
GCGAGATTCCCGGAATGCCCTGAGGGA  
TCGAGCATCTCCGCTCCAAGCCAACTT  
CAGTGGACGTGAGCCTGATCCAGGACG  
TGGAACGGATTCTCGACTACTCGCTGTG  
CCAGGAGACCTGGTCGAAGATCAGAGC  
GGGACTGCCCATCTCACC GGTTGGACCT  
GTCCTACCTGGCGCCAAAGAATCCGGG  
CACTGGACCGGCGTTCACCATCATCAA  
CGGCACCCTCAAATACTTCGAGACGCG  
GTACATCCGGGTGGACATCGCAGCTCC  
GATCCTCTCCCGGATGGTGGGAATGAT  
CTCGGGGACTACTACCGAACGCGAGCT  
CTGGGACGACTGGGCACCTTACGAGGA  
TGTCGAGATCGGACCTAACGGAGTGCT  
CCGGACCTCCTCCGGGTACAAGTTCCT  
CTGTACATGATCGGCCATGGCATGCTG  
GACTCGGATCTGCATCTGTCTGTCAAA  
GCACAGGTGTTTGAACACCCACACATT  
CAAGACGCCGCCAGCCAGCTGCCGGAC

DIAAPILSRMVGMISGTTTERELWDDW  
APYEDVEIGPNGVLR TSSGYKFPLYMI  
GHGMLDSDLHLSSKAQVFEHPHIQDA  
ASQLPDDESLFFGDTGLSKNPIELVEG  
WFSSWKSSIASFFFIIIGLIIGLFLVLRVGI  
HLCIKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK  
(SEQ ID NO: 78)

GATGAGTCGCTGTTCTTCGGAGACACG GGCTTGTCAAAGAATCCCATCGAGCTG GTGGAAGGATGGTTTTTCATCCTGGAAA AGCAGCATCGCTTCATTCTTCTTCATCA TTGGCCTGATCATCGGCCTATTTCTAGT CCTGCGGGTGGGAATTCATCTGTGCATC AAGCTCAAGCACACTAAGAAGCGGCAA ATCTACACTGATATCGAGATGAATCGC CTGGGCAAG (SEQ ID NO: 77)	
<b>Сигнальная последовательность VSV-G WT</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
ATGAAGTGTCTGCTGTACCTGGCGTTCC TGTTTATCGGGGTGAACTGC (SEQ ID NO: 87)	МКСLLYLAFLFIGVNC (SEQ ID NO: 88)
<b>VSV-G WT без сигнальной последовательности</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
AAGTTCACTATCGTGTTC CGCACAAACC AAAAGGGCAACTGGAAAAACGTGCCTT CAAATTACCATTATTGCCCCAGCAGCTC GGACCTGAACTGGCACAATGACCTCAT TGGAACCGCGCTGCAGGTGAAGATGCC AAAGAGCCACAAGGCTATCCAGGCTGA CGGATGGATGTGCCACGCGTCAAAATG GGTGA CTACCTGCGATTTCCGCTGGTAC GGACCAA AATACATCACGCACAGCATC AGATCATTCA CCCC GT CAGTGGAA CAA TGCAAAGAATCCATCGAACAGACTAAG CAGGGAACCTGGCTGAACCCTGGATTT CCGCCG CAGTCGTGTGGGTACGCAACC GTGACCGATGCAGAGGCCGTGATCGTG CAAGTCACGCCGCATCACGTGCTTGTG GACGAGTACACCGGAGAATGGGTCGAT TCCCAGTTCATCAACGGCAAGTGCTCC	KFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPS SSDLNWHNDLIGTALQVKMPKSHKAI QADGWMCHASKWVTTCDFRWYGP YITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTW LNPGFPPQSCGYATVTDAAEAVIVQVTP HHVLVDEYTG EWVDSQFINGKCSNYI CPTVHNSTTWHSYKVKGLCDSNLIS MDITFFSE DGELSSLGKEGTGFRSNYF AYETGGKACKMQYCKHWGVRLPSGV WFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAP SQTSDVSLIQDVERILDYSLCQETWS KIRAGLPISPVDLSYLA PKNPGTGPAFT IINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVG MISGTTTERELWDDWAPYEDVEIGPN GVLRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSDLH LSSKAQVFEHPHIQDAASQLPDDES LFF GDTGLSKNPIELVEGW FSSWKSSIASFF



AACTACATTTGCCCAACCGTGCACAAC  
AGCACTACTTGGCACAGCGACTACAAA  
GTGAAGGGTCTGTGTGATTCCAACCTG  
ATCTCCATGGATATCACTTTCTTCTCGG  
AAGACGGCGAACTGTCCTCACTGGGCA  
AAGAAGGAACTGGGTTTCGCTCAAATT  
ACTTCGCCTACGAACTGGAGGAAAAG  
CCTGCAAGATGCAGTACTGCAAGCACT  
GGGGCGTGAGACTACCCAGCGGTGTCT  
GGTTCGAGATGGCCGATAAGGACCTGT  
TTGCAGCAGCGAGATTCCCGGAATGCC  
CTGAGGGATCGAGCATCTCCGCTCCAA  
GCCAAACTTCAGTGGACGTGAGCCTGA  
TCCAGGACGTGGAACGGATTCTCGACT  
ACTCGCTGTGCCAGGAGACCTGGTCGA  
AGATCAGAGCGGGACTGCCCATCTCAC  
CGGTGGACCTGTCCTACCTGGCGCCAA  
AGAATCCGGGCACTGGACCGGCGTTCA  
CCATCATCAACGGCACCCCTCAAATACTT  
CGAGACGCGGTACATCCGGGTGGACAT  
CGCAGCTCCGATCCTCTCCCGGATGGTG  
GGAATGATCTCGGGGACTACTACCGAA  
CGCGAGCTCTGGGACGACTGGGCACCT  
TACGAGGATGTCGAGATCGGACCTAAC  
GGAGTGCTCCGGACCTCCTCCGGGTAC  
AAGTCCCTCTGTACATGATCGGCCATG  
GCATGCTGGACTCGGATCTGCATCTGTC  
GTCCAAAGCACAGGTGTTTGAACACCC  
ACACATTCAAGACGCCGCCAGCCAGCT  
GCCGGACGATGAGTCGCTGTTCTTCGG  
AGACACGGGCTTGTCAAAGAATCCCAT  
CGAGCTGGTGGAAGGATGGTTTTCATC  
CTGGAAAAGCAGCATCGCTTCATTCTTC  
TTCATCATTGGCCTGATCATCGGCCTAT  
TTCTAGTCCTGCGGGTGGGAATTCATCT

FIIGLIIGLFLVLRVGIHLCIKHKHTKKR  
QIYTDIEMNRLGK  
(SEQ ID NO: 90)

GTGCATCAAGCTCAAGCACACTAAGAA GCGGCAAATCTACACTGATATCGAGAT GAATCGCCTGGGCAAG (SEQ ID NO: 89)	
<b>VSV-G с мутацией Trop-002</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
AAGTTCACTATCGTGTTCCTCGCACAACC AAAAGGGCAACTGGAAAAACGTGCCTT CAAATTACCATTATTGCCCCAGCAGCTC GGACCTGAACTGGCACAATGACCTCAT TGGAACCGCGCTGCAGGTGAAGATGCC ACAGAGCCACAAGGCTATCCAGGCTGA CGGATGGATGTGCCACGCGTCAAAATG GGTGA CTACCTGCGATTTCCGCTGGTAC GGACCAA AATACATCACGCACAGCATC AGATCATTCACCCCGTCAGTGGAACAA TGCAAAGAATCCATCGAACAGACTAAG CAGGGAACCTGGCTGAACCCTGGATTT CCGCCG CAGTCGTGTGGGTACGCAACC GTGACCGATGCAGAGGCCGTGATCGTG CAAGTCACGCCGCATCACGTGCTTGTG GACGAGTACACCGGAGAATGGGTCGAT TCCCAGTTCATCAACGGCAAGTGCTCC AACTACA TTTGCCCAACCGTGCACAAC AGCACTACTTGGCACAGCGACTACAAA GTGAAGGGTCTGTGTGATTCCAACCTG ATCTCCATGGATATCACTTTCTTCTCGG AAGACGGCGAACTGTCCTCACTGGGCA AAGAAGGA ACTGGGTTTCGCTCAAATT ACTTCGCCTACGAAACTGGAGGAAAAG CCTGCAAGATGCAGTACTGCAAGCACT GGGGCGTGAGACTACCCAGCGGTGTCT GGTTCGAGATGGCCGATAAGGACCTGT TTGCAGCAGCGAGATTCCCGGAATGCC CTGAGGGATCGAGCATCTCCGCTCCAA	KFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPS SSDLNWHNDLIGTALQVKMPQSHKAI QADGWMCHASKWVTTCDFRWYGP YITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTW LNPGFPPQSCGYATVTDAAEAVIVQVTP HHVLVDEYTG EWVDSQFINGKCSNYI CPTVHNSTTWHSDYKVKGLCDSNLIS MDITFFSE DGELSSLGKEGTGFRSNYF AYETGGKACKMQYCKHWGVRLPSGV WFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAP SQTSDVSLIQDVERILDYSLCQETWS KIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPAFT IINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVG MISGTTTEAELWDDWAPYEDVEIGPN GVLRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSDLH LSSKAQVFEHPHIQDAASQLPDDES LFF GDTGLSKNPIELVEGW FSSWKSSIASFF FIIGLIIGLFLVLRVGIHL CIK LKHTKKR QIYTDIEMNRLGK (SEQ ID NO: 74)

<p>GCCAAACTTCAGTGGACGTGAGCCTGA  TCCAGGACGTGGAACGGATTCTCGACT  ACTCGCTGTGCCAGGAGACCTGGTCGA  AGATCAGAGCGGGACTGCCCATCTCAC  CGGTGGACCTGTCCTACCTGGCGCCAA  AGAATCCGGGCACTGGACCGGCGTTCA  CCATCATCAACGGCACCCCTCAAATACTT  CGAGACGCGGTACATCCGGGTGGACAT  CGCAGCTCCGATCCTCTCCCGGATGGTG  GGAATGATCTCGGGGACTACTACCGAA  GCCGAGCTCTGGGACGACTGGGCACCT  TACGAGGATGTCGAGATCGGACCTAAC  GGAGTGCTCCGGACCTCCTCCGGGTAC  AAGTTCCTCTGTACATGATCGGCCATG  GCATGCTGGACTCGGATCTGCATCTGTC  GTCCAAAGCACAGGTGTTTGAACACCC  ACACATTCAAGACGCCGCCAGCCAGCT  GCCGGACGATGAGTCGCTGTTCTTCGG  AGACACGGGCTTGTCAAAGAATCCCAT  CGAGCTGGTGGAAGGATGGTTTTTCATC  CTGGAAAAGCAGCATCGCTTCATTCTTC  TTCATCATTGGCCTGATCATCGGCCTAT  TTCTAGTCCTGCGGGTGGGAATTCATCT  GTGCATCAAGCTCAAGCACACTAAGAA  GCGGCAAATCTACACTGATATCGAGAT  GAATCGCCTGGGCAAG (SEQ ID NO: 73)</p>	
<b>VSV-G с мутацией Trop-002</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
<p>AAGTTCACATATCGTGTTTCCGCACAACC  AAAAGGGCAACTGGAAAAACGTGCCTT  CAAATTACCATTATTGCCCCAGCAGCTC  GGACCTGAACTGGCACAATGACCTCAT  TGGAACCGCGCTGCAGGTGAAGATGCC  ACAGAGCCACAAGGCTATCCAGGCTGA  CGGATGGATGTGCCACGCGTCAAATG</p>	<p>KFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPS  SSDLNWHNDLIGTALQVKMPQSHKAI  QADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPK  YITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTW  LNPGFPPQSCGYATVTDAEAVIVQVTP  HHVLVDEYTG EWVDSQFINGKCSNYI  CPTVHNSTTWHSYKVKGLCDSNLIS</p>

GGTGACTACCTGCGATTTCCGCTGGTAC  
GGACCAAATACATCACGCACAGCATC  
AGATCATTACCCCGTCAGTGGAACAA  
TGCAAAGAATCCATCGAACAGACTAAG  
CAGGGAACCTGGCTGAACCCTGGATTT  
CCGCCGCAGTCGTGTGGGTACGCAACC  
GTGACCGATGCAGAGGCCGTGATCGTG  
CAAGTCACGCCGCATCACGTGCTTGTG  
GACGAGTACACCGGAGAATGGGTCGAT  
TCCCAGTTCATCAACGGCAAGTGCTCC  
AACTACATTTGCCCAACCGTGCACAAC  
AGCACTACTTGGCATAGCGACTACAAA  
GTGAAGGGTCTGTGTGATTCCAACCTG  
ATCTCCATGGATATCACTTTCTTCTCGG  
AAGACGGCGAACTGTCCTCACTGGGCA  
AAGAAGGAACTGGGTTTCGCTCAAATT  
ACTTCGCCTACGAACTGGAGGAAAAG  
CCTGCAAGATGCAGTACTGCAAGCACT  
GGGGCGTGAGACTACCCAGCGGTGTCT  
GGTTCGAGATGGCCGATAAGGACCTGT  
TTGCAGCAGCGAGATTCCCGGAATGCC  
CTGAGGGATCGAGCATCTCCGCTCCAA  
GCCAAACTTCAGTGGACGTGAGCCTGA  
TCCAGGACGTGGAACGGATTCTCGACT  
ACTCGCTGTGCCAGGAGACCTGGTCGA  
AGATCAGAGCGGGACTGCCCATCTCAC  
CGGTGGACCTGTCCTACCTGGCGCCAA  
AGAATCCGGGCACTGGACCGGCGTTCA  
CCATCATCAACGGCACCCCTCAAATACTT  
CGAGACGCGGTACATCCGGGTGGACAT  
CGCAGCTCCGATCCTCTCCCGGATGGTG  
GGAATGATCTCGGGGACTACTACCGAA  
GCCGAGCTCTGGGACGACTGGGCACCT  
TACGAGGATGTCGAGATCGGACCTAAC  
GGAGTGCTCCGGACCTCCTCCGGGTAC

MDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYF  
AYETGGKACKMQYCKHWGVRLPSGV  
WFEMADKDLFAARFPECPEGSSISAP  
SQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWS  
KIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPAFT  
IINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVG  
MISGTTTEAELWDDWAPYEDVEIGPN  
GVLRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSDLH  
LSSKAQVFEHPHIQDAASQLPDDESLEF  
GDTGLSKNPIELVEGWFWSSWKSSIASFF  
FIIGLIIGLFLVLRVGIHLCIKHKHTKKR  
QIYTDIEMNRLGK (SEQ ID NO: 74)

AAGTTCCTCTGTACATGATCGGCCATG  
GCATGCTGGACTCGGATCTGCATCTGTC  
GTCCAAAGCACAGGTGTTTGAACACCC  
ACACATTCAAGACGCCGCCAGCCAGCT  
GCCGGACGATGAGTCGCTGTTCTTCGG  
AGACACGGGCTTGTCAAAGAATCCCAT  
CGAGCTGGTGGAAGGATGGTTTTTCATC  
CTGGAAAAGCAGCATCGCTTCATTCTTC  
TTCATCATTGGCCTGATCATCGGCCTAT  
TTCTAGTCCTGCGGGTGGGAATTCATCT  
GTGCATCAAGCTCAAGCACACTAAGAA  
GCGGCAAATCTACACTGATATCGAGAT  
GAATCGCCTGGGCAAGTAG (SEQ ID NO:  
91)

**VSV-G с мутацией Trop-051**

Нуклеотид	Аминокислота
AAGTTCACTATCGTGTTCGACACAACC AAAAGGGCAACTGGAAAAACGTGCCTT CAAATTACCATTATTGCCCCAGCAGCTC GGACCTGAACTGGCACAATGACCTCAT TGGAACCGCGCTGCAGGTGAAGATGCC AAAGAGCCACAAGGCTATCCAGGCTGA CGGATGGATGTGCCACGCGTCAAATG GGTACTACCTGCGATTTCCGCTGGTAC GGACCAAATAACATCACGCACAGCATC AGATCATTACCCCGTCAGTGGAACAA TGCAAAGAATCCATCGAACAGACTAAG CAGGGAACCTGGCTGAACCCTGGATTT CCGCCGAGTCGTGTGGGTACGCAACC GTGACCGATGCAGAGGCCGTGATCGTG CAAGTCACGCCGCATCACGTGCTTGTG GACGAGTACACCGGAGAATGGGTCGAT TCCCAGTTCATCAACGGCAAGTGCTCC AACTACATTTGCCCAACCGTGCACAAC AGCACTACTTGGCACAGCGACTACAAA	KFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPS SSDLNWHNDLIGTALQVKMPKSHKAI QADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPK YITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTW LNPGFPPQSCGYATVTDAAEAVIVQVTP HHVLVDEYTG EWVDSQFINGKCSNYI CPTVHNSTTWHSYKVKGLCDSALAS MDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYF AYETGGKACKMQYCKHWGVRLPSGV WFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAP SQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWS KIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPAFT IINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVG MISGTTAARELWDDWAPYEDVEIGN GVLRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSDLH LSSKAQVFEHPHIQDAASQLPDDES LFF GDTGLSKNPIELVEGW FSSWKSSIASFF FIIGLIIGLFLVLRVGIHL CIK LKHTKKR QIYTDIEMNRLGK (SEQ ID NO: 93)

GTGAAGGGTCTGTGTGATTCCGCCCTG  
GCCTCCATGGATATCACTTTCTTCTCGG  
AAGACGGCGAACTGTCCTCACTGGGCA  
AAGAAGGAACTGGGTTTCGCTCAAATT  
ACTTCGCCTACGAACTGGAGGAAAAG  
CCTGCAAGATGCAGTACTGCAAGCACT  
GGGGCGTGAGACTACCCAGCGGTGTCT  
GGTTCGAGATGGCCGATAAGGACCTGT  
TTGCAGCAGCGAGATTCCCGGAATGCC  
CTGAGGGATCGAGCATCTCCGCTCCAA  
GCCAAACTTCAGTGGACGTGAGCCTGA  
TCCAGGACGTGGAACGGATTCTCGACT  
ACTCGCTGTGCCAGGAGACCTGGTCGA  
AGATCAGAGCGGGACTGCCCATCTCAC  
CGGTGGACCTGTCCTACCTGGCGCAA  
AGAATCCGGGCACTGGACCGGCGTTCA  
CCATCATCAACGGCACCCCTCAAATACTT  
CGAGACGCGGTACATCCGGGTGGACAT  
CGCAGCTCCGATCCTCTCCCGGATGGTG  
GGAATGATCTCGGGGACTACTGCCGCC  
CGCGAGCTCTGGGACGACTGGGCACCT  
TACGAGGATGTCGAGATCGGACCTAAC  
GGAGTGCTCCGGACCTCCTCCGGGTAC  
AAGTTCCCTCTGTACATGATCGGCCATG  
GCATGCTGGACTCGGATCTGCATCTGTC  
GTCCAAAGCACAGGTGTTTGAACACCC  
ACACATTCAAGACGCCGCCAGCCAGCT  
GCCGGACGATGAGTCGCTGTTCTTCGG  
AGACACGGGCTTGTCAAAGAATCCCAT  
CGAGCTGGTGGAAGGATGGTTTTCATC  
CTGGAAAAGCAGCATCGCTTCATTCTTC  
TTCATCATTGGCCTGATCATCGGCCTAT  
TTCTAGTCCTGCGGGTGGGAATTCATCT  
GTGCATCAAGCTCAAGCACACTAAGAA  
GCGGCAAATCTACACTGATATCGAGAT

GAATCGCCTGGGCAAGTAG (SEQ ID NO: 92)	
<b>VSV-G с мутацией Троп-052</b>	
<b>Нуклеотид</b>	<b>Аминокислота</b>
AAGTTCACTATCGTGTTTCCGCACAACC AAAAGGGCAACTGGAAAAACGTGCCTT CAAATTACCATTATTGCCCCAGCAGCTC GGACCTGAACTGGCACAATGACCTCAT TGGAACCGCGCTGCAGGTGAAGATGCC AAAGAGCCACAAGGCTATCCAGGCTGA CGGATGGATGTGCCACGCGTCAAATG GGTGACTACCTGCGATTTCCGCTGGTAC GGACCAAATAACATCACGCACAGCATC AGATCATTACCCCGTCAGTGGAACAA TGCAAAGAATCCATCGAACAGACTAAG CAGGGAACCTGGCTGAACCCTGGATTT CCGCCGCAGTCGTGTGGGTACGCAACC GTGACCGATGCAGAGGCCGTGATCGTG CAAGTCACGCCGCATCACGTGCTTGTG GACGAGTACACCGGAGAATGGGTCGAT TCCCAGTTCATCAACGGCAAGTGCTCC AACTACATTTGCCCAACCGTGCACAAC AGCACTACTTGGCACAGCGACTACAAA GTGAAGGGTCTGTGTGATTCCAACCTG ATCTCCATGGATATCACTTTCTTCTCGG AAGACGGCGAACTGTCCTCACTGGGCA AAGAAGGAACTGGGTTTCGCTCAAATT ACTTCGCCTACGAACTGGAGGAAAAG CCTGCAAGATGCAGTACTGCAAGCACT GGGGCGTGAGACTACCCAGCGGTGTCT GGTTCGAGATGGCCGATAAGGACCTGT TTGCAGCAGCGAGATTCCCGGAATGCC CTGAGGGATCGAGCATCTCCGCTCCAA GCCAAACTTCAGTGGACGTGAGCCTGA TCCAGGACGTGGAACGGATTCTCGACT	KFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPS SSDLNWHNDLIGTALQVKMPKSHKAI QADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPK YITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTW LNPGFPPQSCGYATVTDAAEAVIVQVTP HHVLVDEYTG EWVDSQFINGKCSNYI CPTVHNSTTWHSDYKVKGLCDSNLIS MDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYF AYETGGKACKMQYCKHWGVRLPSGV WFEMADKDLFAARFPECPEGSSISAP SQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWS KIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPAFT IINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVG MISGTTWARELWDDWAPYEDVEIGPN GVLRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSDLH LSSKAQVFEHPHIQDAASQLPDDESLEF GDTGLSKNPIELVEGWFFSSWKSSIASFF FIIGLIIGLFLVLRVGIHLCIKHKHTKKR QIYTDIEMNRLGK (SEQ ID NO: 95)

ACTCGCTGTGCCAGGAGACCTGGTCGA  
 AGATCAGAGCGGGACTGCCCATCTCAC  
 CGGTGGACCTGTCCTACCTGGCGCAA  
 AGAATCCGGGCACTGGACCGGCGTTCA  
 CCATCATCAACGGCACCCCTCAAATACTT  
 CGAGACGCGGTACATCCGGGTGGACAT  
 CGCAGCTCCGATCCTCTCCCGGATGGTG  
 GGAATGATCTCGGGGACTACTTGGGCC  
 CGCGAGCTCTGGGACGACTGGGCACCT  
 TACGAGGATGTCGAGATCGGACCTAAC  
 GGAGTGCTCCGGACCTCCTCCGGGTAC  
 AAGTTCCTCTGTACATGATCGGCCATG  
 GCATGCTGGACTCGGATCTGCATCTGTC  
 GTCCAAAGCACAGGTGTTTGAACACCC  
 ACACATTCAAGACGCCGCCAGCCAGCT  
 GCCGGACGATGAGTCGCTGTTCTTCGG  
 AGACACGGGCTTGTCAAAGAATCCCAT  
 CGAGCTGGTGGAAGGATGGTTTTTCATC  
 CTGGAAAAGCAGCATCGCTTCATTCTTC  
 TTCATCATTGGCCTGATCATCGGCCTAT  
 TTCTAGTCCTGCGGGTGGGAATTCATCT  
 GTGCATCAAGCTCAAGCACACTAAGAA  
 GCGGCAAATCTACACTGATATCGAGAT  
 GAATCGCCTGGGCAAGTAG (SEQ ID NO:  
 94)

**VSV-G с мутацией Trop-055**

**Нуклеотид**

**Аминокислота**

AAGTTCACTATCGTGTTCCTCCGCACGCCG  
 CCAAGGGCAACTGGAAAAACGTGCCTT  
 CAAATTACCATTATTGCCCCAGCAGCTC  
 GGACCTGAACTGGCACAATGACCTCAT  
 TGGAACCGCGCTGCAGGTGAAGATGCC  
 AAAGAGCCACAAGGCTATCCAGGCTGA  
 CGGATGGATGTGCCACGCGTCAAATG  
 GGTGACTACCTGCGATTTCCGCTGGTAC

KFTIVFPHAAKGNWKNVPSNYHYCPS  
 SSDLNWHNDLIGTALQVKMPKSHKAI  
 QADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPK  
 YITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTW  
 LNPGFPPQSCGYATVTDAAEVIVQVTP  
 HHVLVDEYTG EWVDSQFINGKCSNYI  
 CPTVHNSTTWHSYKVKGLCDSALIS  
 MDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYF



GGACCAAATACATCACGCACAGCATC  
AGATCATTACCCCGTCAGTGGAACAA  
TGCAAAGAATCCATCGAACAGACTAAG  
CAGGGAACCTGGCTGAACCCTGGATTT  
CCGCCGCAGTCGTGTGGGTACGCAACC  
GTGACCGATGCAGAGGCCGTGATCGTG  
CAAGTCACGCCGCATCACGTGCTTGTG  
GACGAGTACACCGGAGAATGGGTCGAT  
TCCCAGTTCATCAACGGCAAGTGCTCC  
AACTACATTTGCCCAACCGTGCACAAC  
AGCACTACTTGGCACAGCGACTACAAA  
GTGAAGGGTCTGTGTGATTCCGCCCTG  
ATCTCCATGGATATCACTTTCTTCTCGG  
AAGACGGCGAACTGTCCTCACTGGGCA  
AAGAAGGAACTGGGTTTCGCTCAAATT  
ACTTCGCCTACGAACTGGAGGAAAAG  
CCTGCAAGATGCAGTACTGCAAGCACT  
GGGGCGTGAGACTACCCAGCGGTGTCT  
GGTTCGAGATGGCCGATAAGGACCTGT  
TTGCAGCAGCGAGATTCCCGGAATGCC  
CTGAGGGATCGAGCATCTCCGCTCCAA  
GCCAAACTTCAGTGGACGTGAGCCTGA  
TCCAGGACGTGGAACGGATTCTCGACT  
ACTCGCTGTGCCAGGAGACCTGGTCGA  
AGATCAGAGCGGGACTGCCCATCTCAC  
CGGTGGACCTGTCCTACCTGGCGCCAA  
AGAATCCGGGCACTGGACCGGCGTTCA  
CCATCATCAACGGCACCCCTCAAATACTT  
CGAGACGCGGTACATCCGGGTGGACAT  
CGCAGCTCCGATCCTCTCCCGGATGGTG  
GGAATGATCTCGGGGACTACTACCGAA  
CGCGAGCTCTGGGACGACTGGGCACCT  
TACGAGGATGTCGAGATCGGACCTAAC  
GGAGTGCTCCGGACCTCCTCCGGGTAC  
AAGTCCCTCTGTACATGATCGGCCATG

AYETGGKACKMQYCKHWGVRLPSGV  
WFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAP  
SQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWS  
KIRAGLPISVDLSYLAPKNPGTGPAFT  
IINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVG  
MISGTTTERELWDDWAPYEDVEIGPN  
GVLRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSDLH  
LSSKAQVFEHPHIQDAASQLPDDES LFF  
GDTGLSKNPIELVEGW FSSWKSSIASFF  
FIIGLIIGLFLVLRVGIHL CIK LKHTKKR  
QIYTDIEMNRLGK (SEQ ID NO: 97)

GCATGCTGGACTCGGATCTGCATCTGTC  
 GTCCAAAGCACAGGTGTTTGAACACCC  
 ACACATTCAAGACGCCGCCAGCCAGCT  
 GCCGGACGATGAGTCGCTGTTCTTCGG  
 AGACACGGGCTTGTCAAAGAATCCCAT  
 CGAGCTGGTGGGAAGGATGGTTTTTCATC  
 CTGGAAAAGCAGCATCGCTTCATTCTTC  
 TTCATCATTGGCCTGATCATCGGCCTAT  
 TTCTAGTCCTGCGGGTGGGAATTCATCT  
 GTGCATCAAGCTCAAGCACACTAAGAA  
 GCGGCAAATCTACACTGATATCGAGAT  
 GAATCGCCTGGGCAAGTAG (SEQ ID NO:  
 96)

**VSV-G с мутацией Троп-056**

Нуклеотид	Аминокислота
AAGTTCACSTATCGTGTTTCCGCACAACA CCACACAAAAGGGCAACTGGAAAAAC GTGCCTTCAAATTACCATTATTGCCCCA GCAGCTCGGACCTGAACTGGCACAATG ACCTCATTGGAACCGCGCTGCAGGTGA AGATGCCAAAGAGCCACAAGGCTATCC AGGCTGACGGATGGATGTGCCACGCGT CAAAATGGGTGACTACCTGCGATTTCC GCTGGTACGGACCAAATAACATCACGC ACAGCATCAGATCATTACCCCCGTCAG TGGAACAATGCAAAGAATCCATCGAAC AGACTAAGCAGGGAACCTGGCTGAACC CTGGATTTCCGCCGCAGTCGTGTGGGTA CGCAACCGTGACCGATGCAGAGGCCGT GATCGTGCAAGTCACGCCGCATCACGT GCTTGTGGACGAGTACACCGGAGAATG GGTCGATTCCCAGTTCATCAACGGCAA GTGCTCCAACACTACATTTGCCAACCCTG CACAACAGCACTACTTGGCACAGCGAC TACAAAGTGAAGGGTCTGTGTGATTCC	KFTIVFPHNTTQKGNWKNVPSNYHYC PSSSDLNWHNDLIGTALQVKMPKSHK AIQADGWMCHASKWVTTCDFRWYGP KYITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGT WLNPGFPPQSCGYATVTDAAEAVIVQV TPHHVLVDEYTGEWVDSQFINGKCSN YICPTVHNSTTWHSYKVKGLCDSNLI SMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYF AYETGGKACKMQYCKHWGVRLPSGV WFEMADKDLFAARFPECPEGSSISAP SQTSDVSLIQDVERILDYSLCQETWS KIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPAFT IINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVG MISGTTTERELWDDWAPYEDVEIGPN GVLRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSDLH LSSKAQVFEHPHIQDAASQLPDDESLLF GDTGLSKNPIELVEGWFSWKSSIASFF FIIGLIIGLFLVLRVGIHLCIKHKHTKKR QIYTDIEMNRLGK (SEQ ID NO: 99)

AACCTGATCTCCATGGATATCACTTTCT  
TCTCGGAAGACGGCGAACTGTCCTCAC  
TGGGCAAAGAAGGAACTGGGTTTCGCT  
CAAATTACTTCGCCTACGAACTGGAG  
GAAAAGCCTGCAAGATGCAGTACTGCA  
AGCACTGGGGCGTGAGACTACCCAGCG  
GTGTCTGGTTCGAGATGGCCGATAAGG  
ACCTGTTTGCAGCAGCGAGATTCCCGG  
AATGCCCTGAGGGATCGAGCATCTCCG  
CTCCAAGCCAACTTCAGTGGACGTGA  
GCCTGATCCAGGACGTGGAACGGATTC  
TCGACTACTCGCTGTGCCAGGAGACCT  
GGTCGAAGATCAGAGCGGGACTGCCCA  
TCTCACCGGTGGACCTGTCCTACCTGGC  
GCCAAAGAATCCGGGCACTGGACCGGC  
GTTCAACCATCATCAACGGCACCCCTCAA  
ATACTTCGAGACGCGGTACATCCGGGT  
GGACATCGCAGCTCCGATCCTCTCCCG  
GATGGTGGGAATGATCTCGGGGACTAC  
TACCGAACGCGAGCTCTGGGACGACTG  
GGCACCTTACGAGGATGTCGAGATCGG  
ACCTAACGGAGTGCTCCGGACCTCCTC  
CGGGTACAAGTTCCTCTGTACATGATC  
GGCCATGGCATGCTGGACTCGGATCTG  
CATCTGTCGTCCAAAGCACAGGTGTTTG  
AACACCCACACATTCAAGACGCCGCCA  
GCCAGCTGCCGGACGATGAGTCGCTGT  
TCTTCGGAGACACGGGCTTGTCAAAGA  
ATCCCATCGAGCTGGTGGAAAGGATGGT  
TTTCATCCTGGAAAAGCAGCATCGCTTC  
ATTCTTCTTCATCATTGGCCTGATCATC  
GGCCTATTTCTAGTCCTGCGGGTGGGA  
ATTCATCTGTGCATCAAGCTCAAGCAC  
ACTAAGAAGCGGCAAATCTACACTGAT  
ATCGAGATGAATCGCCTGGGCAAGTAG

(SEQ ID NO: 98)	
VSV-G с мутацией Trop-058	
Нуклеотид	Аминокислота
AAGTTCACATATCGTGTTCCTCCGCACAACC	KFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPS
AAAAGGGCAACTGGAAAAACGTGCCTT	SSDLNWHNDLIGTALQVKMPGGSKSH
CAAATTACCATTATTGCCCCAGCAGCTC	KAIQADGWMCHASKWVTTCDFRWYG
GGACCTGAACTGGCACAATGACCTCAT	PKYITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGT
TGGAACCGCGCTGCAGGTGAAGATGCC	WLNPGFPPQSCGYATVTDAEAVIVQV
AGGCGGCAGCAAGAGCCACAAGGCTAT	TPHHVLVDEYTG EWVDSQFINGKCSN
CCAGGCTGACGGATGGATGTGCCACGC	YICPTVHNSTTWHSYKVKGLCDSNLI
GTCAAAATGGGTGACTACCTGCGATTT	SMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYF
CCGCTGGTACGGACCAAATAACATCAC	AYETGGKACKMQYCKHWGVRLPSGV
GCACAGCATCAGATCATTACCCCGTC	WFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAP
AGTGGAACAATGCAAAGAATCCATCGA	SQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWS
ACAGACTAAGCAGGGAACCTGGCTGAA	KIRAGLPISPVDSLAPKNPGTGPAFT
CCCTGGATTTCCGCCGAGTCGTGTGGG	IINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVG
TACGCAACCGTGACCGATGCAGAGGCC	MISGTTTERELWDDWAPYEDVEIGPN
GTGATCGTGCAAGTCACGCCGCATCAC	GVLRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSDLH
GTGCTTGTGGACGAGTACACCGGAGAA	LSSKAQVFEHPHIQDAASQLPDDESLFF
TGGGTCGATTCCCAGTTCATCAACGGC	GDTGLSKNPIELVEGWFSWKSSIASFF
AAGTGCTCCAACACTACATTTGCCCAACC	FIIGLIIGLFLVLRVGIHLCIKHKHTKKR
GTGCACAACAGCACTACTTGGCACAGC	QIYTDIEMNRLGK (SEQ ID NO: 101)
GACTACAAAGTGAAGGGTCTGTGTGAT	
TCCAACCTGATCTCCATGGATATCACTT	
TCTTCTCGGAAGACGGCGAACTGTCCTC	
ACTGGGCAAAGAAGGAACTGGGTTCG	
CTCAAATTA CTTCGCCTACGAAACTGG	
AGGAAAAGCCTGCAAGATGCAGTACTG	
CAAGCACTGGGGCGTGAGACTACCCAG	
CGGTGTCTGGTTCGAGATGGCCGATAA	
GGACCTGTTTGCAGCAGCGAGATTCCC	
GGAATGCCCTGAGGGATCGAGCATCTC	
CGCTCCAAGCCAAACTTCAGTGGACGT	
GAGCCTGATCCAGGACGTGGAACGGAT	
TCTCGACTACTCGCTGTGCCAGGAGAC	

CTGGTCGAAGATCAGAGCGGGACTGCC  
CATCTCACCGGTGGACCTGTCCTACCTG  
GCGCCAAAGAATCCGGGCACTGGACCG  
GCGTTCACCATCATCAACGGCACCCCTC  
AAATACTTCGAGACGCGGTACATCCGG  
GTGGACATCGCAGCTCCGATCCTCTCCC  
GGATGGTGGGAATGATCTCGGGGACTA  
CTACCGAACGCGAGCTCTGGGACGACT  
GGGCACCTTACGAGGATGTCGAGATCG  
GACCTAACGGAGTGCTCCGGACCTCCT  
CCGGGTACAAGTTCCTCTGTACATGAT  
CGGCCATGGCATGCTGGACTCGGATCT  
GCATCTGTCGTCCAAAGCACAGGTGTTT  
GAACACCCACACATTCAAGACGCCGCC  
AGCCAGCTGCCGGACGATGAGTCGCTG  
TTCTTCGGAGACACGGGCTTGTCAAAG  
AATCCCATCGAGCTGGTGGAAAGGATGG  
TTTTCATCCTGGAAAAGCAGCATCGCTT  
CATTCTTCTTCATCATTGGCCTGATCAT  
CGGCCTATTTCTAGTCCTGCGGGTGGA  
ATTCATCTGTGCATCAAGCTCAAGCAC  
ACTAAGAAGCGGCAAATCTACACTGAT  
ATCGAGATGAATCGCCTGGGCAAGTAG  
(SEQ ID NO: 100)

**VSV-G с мутацией Троп-061**

Нуклеотид	Аминокислота
AAGTTCACCTATCGTGTTTCCGCACGGC	KFTIVFPHGGSNNGGSQKGNWKNVPSNY
GGAAGCAACGGCGGGAGCCAAAAGG	HYCPSSSDLNWHNDLIGTALQVKMPKS
GCAACTGGAAAAACGTGCCTTCAAAT	HKAIQADGWMCHASKWVTTCDFRWYG
TACCATTATTGCCCCAGCAGCTCGGA	PKYITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGT
CCTGAACTGGCACAATGACCTCATTG	WLNPGFPPQSCGYATVTDAEAVIVQVTP
GAACCGCGCTGCAGGTGAAGATGCCA	HHVLVDEYTGWVDSQFINGKCSNYICP
AAGAGCCACAAGGCTATCCAGGCTGA	TVHNSTTWHSYKVKGLCDSNLISMDIT
CGGATGGATGTGCCACGCGTCAAAT	FFSEDEGELSSLGKEGTGFRSNYFAYETG
GGGTGACTACCTGCGATTTCCGCTGG	GKACKMQYCKHWGVRLPSGVWFEMA

TACGGACCAAATACATCACGCACAG  
CATCAGATCATTACCCCGTCAGTGG  
AACAAATGCAAAGAATCCATCGAACAG  
ACTAAGCAGGGAACCTGGCTGAACCC  
TGGATTTCCGCCGCAGTCGTGTGGGT  
ACGCAACCGTGACCGATGCAGAGGCC  
GTGATCGTGCAAGTCACGCCGCATCA  
CGTGCTTGTGGACGAGTACACCGGAG  
AATGGGTTCGATTCCCAGTTCATCAAC  
GGCAAGTGCTCCAACACTACATTTGCC  
AACCGTGCACAACAGCACTACTTGGC  
ACAGCGACTACAAAGTGAAGGGTCTG  
TGTGATTCCAACCTGATCTCCATGGAT  
ATCACTTTCTTCTCGGAAGACGGCGA  
ACTGTCCTCACTGGGCAAAGAAGGAA  
CTGGGTTTCGCTCAAATTACTIONCGCCT  
ACGAAACTGGAGGAAAAGCCTGCAA  
GATGCAGTACTGCAAGCACTGGGGCG  
TGAGACTACCCAGCGGTGTCTGGTTC  
GAGATGGCCGATAAAGGACCTGTTTGC  
AGCAGCGAGATTCCCGGAATGCCCTG  
AGGGATCGAGCATCTCCGCTCCAAGC  
CAAACCTCAGTGGACGTGAGCCTGAT  
CCAGGACGTGGAACGGATTCTCGACT  
ACTCGCTGTGCCAGGAGACCTGGTCG  
AAGATCAGAGCGGGACTGCCCATCTC  
ACCGGTGGACCTGTCCTACCTGGCGC  
CAAAGAATCCGGGCACTGGACCGGCG  
TTCACCATCATCAACGGCACCCCTCAA  
ATACTTCGAGACGCGGTACATCCGGG  
TGGACATCGCAGCTCCGATCCTCTCCC  
GGATGGTGGGAATGATCTCGGGGACT  
ACTACCGAACGCGAGCTCTGGGACGA  
CTGGGCACCTTACGAGGATGTCGAGA  
TCGGACCTAACGGAGTGCTCCGGACC

DKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDV  
SLIQDVERILDYSLCQETWSKIRAGLPISP  
VDLSYLAPKNPGTGPFTIINGTLKYFET  
RYIRVDIAAPILSRMVGMMISGTTTERELW  
DDWAPYEDVEIGPNGVLRSSSGYKFPLY  
MIGHGMLDSDLHLSSKAQVFEHPHIQDA  
ASQLPDDDESLEFFGDTGLSKNPIELVEGWF  
SSWKSSIASFFFIIIGLIIGLFLVLRVGIHLCI  
KLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK (SEQ ID  
NO: 103)

<p>TCCTCCGGGTACAAGTTCCTCTGTAC  ATGATCGGCCATGGCATGCTGGACTC  GGATCTGCATCTGTCTGTCCTCAAAGCAC  AGGTGTTTGAACACCCACACATTCAA  GACGCCGCCAGCCAGCTGCCGGACGA  TGAGTCGCTGTTCTTCGGAGACACGG  GCTTGTCAAAGAATCCCATCGAGCTG  GTGGAAGGATGGTTTTTCATCCTGGAA  AAGCAGCATCGCTTCATTCTTCTTCAT  CATTGGCCTGATCATCGGCCTATTTCT  AGTCCTGCGGGTGGGAATTCATCTGT  GCATCAAGCTCAAGCACACTAAGAAG  CGGCAAATCTACACTGATATCGAGAT  GAATCGCCTGGGCAAGTAG (SEQ ID  NO: 102)</p>	
--	--

В других вариантах осуществления способы получения LVV в соответствии с настоящим изобретением могут применять пятиплазмидную систему. При применении пятиплазмидной системы продуцирования LVV применяется четыре плазмиды из векторной системы третьего поколения (т.е. плазида с трансгеном, плазида с GagPol, плазида с Env и плазида с env VSV-G). Кроме того, пятиплазмидная система, как описано в данном документе, содержит пятую плазмиду, которая кодирует нацеливающий белок («плазида с нацеливающим белком»). Упаковывающие плазмиды с GagPol и Env, включенные в пятиплазмидную систему, могут представлять собой стандартные упаковывающие плазмиды, как описано в *Production of Lentiviral Vectors, Merten et al., Molecular Therapy – Methods & Clinical Development* (2016), 3, 16017. Плазида с трансгеном содержит кассету экспрессии, которая кодирует один или несколько трансгенов CAR в соответствии с настоящим изобретением, а плазида с env VSV-G содержит кассету экспрессии, которая кодирует мутантный VSV-G, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления пятая плазида содержит кассету экспрессии, кодирующую нацеливающий белок CD80. В некоторых вариантах осуществления пятая плазида содержит кассету экспрессии, кодирующую нацеливающий белок CD3. В некоторых вариантах осуществления пятая плазида содержит кассету экспрессии, кодирующую нацеливающий белок CD80 и нацеливающий на CD3 белок. Примеры нацеливающего белка CD80 и нацеливающих на CD3 белков, которые можно применять в пятой плазмиде, представлены в таблицах 1-3.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ получения нацеленного на лимфоциты лентивирусного вектора по любому из предыдущих пунктов, при этом способ включает: трансфицирование клетки-продуцента плазмидой с GagPol, плазмидой с Rev, плазмидой с трансгеном, плазмидой с env VSV-G и плазмидой с нацеливающим на лимфоциты белком; плазида с GagPol содержит один или несколько полинуклеотидов, кодирующих лентивирусный ген gag и лентивирусный ген pol, и способна экспрессировать лентивирусный белок gag и лентивирусный белок pol в клетке-продуценте; плазида с Rev содержит полинуклеотид, кодирующий ген лентивирусного rev, и способна экспрессировать лентивирусный белок rev в клетке-продуценте; плазида с трансгеном содержит кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, кодирующий CAR; и плазида с env VSV-G содержит полинуклеотид, кодирующий мутантный оболочечный белок VSV-G, как описано в данном документе, и способна экспрессировать мутантный оболочечный белок VSV-G в клетке-продуценте; и плазида с нацеливающим на лимфоциты белком содержит полинуклеотид, кодирующий нацеливающий на лимфоциты белок, как описано в данном документе, и способна экспрессировать нацеливающий на лимфоциты белок в клетке-продуценте; культивирование клетки-продуцента в культуральной среде; и сбор лентивирусного вектора из культуральной среды.

В некоторых вариантах осуществления клетки-продуценты трансфицируют плазмидой с трансгеном, плазмидой с GagPol, плазмидой с env VSV-G, плазмидой с Rev и нацеливающей на лимфоциты плазмидой в определенном соотношении. Нацеливающая на лимфоциты плазида может иметь соотношение от приблизительно 0,25 до приблизительно 5 по отношению к плазмиде с env VSV-G (по массе). Например, используя определенные соотношения для четырех упаковывающих плазмидных систем (плазида с трансгеном, плазида с GagPol, плазида с env VSV-G, плазида с Rev), описанных в данном документе, соотношение плазмиды с нацеливающим на лимфоциты белком можно регулировать по отношению к плазмиде с env VSV-G. Например, нацеливающая на лимфоциты плазида может иметь соотношение приблизительно 0,25:1, 0,5:1, 1:1, 1,25:1, 1,5:1, 1,75:1, 2:1, 2,25:1, 2,5:1, 2,75:1, 3:1, 3,25:1, 3,5:1, 3,75:1, 4:1, 4,25:1, 4,5:1, 4,75:1 или 5:1 по отношению к плазмиде с env VSV-G.

В вариантах осуществления способов получения LVV, в которых используется комбинация пяти плазмид, пятая плазида представляет собой плазмиду с нацеливающим белком и включает кассету экспрессии, которая кодирует один или несколько нацеливающих белков. Например, плазида с нацеливающим белком может содержать кассету экспрессии, которая содержит полинуклеотид, который кодирует нацеливающий белок CD80, нацеливающий на CD3 белок или как нацеливающий белок CD80, так и



нацеливающий на CD3 белок. В определенных вариантах осуществления кассета экспрессии векторной плазмиды с нацеливающим белком содержит полинуклеотид в соответствии с SEQ ID NO: 1, который кодирует нацеливающий белок CD80 в соответствии с SEQ ID NO: 2. В других вариантах осуществления плазида с нацеливающим белком содержит кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид в соответствии с SEQ ID NO: 9, который кодирует нацеливающий на CD3 белок в соответствии с SEQ ID NO: 10. В других вариантах осуществления плазида с нацеливающим белком содержит кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид в соответствии с SEQ ID NO: 116, который кодирует нацеливающий на CD3 белок в соответствии с SEQ ID NO: 117. В других вариантах осуществления плазида с нацеливающим белком содержит кассету тандемной экспрессии, которая содержит полинуклеотид в соответствии с SEQ ID NO: 21, который кодирует полипептид в соответствии с SEQ ID NO: 22. Примеры мутантных последовательностей VSV-G, которые можно применять в пятиплазмидной лентивирусной векторной системе 3-го поколения по настоящему изобретению представлены в таблице 10.

В четырехплазмидной упаковывающей системе концентрация нацеливающего на лимфоциты белка на поверхности трансдуцированных клеток может быть ассоциирована с концентрацией плазмиды, содержащей нацеливающий на лимфоциты белок. Например, если плазида с нацеливающим на лимфоциты белком содержится в плазмиде с env VSV-G, концентрация нацеливающего на лимфоциты белка на поверхности трансдуцированных клеток может быть ассоциирована с концентрацией плазмиды с env VSV-G. В другом примере, если плазида с нацеливающим на лимфоциты белком содержится в плазмиде с GagPol, концентрация нацеливающего на лимфоциты белка на поверхности трансдуцированных клеток может быть ассоциирована с концентрацией плазмиды с GagPol. В другом примере, если плазида с нацеливающим на лимфоциты белком содержится в плазмиде с Rev, концентрация нацеливающего на лимфоциты белка на поверхности трансдуцированных клеток может быть ассоциирована с концентрацией плазмиды с Rev. В пятиплазмидной упаковывающей системе концентрация нацеливающего на лимфоциты белка на поверхности трансдуцированных клеток может быть ассоциирована с концентрацией плазмиды, содержащей нацеливающий на лимфоциты белок.

В четырехплазмидной упаковывающей системе эффективность трансдукции может быть ассоциирована с концентрацией плазмиды, содержащей нацеливающий белок. Например, если плазида с нацеливающим на лимфоциты белком содержится в плазмиде с env VSV-G, эффективность трансдукции может быть ассоциирована с концентрацией плазмиды с env VSV-G. В другом примере, если плазида с нацеливающим на лимфоциты

белком содержится в плазмиде с GagPol, эффективность трансдукции может быть ассоциирована с концентрацией плазмиды с GagPol. В другом примере, если плазида с нацеливающим на лимфоциты белком содержится в плазмиде с Rev, эффективность трансдукции может быть ассоциирована с концентрацией плазмиды с Rev. В  
5 пятиплазмидной упаковывающей системе эффективность трансдукции может быть ассоциирована с концентрацией плазмиды с нацеливающим на лимфоциты белком.

После трансфекции клеток-продуцентов продукт лентивирусных частиц можно собирать из клеточного супернатанта или культуральной среды. В данной области техники известны последующие процессы в отношении LVV, позволяющие максимизировать  
10 извлечение LVV при минимизации компонентов, которые могут отрицательно влиять на эффективность или безопасность. Типичный процесс включает последовательные стадии очистки, включающие удаление клеток и их остатков с последующим обогащением LVV и удалением белков клетки-хозяина или сывороточных белков, нуклеиновых кислот и липидов. Продукт LVV можно дополнительно концентрировать перед заменой в  
15 подходящем буфере для обеспечения стабильности и затем, наконец, подвергать стерильной фильтрации перед хранением или применением. Первоначально может быть выполнена стадия осветления собранных супернатантов LVV для удаления крупных примесей, таких как агрегаты и клеточные остатки. В некоторых вариантах осуществления стадия осветления включает центрифугирование и/или традиционную проточную  
20 фильтрацию. В некоторых вариантах осуществления стадия осветления включает стадию переваривания нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления продукт LVV подвергается дополнительным стадиям очистки, включая, например, ионообменную хроматографию (например, анионообменную хроматографию). LVV также можно концентрировать, например, с помощью тангенциальной проточной фильтрации или  
25 ультрафильтрации/диафильтрации. В некоторых вариантах осуществления сбор LVV из культуральной среды включает центрифугирование. В некоторых вариантах осуществления сбор LVV из культуральной среды включает анионообменную хроматографию. В некоторых вариантах осуществления сбор LVV из культуральной среды включает анионообменную хроматографию и тангенциальную проточную фильтрацию.

В некоторых вариантах осуществления лентивирусные векторы, описанные в  
30 данном документе, которые содержат мутантный env VSV-G и один или несколько нацеливающих на лимфоциты белков, способны продуцировать продукт LVV с высоким титром по сравнению со стандартным LVV, включающим другой слитый белок env (например, env Кокал, env парамиксовируса, усеченный env VSV-G). В данном документе  
35 титр вируса относится к титру инфекционных вирусных частиц, измеряемому в

трансдуцирующих единицах (TU) на мл. В некоторых вариантах осуществления титр LVV, описанный в данном документе, составляет по меньшей мере  $1e7$  TU/мл, по меньшей мере  $1e8$  TU/мл, по меньшей мере  $1e9$  TU/мл, по меньшей мере  $1e10$  TU/мл, по меньшей мере  $1e11$  TU/мл или по меньшей мере  $1e12$  TU/мл при измерении в концентрированном продукте LVV. В некоторых вариантах осуществления титр LVV, описанный в данном документе, составляет от приблизительно  $1e7$  TU/мл до приблизительно  $1e12$  TU/мл в концентрированном продукте LVV.

### Сконструированные лимфоциты

LVV, описанный в данном документе, можно применять для модификации целевых лимфоцитов (например, Т-клеток, В-клеток или NK-клеток) для экспрессии CAR, кодируемого трансгеном, переносимым LVV. В определенных вариантах осуществления сконструированные лимфоциты трансдуцировали LVV в соответствии с настоящим изобретением с помощью приведения лимфоцитов в контакт с LVV по настоящему изобретению. В таких вариантах осуществления сконструированные лимфоциты (например, Т-клетки, В-клетки или NK-клетки) экспрессируют CAR, кодируемый трансгеном, переносимым LVV. Эти лимфоциты также обозначаются в данном документе «CAR-модифицированными лимфоцитами». В конкретных вариантах осуществления сконструированные Т-клетки обозначаются в данном документе «CAR-модифицированными Т-клетками». В других конкретных вариантах осуществления сконструированные NK-клетки обозначаются в данном документе «CAR-модифицированными NK-клетками». В конкретных вариантах осуществления сконструированные Т-клетки обозначаются в данном документе «CAR-модифицированными В-клетками». В конкретных вариантах осуществления CAR-модифицированная Т-клетка экспрессирует CAR, кодируемый трансгеном, переносимым LVV, описанным в данном документе, и выбрана из интактных Т-клеток (CD45RA+, CCR7+, CD62L+, CD27+, CD45RO-), Т-клеток центральной памяти (CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CCR7+, CD27+), эффекторных Т-клеток памяти (CD45RA-, CD45RO+, CCR7-, CD62L-, CD27-),  $\gamma\delta$  Т-клеток, инвариантных Т-клеток, ассоциированных со слизистой оболочкой (MAIT), Treg, естественных Т-клеток-киллеров и тканерезидентных Т-клеток.

Трансдукцию целевых лимфоцитов (например, Т-клеток, В-клеток или NK-клеток) с помощью LVV, описанного в данном документе, можно осуществлять *ex vivo* или *in vivo*.

В определенных вариантах осуществления лимфоциты (например, Т-клетки, В-клетки или NK-клетки) могут представлять собой первичные клетки или клеточные линии, полученные от человека, мыши, крысы или других млекопитающих. Если лимфоцит получен от млекопитающего, его можно получить из многочисленных источников, включая

кровь, костный мозг, лимфатический узел, тимус или другие ткани или жидкости. Композиция лимфоцитов (например, композиция Т-клеток, композиция В-клеток или композиция НК-клеток) может быть обогащенной или очищенной. Линии Т-клеток хорошо известны в данной области техники, некоторые из них описаны в Sandberg *et al.*, *Leukemia* 21:230, 2000. В определенных вариантах осуществления в Т-клетках отсутствует эндогенная экспрессия гена TCR $\alpha$ , гена TCR $\beta$  или того и другого. Такие Т-клетки могут естественным образом не иметь эндогенной экспрессии цепей TCR $\alpha$  и  $\beta$  или могут быть модифицированы для блокирования экспрессии (например, Т-клетки трансгенной мыши, которые не экспрессируют  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи TCR, или клетки, которыми манипулировали с целью ингибирования экспрессии  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи TCR) или для нокаута цепи TCR $\alpha$ , цепи TCR $\beta$  или обоих генов.

В некоторых вариантах осуществления перед генетической модификацией лимфоцитов (например, Т-клеток, В-клеток или НК-клеток) полинуклеотидом, кодирующим молекулу CAR, источник лимфоцитов (например, Т-клеток или НК-клеток) может быть получен от субъекта (например, цельная кровь, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), костный мозг, ткань лимфатического узла, пуповинная кровь, ткань тимуса, ткань из места инфекции, асцит, плевральный выпот, ткань селезенки). Лимфоциты, Т-клетки, В-клетки или НК-клетки могут быть обогащены или выделены из образца, взятого от субъекта, с использованием способов, известных в данной области техники. Например, Т-клетки могут быть обогащены в образце цельной крови, взятом от субъекта, с использованием известных способов гипотонического лизиса эритроцитов, или Т-клетки могут быть выделены из образца, взятого от субъекта, с использованием известного градиентного седиментирования, например, методик восстановления с помощью Ficoll®. В качестве альтернативы Т-клетки можно выделить из цельной крови с помощью гранул, меченных магнитными антителами, с последующим разделением на колонке. Конкретные субпопуляции клеток-хозяев можно собирать в соответствии с известными методиками и обогащать или истощать с помощью известных методик, таких как аффинное связывание с антителами, проточная цитометрия и/или иммуномагнитный отбор. В некоторых вариантах осуществления после стадий обогащения и/или истощения Т-клетки приводят в контакт с LVV, как описано, так что Т-клетки, полученные от субъекта, трансдуцируются LVV и экспрессируют CAR, кодируемый трансгеном, переносимым LVV. В некоторых вариантах осуществления после стадий обогащения и/или истощения НК-клетки приводят в контакт с LVV, как описано, так что НК-клетки, полученные от субъекта, трансдуцируются LVV и экспрессируют CAR, кодируемый трансгеном, переносимым LVV. В некоторых вариантах осуществления после стадий обогащения и/или истощения В-

клетки приводят в контакт с LVV, как описано, так что В-клетки, полученные от субъекта, трансдуцируются LVV и экспрессируют CAR, кодируемый трансгеном, переносимым LVV.

Как правило, покоящиеся Т-клетки, такие как покоящиеся CD4 и CD8 лимфоциты, покоящиеся В-клетки и покоящиеся НК-клетки, невосприимчивы к генетической трансдукции лентивирусными векторами. Покоящиеся Т-клетки, также известные как покоящиеся Т-клетки или интактные Т-клетки, относятся к Т-клеткам, которые не являются митотически активными или не подверглись воздействию когнатного антигена, презентированного на антигенпрезентирующей клетке, такой как макрофаг или дендритная клетка. Примером маркера покоящихся Т-клеток является CD28. В качестве альтернативы маркеры, которые экспрессируются на активированных Т-клетках, но не на покоящихся Т-клетках, включают, например, 4-1BB, PD-1 и HLA-DR. Аналогичным образом, покоящиеся В-клетки и покоящиеся НК-клетки относятся к В-клеткам и НК-клеткам, которые не являются митотически активными или не подвергались воздействию когнатного антигена соответственно. Примеры маркеров покоящихся В-клеток включают CD21 и CD23, а также отсутствие CD80, CD86, CD95 или CD25. CD137 и GITR, которые экспрессируются на активированных НК-клетках, отсутствуют на покоящихся НК-клетках. В результате для облегчения трансдукции Т-клеток, В-клеток или НК-клеток с использованием лентивирусного вектора, Т-клетки, В-клетки или НК-клетки обычно активируются *in vitro* с использованием стимуляционных реагентов, до того, как может происходить генетическая модификация с помощью лентивирусного вектора. После стимуляции и трансдукции генетически модифицированные клетки обычно размножают *in vitro* и впоследствии повторно вводят пациенту. Однако LVV, описанные в данном документе, способны трансдуцировать покоящиеся Т-клетки, В-клетки и/или покоящиеся НК-клетки. В определенных вариантах осуществления способы трансдукции Т-клеток LVV в соответствии с настоящим описанием включают приведение LVV в контакт с популяцией Т-клеток, при этом Т-клетки не активируются и Т-клетки не подвергаются воздействию экзогенного стимулирующего средства в процессе трансдукции. В некоторых таких вариантах осуществления способы трансдукции Т-клеток, где Т-клетки не активируются и Т-клетки не подвергаются воздействию экзогенного стимулирующего средства во время процесса трансдукции, включают трансдукцию Т-клеток с помощью LVV, содержащего нацеливающий белок CD80, нацеливающий на CD3 белок или как нацеливающий белок CD80, так и нацеливающий на CD3 белок. Примеры экзогенных стимулирующих Т-клетки средств включают антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент (т.е. антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, который не является частью LVV), антитело к CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент (т.е. антитело к CD28 или его

антигенсвязывающий фрагмент, который не является частью LVV), антитело к CD2 или его антигенсвязывающий фрагмент, IL-2, IL-7, IL-15, РНА или любую их комбинацию. Экзогенные стимулирующие средства можно приводить в контакт с Т-клеткой в растворимой форме или иммобилизовать на твердом субстрате, таком как гранулы или планшеты для клеточной культуры. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело к CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент, или антитело к CD3 и антитело к CD28 или их антигенсвязывающие фрагменты приводят в контакт с Т-клетками в растворимой форме или иммобилизуют на твердой подложке. Примеры антител к CD3 включают ОКТ3, УСТН1 и BW264/56. Примером антитела к CD2 является LT2. Примером антитела к CD28 является 15E8. В определенных вариантах осуществления способы трансдуцирования НК-клеток LVV в соответствии с настоящим описанием включают приведение LVV в контакт с популяцией НК-клеток, где НК-клетки не активируют и НК-клетки не подвергают воздействию экзогенного стимулирующего средства в процессе трансдукции. Примеры средств экзогенных стимулирующих НК-клетки средств включают антитело к CD2 или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело к CD335 или его антигенсвязывающий фрагмент, IL-2, IL-15, IL-12, IL-18, IL-21 или любую другую их комбинацию. В определенных вариантах осуществления способы трансдуцирования В-клеток LVV в соответствии с настоящим описанием включают приведение LVV в контакт с популяцией В-клеток, где В-клетки не активируют и В-клетки не подвергают воздействию экзогенного стимулирующего средства в процессе трансдукции. Примеры экзогенных стимулирующих В-клетки средств включают CD154 и смешанный F(ab)<sub>2</sub> Ig.

В некоторых вариантах осуществления лентивирусный вектор, содержащий нацеливающий белок CD80 и нацеливающий на CD3 белок, способен эффективно трансдуцировать CD4 и CD8 Т-клетки по сравнению со стандартным LVV.

В некоторых вариантах осуществления лентивирусный вектор, содержащий нацеливающий белок CD80 и нацеливающий на CD3 белок, способен активировать Т-клетки без экзогенной стимуляции (например, стимулирующего Т-клетки средства) до уровня, сопоставимого с Т-клетками, трансдуцированными стандартным LVV, которые обрабатывают экзогенной стимуляцией. Примеры экзогенных стимулирующих Т-клетки средств включают антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент (т.е. антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, который не является частью LVV), антитело к CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент (т.е. антитело к CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент, который не является частью LVV), антитело к CD2 или его антигенсвязывающий фрагмент, IL-2, IL-7, IL-15, РНА или любую их комбинацию.

В определенных вариантах осуществления способы трансдуцирования Т-клеток LVV в соответствии с настоящим описанием демонстрируют усиленную трансдукцию CD4 Т-клеток по сравнению со стандартным LVV. В некоторых таких вариантах осуществления способы усиления трансдукции CD4 Т-клеток в смешанной популяции Т-клеток (например, 5 состоящей из CD4 и CD8 Т-клеток) включают трансдуцирование смешанной популяции Т-клеток LVV в соответствии с настоящим описанием, содержащим нацеливающий белок CD80.

В определенных вариантах осуществления способы трансдуцирования Т-клеток LVV в соответствии с настоящим описанием эффективно трансдуцируют как CD4, так и 10 CD8 Т-клетки. В некоторых таких вариантах осуществления способы трансдуцирования Т-клеток, где эффективно трансдуцируются как CD4, так и CD8 Т-клетки, включают трансдуцирование Т-клеток с помощью LVV, содержащего нацеливающий белок CD80 и нацеливающий на CD3 белок.

В определенных вариантах осуществления LVV в соответствии с настоящим 15 описанием способен трансдуцировать Т-клетки в «стрессовых» условиях, например, при низкой множественности инфекции (MOI) или без обработки экзогенным IL-2 во время трансдукции. В некоторых вариантах осуществления LVV содержит нацеливающий белок CD80 и нацеливающий на CD3 белок. В некоторых вариантах осуществления LVV в соответствии с настоящим описанием способен трансдуцировать Т-клетки при 20 концентрации LVV от приблизительно 5 до приблизительно 25X ниже, чем ненацеливающий на лимфоциты LVV.

Экспрессию молекулы CAR на клетках-хозяевах можно оценить с помощью 25 способов, известных в данной области техники, таких как количественная ПЦР или проточная цитометрия после окрашивания флуоресцентно меченным антигеном для CAR-связывающего домена.

Экспрессия молекулы CAR на клетках-хозяевах может быть функционально охарактеризована в соответствии с любой из большого количества принятых в данной области техники методик анализа активности Т-клеток хозяина, включая определение связывания, активации или индукции Т-клеток, а также определение ответов Т-клеток, 30 которые являются антигенспецифическими. Примеры включают определение пролиферации Т-клеток, высвобождения цитокинов Т-клетками, антигенспецифической стимуляции Т-клеток, активности CTL (например, путем обнаружения высвобождения <sup>51</sup>Cr или европия из предварительно загруженных целевых клеток, индукции активности каспаз в целевых клетках, внеклеточного высвобождения лактатдегидрогеназы целевыми 35 клетками), изменения в экспрессии Т-клеточного фенотипического маркера и другие

показатели Т-клеточных функций. Анализ активности НК-клеток-хозяев также можно проводить с использованием аналогичных методик. Процедуры проведения этих и подобных анализов можно найти, например, в Lefkovits (*Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques*, 1998). См. также *Current Protocols in Immunology*; Weir, *Handbook of Experimental Immunology*, Blackwell Scientific, Boston, MA (1986); Mishell and Shigii (eds.) *Selected Methods in Cellular Immunology*, Freeman Publishing, San Francisco, CA (1979); Green and Reed, *Science* 281:1309 (1998) и ссылки, цитируемые в данном документе. Уровни цитокинов можно определять с помощью способов, известных в данной области техники, включая, например, ELISA, ELISPOT, окрашивание 5 внутриклеточных цитокинов, проточную цитометрию и их любую комбинацию (например, внутриклеточное окрашивание цитокинов и проточная цитометрия). Пролиферацию иммунных клеток и размножение клонов, возникающее в результате антигенспецифического выявления или стимуляции иммунного ответа, можно определить путем выделения лимфоцитов, таких как циркулирующие лимфоциты, в образцах клеток периферической крови или клеток лимфатических узлов, стимуляции клеток антигеном и измерения продуцирования цитокинов, пролиферации клеток и/или жизнеспособности 10 клеток, например, путем включения тритированного тимидина, или нерадиоактивных анализов, таких как анализы МТТ и т.п.

#### Способы и композиции для лечения

В одном аспекте в настоящем изобретении представлены способы лечения 20 заболевания у субъекта, включающие введение субъекту эффективного количества LVV, как описано в данном документе, CAR-модифицированного лимфоцита (например, Т-клетки, В-клетки или НК-клетки), как описано в данном документе, или их фармацевтических композиций. В другом аспекте способы лечения заболевания у субъекта в соответствии с настоящим описанием включают введение субъекту эффективного 25 количества LVV, как описано в данном документе, CAR-модифицированного лимфоцита (например, Т-клетки, В-клетки или НК-клетки), как описано в данном документе, или их фармацевтических композиций в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами.

30 Заболевания, которые можно лечить с помощью LVV или CAR-модифицированных лимфоцитов (например, Т-клеток, В-клеток или НК-клеток) в соответствии с настоящим описанием, включают различные виды рака. Адоптивная иммунная и генная терапия являются перспективными видами лечения различных типов рака (Morgan *et al.*, *Science* 314:126, 2006; Schmitt *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 20:1240, 2009; June, *J. Clin. Invest.* 117:1466, 35 2007) и инфекционных заболеваний (Kitchen *et al.*, *PLoS One* 4:38208, 2009; Rossi *et al.*, *Nat.*



*Biotechnol.* 25:1444, 2007; Zhang *et al.*, *PLoS Pathog.* 6:e1001018, 2010; Luo *et al.*, *J. Mol. Med.* 89:903, 2011).

Широкий спектр различных видов рака, включая солидные опухоли и лейкозы, поддается лечению композициями и способами, раскрытыми в данном документе.

5 Иллюстративные различные виды рака, которые можно лечить с использованием рецепторов, модифицированных клеток-хозяев и композиции, описанных в данном документе, включают аденокарциному молочной железы, предстательной железы и толстой кишки; все формы бронхогенного рака легкого; миелоидный лейкоз; меланому; гепатому; нейробластому; папиллому; апудому; хористому; бранхиому; злокачественный карциноидный синдром; карциноидную болезнь сердца; и карциному (например, Уокера, базальноклеточную, базальную плоскоклеточную, Брауна-Пирса, протоковую, опухоль Эрлиха, Кребса 2, из клеток Меркеля, муцинозную, немелкоклеточную, овсяноклеточную, папиллярную, скirrosную, бронхиоллярную, бронхогенную, плоскоклеточную и переходно-клеточную). Дополнительные типы различных видов рака, которые можно

15 лечить с использованием рецепторов, модифицированных клеток-хозяев и композиции, описанных в данном документе, включают гистиоцитарные нарушения; злокачественный гистиоцитоз; лейкоз; болезнь Ходжкина; иммунопролиферативную болезнь тонкого кишечника; неходжкинскую лимфому; плазмоцитому; множественную миелому; хронический миелоидный лейкоз (CML); острый миелолейкоз (AML); плазмоцитому;

20 ретикулоэндотелиоз; меланому; хондробластому; хондрому; хондросаркому; фиброму; фибросаркому; гигантоклеточные опухоли; гистиоцитому; липому; липосаркому; мезотелиому; миксому; миксосаркому; остеому; остеосаркому; хордому; краниофарингиому; дисгерминому; гамартому; мезенхимому; мезонефрому; миосаркому; амелобластому; цементому; одонтому; тератому; тимому; трофобластическую опухоль.

25 Кроме того, следующие типы различных видов рака также рассматриваются как поддающиеся лечению с использованием рецепторов, модифицированных клеток-хозяев и композиции, описанных в данном документе: аденома; холангиома; холестеатома; циклиндрома; цистаденокарцинома; цистаденома; гранулезоклеточная опухоль; гинандробластома; гепатома; гидраденома; опухоль островковых клеток; опухоль из клеток

30 Лейдига; папиллома; опухоль из клеток Сертоли; текаклеточная опухоль; леймиома; лейомиосаркома; миобластома; миома; миосаркома; рабдомиома; рабдомиосаркома; эпендимома; ганглионеврома; глиома; медуллобластома; менингиома; нейролеммома; нейробластома; нейроэпителиома; нейрофиброма; неврома; параганглиома; нехромаффинная параганглиома. Типы различных видов рака, которые можно лечить,

35 также включают ангиокератому; ангиолимфоидную гиперплазию с эозинофилией;

склерозирующую ангиому; ангиоматоз; гломангиому; гемангиоэндотелиому; гемангиому; гемангиоперицитому; гемангиосаркому; лимфангиому; лимфангиомиому; лимфангиосаркому; пинелому; карциносаркому; хондросаркому; филлоидную цистосаркому; фибросаркому; гемангиосаркому; лейомиосаркому; лейкосаркому; липосаркому; лимфангиосаркому; миосаркому; миксосаркому; карциному яичников; рабдомиосаркому; саркому; новообразования; нерофиброматоз; дисплазию шейки матки и рак брюшины.

Примеры гиперпролиферативных нарушений, поддающихся терапии с использованием рецепторов, модифицированных клеток-хозяев и композиции, описанных в данном документе, включают В-клеточные виды рака (В-клеточные злокачественные новообразования), включая В-клеточные лимфомы (такие как различные формы болезни Ходжкина, неходжкинская лимфома (NHL) или лимфомы центральной нервной системы), лейкозы (такие как острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), волосатоклеточный лейкоз, В-бластная трансформация хронического миелолейкоза, острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелолейкоз и миеломы (например, множественная миелома). Дополнительные В-клеточные виды рака, которые можно лечить с использованием рецепторов, модифицированных клеток-хозяев и композиции, описанных в данном документе, включают малую лимфоцитарную лимфому, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазмоцитарную лимфому, лимфому маргинальной зоны селезенки, плазмоклеточную миелому, солитарную плазмоцитому кости, внекостную плазмоцитому, В-клеточную лимфому внеузловой маргинальной зоны лимфоидной ткани, ассоциированную со слизистой оболочкой (MALT), В-клеточную лимфому узловой маргинальной зоны, фолликулярную лимфому, мантийно-клеточную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, медиастинальную (тимическую) крупноклеточную В-клеточную лимфому, внутрисосудистую крупноклеточную В-клеточную лимфому, первичную выпотную лимфому, лимфому/лейкоз Беркитта, пролиферацию В-клеток с неопределенным злокачественным потенциалом, лимфоматоидный гранулематоз и посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание.

CAR-модифицированные лимфоциты, включенные в композиции, раскрытые в данном документе и вводимые субъекту, могут включать CAR-модифицированные Т-клетки, например, CD4<sup>+</sup> Т-клетки, CD8<sup>+</sup> Т-клетки, естественные Т-клетки-киллеры, гамма-дельта Т-клетки или клетки MAIT; CAR-модифицированные В-клетки или CAR-модифицированные NK-клетки. В определенных вариантах осуществления способы лечения субъекта включают введение эффективного количества LVV, как описано в данном

документе, или CAR-модифицированных лимфоцитов (т.е. рекомбинантных клеток, которые экспрессируют один или несколько CAR) в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят модифицированные CAR Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят CAR-модифицированные NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят CAR-модифицированные В-клетки. CAR-модифицированные лимфоциты (например, Т-клетки, В-клетки или NK-клетки) могут быть ксеногенными, сингенными, аллогенными или аутологичными для субъекта.

Фармацевтические композиции, содержащие сконструированные лимфоциты LVV или CAR, можно вводить способом, соответствующим заболеванию или состоянию, подлежащему лечению (или предупреждению), как это определено специалистами в области медицины. Соответствующая доза, подходящая продолжительность и частота введения композиций будут определяться такими факторами, как состояние пациента, размер, вес, площадь поверхности тела, возраст, пол, тип и тяжесть заболевания, конкретная терапия, которую предстоит назначить, конкретная форма активного ингредиента, время и способ введения, а также одновременное применение других лекарственных средств. Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим LVV или CAR-модифицированные лимфоциты и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество. Подходящие вспомогательные наполнители включают воду, солевой раствор, декстрозу, глицерин или тому подобное и их комбинации. Другой подходящей средой для инфузии может быть любой состав изотонической среды, включая солевой раствор, Normosol R (Abbott), Plasma-Lyte A (Baxter), 5% раствор декстрозы в воде или лактат Рингера.

Эффективное для лечения количество сконструированных лимфоцитов (например, Т-клеток, В-клеток или NK-клеток) в фармацевтической композиции составляет по меньшей мере одну клетку (например, одну CAR-модифицированную Т-клетку) и чаще превышает  $10^2$  клеток, например, до  $10^6$ , до  $10^7$ , до  $10^8$  клеток, до  $10^9$  клеток, до  $10^{10}$  клеток или до  $10^{11}$  клеток или больше. В определенных вариантах осуществления клетки вводят в диапазоне от приблизительно  $10^6$  до приблизительно  $10^{10}$  клеток/ $m^2$ , предпочтительно в диапазоне от приблизительно  $10^7$  до приблизительно  $10^9$  клеток/ $m^2$ . Количество клеток будет зависеть от конечного применения, для которого предназначена композиция, а также от типа включенных в нее клеток. Например, композиция, содержащая Т-клетки, модифицированные для содержания CAR, будет содержать Т-клеточную популяцию, содержащую от приблизительно 5% до приблизительно 95% или больше таких клеток. В определенных вариантах осуществления композиция, содержащая CAR-

модифицированные Т-клетки, содержит популяцию клеток, содержащую по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или больше таких клеток. В определенных вариантах осуществления композиция, содержащая CAR-модифицированные НК-клетки, содержит популяцию 5 клеток, содержащую по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или больше таких клеток. В определенных вариантах осуществления композиция, содержащая CAR-модифицированные В-клетки, содержит популяцию клеток, содержащую по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или больше таких 10 клеток. Для вариантов применения, представленных в данном документе, лимфоциты (например, Т-клетки, В-клетки или НК-клетки) обычно находятся во объеме литр или меньше, 500 мл или меньше, 250 мл или меньше или 100 мл или меньше. Следовательно, плотность требуемых клеток обычно превышает  $10^4$  клеток/мл и обычно превышает  $10^7$  клеток/мл, обычно  $10^8$  клеток/мл или выше. Лимфоциты (например, Т-клетки, В-клетки 15 или НК-клетки) можно вводить в виде однократной инфузии или в виде многократных инфузий в течение определенного периода времени. Повторные инфузии CAR-модифицированных лимфоцитов (например, Т-клеток, В-клеток или НК-клеток) могут быть разделены днями, неделями, месяцами или даже годами, если присутствуют рецидивы заболевания или активность заболевания. Клинически значимое количество иммунных 20 клеток можно распределить на несколько инфузий, которые в совокупности равны или превышают  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  или  $10^{11}$  клеток. Предпочтительная доза для введения клетки-хозяина, содержащей рекомбинантный вектор экспрессии, как описано в данном документе, составляет приблизительно  $10^7$  клеток/ $m^2$ , приблизительно  $5 \times 10^7$  клеток/ $m^2$ , приблизительно  $10^8$  клеток/ $m^2$ , приблизительно  $5 \times 10^8$  клеток/ $m^2$ , приблизительно  $10^9$  25 клеток/ $m^2$ , приблизительно  $5 \times 10^9$  клеток/ $m^2$ , приблизительно  $10^{10}$  клеток/ $m^2$ , приблизительно  $5 \times 10^{10}$  клеток/ $m^2$  или приблизительно  $10^{11}$  клеток/ $m^2$ .

Композиции LVV и/или CAR-модифицированных лимфоцитов (например, Т-клеток, В-клеток или НК-клеток), как описано в данном документе, можно вводить субъекту внутривенно, внутривентриально, внутриопухолево, в костный мозг (например, 30 внутрикостное введение), в лимфатический узел (интранодально) и/или в спинномозговую жидкость.

Векторы LVV и/или композиции CAR-модифицированных лимфоцитов (например, Т-клеток, В-клеток или НК-клеток) можно вводить субъекту в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами. Примеры терапевтических 35 средств, которые можно вводить в комбинации с векторами LVV или CAR-

модифицированными лимфоцитами (например, Т-клетками, В-клетками или НК-клетками) в соответствии с настоящим описанием, включают лучевую терапию, средство для адоптивной клеточной иммунотерапии (например, рекомбинантный TCR, TCR с повышенной аффинностью, CAR, TCR-CAR, слитый белок scTCR, дендритно-клеточная вакцина), терапию антителами, терапию ингибиторами молекул иммунных контрольных точек, терапию ультрафиолетовым светом, электроимпульсную терапию, высокоинтенсивную сфокусированную ультразвуковую терапию, терапию онколитическим вирусом или фармацевтическую терапию, такую как химиотерапевтическое средство, терапевтический пептид, гормон, аптамер, антибиотик, противовирусное средство, противогрибковое средство, противовоспалительное средство, низкомолекулярную терапию или любую их комбинацию.

Лучевая терапия включает дистанционную лучевую терапию (например, традиционную дистанционную лучевую терапию, стереотаксическое облучение, 3-мерную конформную лучевую терапию, лучевую терапию с модулированной интенсивностью, лучевую терапию с объемной модулированной дугой, терапию частицами, протонную терапию и шнековую терапию), брахитерапию, системную радиоизотопную терапию, интраоперационную лучевую терапию или любую их комбинацию.

Иллюстративные антитела, которые можно применять в сочетании с композициями LVV или CAR-модифицированных лимфоцитов (например, Т-клеток, В-клеток или НК-клеток), описанных в данном документе, включают ритуксимаб, пертузумаб, трастузумаб, алектумаб, ибритумомаб тиуксетан, брентуксимаб ведотин, цетуксимаб, бевацизумаб, абциксимаб, адалимумаб, алефацепт, базилизумаб, белимумаб, безлотоксумаб, канакинумаб, цертолизумаб пегол, даклизумаб, деносумаб, эфализумаб, голимумаб, оларатумаб, паливизумаб, панитумумаб и тоцилизумаб.

Иллюстративные ингибиторы молекул иммунных контрольных точек, которые можно применять в сочетании с композициями LVV или CAR-модифицированных лимфоцитов (например, Т-клеток, В-клеток или НК-клеток), описанных в данном документе, включают ингибиторы контрольных точек, нацеленные на PD-L1, PD-L2, CD80, CD86, B7-H3, B7-H4, HVEM, аденозин, GAL9, VISTA, CEACAM-1, CEACAM-3, CEACAM-5, PVRL2, PD-1, CTLA-4, BTLA, KIR, LAG3, TIM3, A2aR, CD244/2B4, CD160, TIGIT, LAIR-1, PVRIG/CD112R или любую их комбинацию. В определенных вариантах осуществления ингибитор контрольной точки иммунного ответа может представлять собой антитело, пептид, средство для RNAi или малую молекулу. Антитело, специфическое к CTLA-4, может представлять собой ипилимумаб или тремелимумаб. Антитело, специфическое к PD-1, может представлять собой пидилизумаб, ниволумаб или пембролизумаб. Антитело,

специфическое к PD-L1, может представлять собой дурвалумаб, атезолизумаб или авелумаб.

Иллюстративные химиотерапевтические средства, которые можно применять в сочетании с композициями LVV или CAR-модифицированных лимфоцитов (например, Т-клеток, В-клеток или НК-клеток), описанных в данном документе, могут включать алкилирующее средство, средство на основе платины, цитотоксическое средство, ингибитор функции хроматина, ингибитор топоизомеразы, ингибирующее микротрубочки лекарственное средство, повреждающее ДНК средство, антиметаболит (например, антагонисты фолата, аналоги пиримидина, аналоги пурина и аналоги с модифицированным сахаром), ингибитор синтеза ДНК, взаимодействующее с ДНК средство (например, интеркалирующее средство) и ингибитор репарации ДНК.

Как указано в данном документе, химиотерапевтическое средство включает неспецифические цитотоксические средства, которые ингибируют митоз или деление клеток, а также молекулярную таргетную терапию, которая блокирует рост и распространение раковых клеток путем воздействия на специфические молекулы, которые участвуют в росте, прогрессировании и метастазировании опухоли (например, онкогены). Иллюстративные неспецифические химиотерапевтические средства для применения в сочетании с композициями кассет экспрессии, описанными в данном документе, могут включать алкилирующее средство, средство на основе платины, цитотоксическое средство, ингибитор функции хроматина, ингибитор топоизомеразы, ингибирующее микротрубочки лекарственное средство, повреждающее ДНК средство, антиметаболит (например, антагонисты фолата, аналоги пиримидина, аналоги пурина и аналоги с модифицированным сахаром), ингибитор синтеза ДНК, взаимодействующее с ДНК средство (например, интеркалирующее средство), гипометилирующее средство и ингибитор репарации ДНК.

Примеры химиотерапевтических средств, рассматриваемых для применения в комбинированной терапии, предусмотренной в данном документе, включают вемурафениб, дабрафениб, траметиниб, кобиметиниб, анастрозол (Arimidex®), бикалутамид (Casodex®), блеомицина сульфат (Blenoxane®), бусульфан (Myleran®), бусульфан для инъекций (Busulfex®), капецитабин (Xeloda®), N4-пентоксикарбонил-5-дезоксидеозид-5-фторцитидин, карбоплатин (Paraplatin®), кармустин (BiCNU®), хлорамбуцил (Leukeran®), цисплатин (Platinol®), кладрибин (Leustatin®), циклофосфамид (Cytosan® или Neosar®), цитарабин, цитозинарабинозид (Cytosar-U®), цитарабин липосомы для инъекций (DepoCyt®), дакарбазин (DTIC-Dome®), дактиномицин (актиномицин D, космеган), даунорубицина гидрохлорид (Cerubidine®), даунорубицина цитрат липосомы для инъекций (DaunoXome®), дексаметазон, доцетаксел (Taxotere®), доксорубицина гидрохлорид

(Adriamycin®), Rubex®), этопозид (Vepesid®), флударабина фосфат (Fludara®), 5-фторурацил (Adrucil®, Efudex®), флутамид (Eulexin®), тезациитибин, гемцитабин (дифтордезоксцитидин), гидроксимочевину (Hydrea®), идарубицин (Idamycin®), ифосфамид (IFEX®), иринотекан (Camptosar®), L-аспарагиназу (ELSPAR®), лейковорин кальция, мелфалан (Alkeran®), 6-меркаптопурин (Purinethol®), метотрексат (Folex®), митоксантрон (Novantrone®), милотарг, паклитаксел (Taxol®), феникс (Yttrium90/MX-DTPA), пентостатин, полифепросан 20 с имплантом кармустина (Gliadel®), цитрат тамоксифена fdbra (Nolvadex®), тенипозид (Vumon®), 6-тиогуанин, тиотепу, тирапазамин (Tirazone®), топотекана гидрохлорид для инъекций (Nuscampin®), винбластин (Velban®), винкристин (Oncovin®), ибрутиниб, венетоклакс, кризотиниб, алектиниб, бригаиниб, церитиниб и винорелбин (Navelbine®).

Иллюстративные алкилирующие средства для применения в комбинированной терапии, предусмотренной в данном документе, включают азотистые иприты, производные этиленимина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазины): урациловый иприт (Aminouracil Mustard®, Chlorethaminacil®, Demethylodopan®, Desmethylodopan®, Haemanthamine®, Nordopan®, Uracil nitrogen Mustard®, Uracillost®, Uracilmostaza®, Uramustin®, Uramustine®), хлорметин (Mustargen®), циклофосфамид (Cytoxan®, Neosar®, Clafen®, Endoxan®, Procytox®, Revimmune™), ифосфамид (Mitoxana®), мелфалан (Alkeran®), хлорамбуцил (Leukeran®), пипоброман (Amedel®, Vercyte®), триэтиленмеламин (Hemel®, Hexalen®, Hexastat®), триэтилентиофосфорамин, темозоломид (Temodar®), тиотепу (Thioplex®), бусульфан (Busilvex®, Myleran®), кармустин (BiCNU®), ломустин (SeeNU®), стрептозоцин (Zanosar®) и дакарбазин (DTIC-Dome®). Дополнительные иллюстративные алкилирующие средства для применения в комбинированной терапии, предусмотренной в данном документе, включают без ограничения оксалиплатин (Eloxatin®); темозоломид (Temodar® и Temodal®); дактиномицин (также известный как актиномицин-D, Cosmegen®); мелфалан (также известный как L-ПАМ, L-сарколизин и фенилаланина иприт, Alkeran®); альтретамин (также известный как гексаметилмеламин (НММ), Hexalen®); кармустин (BiCNU®); бендамустин (Treanda®); бусульфан (Busulfex® и Myleran®); карбоплатин (Paraplatin®); ломустин (также известный как CCNU, SeeNU®); цисплатин (также известный как CDDP, Platinol® и Platinol®-AQ); Хлорамбуцил (Leukeran®); циклофосфамид (Cytoxan® и Neosar®); дакарбазин (также известный как DTIC, DIC и имидазолкарбоксамид, DTIC-Dome®); альтретамин (также известный как гексаметилмеламин (НММ), Hexalen®); ифосфамид (Ifex®); преднумустин; прокарбазин (Matulane®); мехлорэтамин (также известный как азотистый иприт, мустин и гидрохлорид мехлорэтамина, Mustargen®); стрептозоцин

(Zanosar®); тиотепу (также известную как тиофосфоамид, TESPA и TSPA, Thioplex®); циклофосфамид (Endoxan®, Cytoxan®, Neosar®, Procytox®, Revimmune®); и бендамустин HCl (Treanda®).

5 Иллюстративные средства на основе платины для применения в комбинированных видах терапии, предусмотренных в данном документе, включают карбоплатин, цисплатин, оксалиплатин, недаплатин, пикоплатин, сатраплатин, фенантриплатин и тетранитрат триплатина.

Иллюстративные гипометилирующие средства для применения в комбинированных видах терапии включают азацитидин и децитабин.

10 Иллюстративные молекулярно-таргетные ингибиторы для применения в комбинированных видах терапии, предусмотренной в данном документе, включают малые молекулы, которые нацелены на молекулы, участвующие в росте и выживании раковых клеток, включая, например, ингибиторы рецепторной тирозинкиназы, ингибиторы RAF, ингибиторы BCL-2, ингибиторы ABL, ингибиторы TRK, ингибиторы c-KIT, ингибиторы c-  
15 MET, ингибиторы CDK4/6, ингибиторы FAK, ингибиторы FGFR, ингибиторы FLT3, ингибиторы IDH1, ингибиторы IDH2, ингибиторы PDGFRA и ингибиторы RET.

Иллюстративная молекулярно-таргетная терапия включает гормональные антагонисты, ингибиторы сигнальной трансдукции, ингибиторы экспрессии генов (например, ингибиторы трансляции), индукторы апоптоза, ингибиторы ангиогенеза  
20 (например, ингибитор пути VEGF), ингибиторы тирозинкиназы (например, ингибитор пути EGF/EGFR), ингибиторы фактора роста, ингибиторы ГТФазы, ингибиторы серин/треониновой киназы, ингибиторы факторов транскрипции, ингибиторы драйверных мутаций, ассоциированных с раком, ингибиторы B-Raf, ингибиторы RAF, ингибиторы MEK, ингибиторы mTOR, ингибиторы аденозинового пути, ингибиторы EGFR,  
25 ингибиторы PI3K, ингибиторы BCL2, ингибиторы VEGFR, ингибиторы MET, ингибиторы MYC, ингибиторы BCR-ABL, ингибиторы ABL, ингибиторы HER2, ингибиторы H-RAS, ингибиторы K-RAS, ингибиторы PDGFR, ингибиторы ALK, ингибиторы ROS1, ингибиторы BTK, ингибиторы TRK, ингибиторы c-KIT, ингибиторы c-MET, ингибиторы CDK4/6, ингибиторы FAK, ингибиторы FGFR, ингибиторы FLT3, ингибиторы IDH1,  
30 ингибиторы IDH2, ингибиторы PARP, ингибиторы PARP, ингибиторы PDGFRA и ингибиторы RET.

Иллюстративные ингибиторы ангиогенеза включают без ограничения А6 (Angstrom Pharmaceuticals), АВТ-510 (Abbott Laboratories), АВТ-627 (атразентан) (Abbott Laboratories/Xinlay), АВТ-869 (Abbott Laboratories), актимид (CC4047, помалидомид)  
35 (Celgene Corporation), AdGVPEDF.11D (GenVec), АДН-1 (эксгерин) (Adherex Technologies),



АЕЕ788 (Novartis), AG-013736 (акситиниб) (Pfizer), AG3340 (приномастат) (Agouron Pharmaceuticals), AGX1053 (AngioGenex), AGX51 (AngioGenex), ALN-VSP (ALN-VSP O2) (Alnylam Pharmaceuticals), AMG 386 (Amgen), AMG706 (Amgen), апатиниб (YN968D1) (Jiangsu Hengrui Medicine), AP23573 (Ridaforolimus/МК8669) (Ariad Pharmaceuticals), AQ4N (Novavea), ARQ 197 (ArQule), ASA404 (Novartis/Antisoma), атипримод (Callisto Pharmaceuticals), ATN-161 (Attenuon), AV-412 (Aveo Pharmaceuticals), AV-951 (Aveo Pharmaceuticals), авастин (бевацизумаб) (Genentech), AZD2171 (цедираниб/рецентин) (AstraZeneca), BAY 57-9352 (телатиниб) (Bayer), BEZ235 (Novartis), BIBF1120 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals), BIBW 2992 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals), BMS-2752 91 (Bristol-Myers Squibb), BMS-582664 (бриваниб) (Bristol-Myers Squibb), BMS-690514 (Bristol-Myers Squibb), кальцитриол, CCI-779 (Torisel) (Wyeth), CDP-791 (ImClone Systems), цефлатонин (гомохаррингтонин/ННТ) (ChemGenex Therapeutics), целебрекс (целекоксиб) (Pfizer), CEP-7055 (Cephalon/Sanofi), CHIR-265 (Chiron Corporation), NGR-TNF, COL-3 (метастат) (Collagenex Pharmaceuticals), комбретастатин (Oxigene), CP-751,871 (фигитумумаб) (Pfizer), CP-547,632 (Pfizer), CS-7017 (Daiichi Sankyo Pharma), CT-322 (ангиоцепт) (Adnexus), куркумин, далтепарин (фрагмин) (Pfizer), дисульфирам (Antabuse), E7820 (Eisai Limited), E7080 (Eisai Limited), EMD 121974 (циленгитид) (EMD Pharmaceuticals), ENMD-1198 (EntreMed), ENMD-2076 (EntreMed), эндостар (Simcere), эрбитукс (ImClone/Bristol-Myers Squibb), EZN-2208 (Enzon Pharmaceuticals), EZN-2968 (Enzon Pharmaceuticals), GC1008 (Genzyme), генистеин, GSK1363089 (Foretinib) (ГлахоSmithKline), GW786034 (пазопаниб) (ГлахоSmithKline), GT-111 (Vascular Biogenics Ltd.), ИМС-1121В (рамуцирумаб) (ImClone Systems), ИМС-18F1 (ImClone Systems), ИМС-3G3 (ImClone LLC), INCB007839 (Incyte Corporation), INGN 241 (Introgen Therapeutics), ирессу (ZD1839/Gefitinib), LBH589 (Faridak/Panobinostst) (Novartis), луцентис (ранибизумаб) (Genentech/Novartis), LY317615 (энзастаурин) (Eli Lilly and Company), макуген (пегаптаниб) (Pfizer), MEDI522 (абегрин) (MedImmune), MLN518 (тандутиниб) (Millennium), неовастат (АЕ941/бенефин) (Aeterna Zentaris), нексавар (Bayer/Онух), NM-3 (Genzyme Corporation), носкапин (Cougar Biotechnology), NPI-2358 (Nereus Pharmaceuticals), OSI-930 (OSI), паломид 529 (Paloma Pharmaceuticals, Inc.), панзем капсулы (2МЕ2) (EntreMed), панзем NCD (2МЕ2) (EntreMed), PF-02341066 (Pfizer), PF-04554878 (Pfizer), PI-88 (Progen Industries/Medigen Biotechnology), РКC412 (Novartis), полифенон Е (экстракт зеленого чая) (Polypheno E International, Inc.), PPI-2458 (Praecis Pharmaceuticals), РТС299 (РТС Therapeutics), РТК787 (ваталаниб) (Novartis), PXD101 (белиностат) (CuraGen Corporation), RAD001 (эверолимус) (Novartis), RAF265 (Novartis), регорафениб (BAY73-4506) (Bayer), ревлимид (Celgene), ретаан (Alcon Research), SN38 (липосомальный) (Neopharm), SNS-032

(BMS-387032) (Sunesis), SOM230 (пазиреотид) (Novartis), скваламин (Genaera), сурамин, сутент (Pfizer), тарцева (Genentech), ТВ-403 (Thrombogenics), темпостатин (Collard Biopharmaceuticals), тетрагиолибдат (Sigma-Aldrich), TG100801 (TargeGen), талидомид (Celgene Corporation), тинзапарин натрия, TKI258 (Novartis), TRC093 (Tacon Pharmaceuticals Inc.), VEGF-ловушка (афлиберцепт) (Regeneron Pharmaceuticals), VEGF-ловушка-глаз (Regeneron Pharmaceuticals), веглин (VasGene Therapeutics), бортезомиб (Millennium), XL184 (Exelixis), XL647 (Exelixis), XL784 (Exelixis), XL820 (Exelixis), XL999 (Exelixis), ZD6474 (AstraZeneca), вориностат (Merck) и ZSTK474.

Иллюстративные ингибиторы В-Raf включают вемурафениб, дабрафениб и энкорафениб.

Иллюстративные ингибиторы MEK включают биниметиниб, кобиметиниб, рефаметиниб, селуметиниб и траметиниб.

Иллюстративные ингибиторы ВТК включают ибрутиниб, Лохо-305, тирабрутиниб, GDC-0853, акалабрутиниб, ONO-4059, спебрутиниб, BGB-3111, HM71224 и M7583.

Иллюстративные ингибиторы TRK включают энтректиниб, ларотректиниб, CN7057288, ONO-7579, LOXO-101, лестауртиниб и LOXO-195.

Иллюстративные ингибиторы с-KIT включают иматиниб, сунитиниб и понатиниб.

Иллюстративные ингибиторы с-MET включают капматиниб, кризотиниб, тивантиниб, онартузумаб, INCB28060, AMG-458, саволитиниб и тепотиниб.

Иллюстративные ингибиторы CDK4/6 включают палбоциклиб, рибоциклиб, абемациклиб и трилациклиб.

Иллюстративные ингибиторы FAK включают дефактиниб, GSK2256098, BI853520 и PF-00562271.

Иллюстративные ингибиторы FGFR включают эрдафитиниб, пемигатиниб, инфигратиниб, рогаратиниб, AZD4547, BGJ398, FP-1039 и ARQ 087.

Иллюстративные ингибиторы FLT-3 включают кизартиниб, креноланиб, гилтеритиниб, мидостаурин и лестауртиниб.

Иллюстративные ингибиторы IDH1 включают ивосидениб, BAY-1436032 и AGI-5198.

Иллюстративный ингибитор IDH2 включает энаседениб.

Иллюстративные ингибиторы PARP включают талазопариб, нирапариб, рукапариб, олапариб, велипариб, CEP 9722, E7016, AG014699, MK4827, BMN-673 и памипариб (BGB-290).

Иллюстративные ингибиторы PDGFRA включают иматиниб, регорафениб, креноланиб и оларатумаб.

Иллюстративные ингибиторы всех видов RAF включают белварфафениб, LXH254, LY3009120, INU-152 и HM95573.

Иллюстративные ингибиторы RET включают ленватиниб, алектиниб, вандетаниб, кабозантиниб, BLU-667 и LOXO-292.

5 Иллюстративные ингибиторы ROS1 включают церитиниб, лорлатиниб, энтректиниб, кризотиниб, TPX-0005 и DS-6051b.

Иллюстративные ингибиторы рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) включают без ограничения бевацизумаб (Avastin®), акситиниб (Inlyta®); бриваниба аланинат (BMS-582664, (S)—((R)-1-(4-(4-фтор-2-метил-1H-индол-5-илокси)-5-метилпирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-6-илокси)пропан-2-ил)2-аминопропаноат); сорафениб (Nexavar®); пазопаниб (Votrient®); сунитиниба малат (Sutent®); цедираниб (AZD2171, CAS 288383-20-1); варгатеф (BIBF1120, CAS 928326-83-4); форетиниб (GSK1363089); телатиниб (BAY57-9352, CAS 332012-40-5); апатиниб (YN968D1, CAS 811803-05-1); иматиниб (Gleevec®); понатиниб (AP24534, CAS 943319-70-8); тивозаниб (AV951, CAS 475108-18-0); регорафениб (BAY73-4506, CAS 755037-03-7); ваталаниба дигидрохлорид (PTK787, CAS 212141-51-0); бриваниб (BMS-540215, CAS 649735-46-6); вандетаниб (Caprelsa® или AZD6474); дифосфат мотесаниба (AMG706, CAS 857876-30-3, N-(2,3-дигидро-3,3-диметил-1H-индол-6-ил)-2-[(4-пиридинилметил)амино]-3-пиридинкарбоксамид, описанный в публикации РСТ № WO 02/066470); довитиниб димолочную кислоту (TKI258, CAS 852433-84-2); линфаниб (ABT869, CAS 796967-16-3); кабозантиниб (XL184, CAS 849217-68-1); лестауртиниб (CAS 111358-88-4); N-[5-[[[5-(1,1-диметилэтил)-2-оксазолил]метил]тио]-2-тиазолил]-4-пиперидинкарбоксамид (BMS38703, CAS 345627-80-7); (3R,4R)-4-амино-1-((4-((3-метоксифенил)амино)пирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-ил)метил)пиперидин-3-ол (BMS690514); N-(3,4-дихлор-2-фторфенил)-6-метокси-7-[[3α,5β,6α)-октагидро-2-метилциклопента[с]пиррол-5-ил]метокси]-4-хиназолинамин (XL647, CAS 781613-23-8); 4-метил-3-[[1-метил-6-(3-пиридинил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-ил]амино]-N-[3-(трифторметил)фенил]-бензамид (BHG712, CAS 940310-85-0); и афлиберцепт (Eylea®).

10  
15  
20  
25

Иллюстративные ингибиторы пути EGF включают без ограничения тирфостин 46, ЕКВ-569, эрлотиниб (Tarceva®), гефитиниб (Iressa®), эрбитукс, нимотузумаб, лапатиниб (Tykerb®), цетуксимаб (mAb к EGFR), <sup>188</sup>Re-меченый нимотузумаб (mAb к EGFR), а также те соединения, которые в общем и конкретно раскрыты в WO 97/02266, EP 0564409, WO 99/03854, EP 0520722, EP 0566226, EP 0787722, EP 0837063, патенте США № 5747498, WO 98/10767, WO 97/30034, WO 97/49688, WO 97/38983 и WO 96/33980. Иллюстративные антитела к EGFR включают без ограничения цетуксимаб (Erbix®); панитумумаб (Vectibix®); матузумаб (EMD-72000); трастузумаб (Herceptin®); нимотузумаб (hR3);

30  
35

залутумаб; TheraCIM h-R3; MDX0447 (CAS 339151-96-1); и ch806 (mAb-806, CAS 946414-09-1). Иллюстративные ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) включают без ограничения гидрохлорид эрлотиниба (Tarceva®); церитиниб; бригаиниб; осимеритиниб; икотиниб; гефитиниб (Iressa®); N-[4-[(3-хлор-4-фторфенил)амино]-7-[[3" S"-тетрагидро-3-фуранил]окси]-6-хиназолинил]-4(диметиламино)-2-бутенамид, Tovok®); вандетаниб (Caprelsa®); лапатиниб (Tykerb®); (3R,4R)-4-амино-1-((4-((3-метоксифенил)амино)пирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-ил)метил)пиперидин-3-ол (BMS690514); канертиниба дигидрохлорид (CI-1033); 6-[4-[(4-этил-1-пиперазинил)метил]фенил]-N-[(1R)-1-фенилэтил]-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-амин (AEE788, CAS 497839-62-0); мубритиниб (TAK165); пелитиниб (EKB569); афатиниб (BIBW2992); нератиниб (NKI-272); N-[4-[[1-[(3-фторфенил)метил]-1H-индазол-5-ил]амино]-5-метилпирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-6-(3S)-3-морфолинилметиловый эфир ил]-карбаминовой кислоты (BMS599626); N-(3,4-дихлор-2-фторфенил)-6-метокси-7-[[3α,5β,6α)-октагидро-2-метилциклопента[с]пиррол-5-ил]метокси]-4-хиназолинамин (XL647, CAS 781613-23-8); 4-[4-[[1-[(1R)-1-фенилэтил]амино]-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-6-ил]фенол (PKI166, CAS 187724-61-4); роцелитиниб.

Иллюстративные ингибиторы mTOR включают без ограничения рапамицин (Rapamune®) и его аналоги и производные; SDZ-RAD; темсиролимус (Torisel®; также известный как CCI-779); ридафоролимус (ранее известный как деферолимус, (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-дигидрокси-19,30-диметокси-15,17,21,23,29,35-гексаметил-2,3,10,14,20-пентаоксо-11,36-диокса-4-азатрицикло[30.3.1.0<sup>4,9</sup>]гексатриаконта-16,24,26,28-тетраен-12-ил]пропил]-2-метоксициклогексилдиметилфосфинат, также известный как AP23573 и MK8669 и описанный в публикации РСТ № WO 03/064383); эверолимус (Afinitor® или RAD001); рапамицин (AY22989, Sirolimus®); симапимод (CAS 164301-51-3); (5-{2,4-бис[(3S)-3-метилморфолин-4-ил]пиридо[2,3-d]пиримидин-7-ил}-2-метоксифенил)метанол (AZD8055); 2-амино-8-[транс-4-(2-гидроксиэтокси)циклогексил]-6-(6-метокси-3-пиридинил)-4-метилпиридо[2,3-d]пиримидин-7(8H)-он (PF04691502, CAS 1013101-36-4); и N<sup>2</sup>-[1,4-диоксо-[[4-(4-оксо-8-фенил-4H-1-бензопиран-2-ил)морфолиний-4-ил]метокси]бутил]-L-аргинилглицил-L-α-аспартил-L-серин-, внутренняя соль (SF1126, CAS 936487-67-1).

Иллюстративные ингибиторы фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) включают без ограничения дувелисиб, иделаалисиб, 4-[2-(1H-индазол-4-ил)-6-[[4-(метилсульфонил)пиперазин-1-ил]метил]тиено[3,2-d]пиримидин-4-ил]морфолин (также известный как GDC 0941 и описанный в публикациях РСТ №№ WO 09/036082 и WO

09/055730); 2-метил-2-[4-[3-метил-2-оксо-8-(хинолин-3-ил)-2,3-дигидроимидазо[4,5-с]хинолин-1-ил]фенил]пропионитрил (также известный как BEZ 235 или NVP-BEZ 235 и описанный в публикации РСТ № WO 06/122806); 4-(трифторметил)-5-(2,6-диморфолинопириимидин-4-ил)пиридин-2-амин (также известный как ВКМ120 или NVP-ВКМ120 и описанный в публикации РСТ № WO2007/084786); тозасертиб (VX680 или МК-0457, CAS 639089-54-6); (5Z)-5-[[4-(4-пиридинил)-6-хинолинил]метилен]-2,4-тиазолидиндион (GSK1059615, CAS 958852-01-2); (1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(ацетилокси)-1-[(ди-2-пропениламино)метилен]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-октагидро-11-гидрокси-4-(метоксиметил)-4a,6a-диметилциклопента[5,6]нафто[1,2-с]пиран-2,7,10(1H)-трион (PX866, CAS 502632-66-8); и 8-фенил-2-(морфолин-4-ил)хромен-4-он (LY294002, CAS 154447-36-6).

Иллюстративные ингибиторы протеинкиназы В (PKB) или АКТ включают без ограничения 8-[4-(1-аминоциклобутил)фенил]-9-фенил-1,2,4-триазоло[3,4-f][1,6]нафтиридин-3(2H)-он (МК-2206, CAS 1032349-93-1); перифозин (KRX0401); 4-додецил-N-1,3,4-тиадиазол-2-илбензолсульфонамид (PHT-427, CAS 1191951-57-1); 4-[2-(4-амино-1,2,5-оксадиазол-3-ил)-1-этил-7-[(3S)-3-пиперидинилметокси]-1H-имидазо[4,5-с]пиридин-4-ил]-2-метил-3-бутин-2-ол (GSK690693, CAS 937174-76-0); 8-(1-гидроксиэтил)-2-метокси-3-[(4-метоксифенил)метокси]-6H-добензо[b,d]пиран-6-он (паломид 529, P529 или SG-00529); трицирбин (6-амино-4-метил-8-(β-D-рибофуранозил)-4H,8H-пирроло[4,3,2-де]пиримидо[4,5-с]пиридазин); (αS)-α-[[[5-(3-метил-1H-индазол-5-ил)-3-пиридинил]окси]метил]бензолэтанамин (A674563, CAS 552325-73-2); 4-[(4-хлорфенил)метил]-1-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-4-пиперидинамин (CCT128930, CAS 885499-61-6); 4-(4-хлорфенил)-4-[4-(1H пиразол-4-ил)фенил]пиперидин (AT7867, CAS 857531-00-1); и архексин (RX-0201, CAS 663232-27-7).

В определенных вариантах осуществления ингибитор тирозинкиназы, используемый в комбинации с LVV или CAR-модифицированными Т-клетками, представляет собой ингибитор киназы анапластической лимфомы (ALK). Иллюстративные ингибиторы ALK включают кризотиниб, церитиниб, алектиниб, бригатиниб, далантерцепт, энтректиниб и лорлатиниб.

В определенных вариантах осуществления, где LVV или CAR-модифицированные лимфоциты (например, Т-клетки или НК-клетки) вводят в сочетании с одним или несколькими дополнительными видами терапии, LVV, CAR-модифицированные лимфоциты (например, Т-клетки или НК-клетки) или один или несколько дополнительных видов терапии можно вводить в дозах, которые в противном случае можно было бы считать субтерапевтическими, если бы они применялись в качестве монотерапии.

Комбинированная терапия включает введение композиции LVV или CAR-модифицированных лимфоцитов (например, Т-клеток или НК-клеток), как описано в данном документе, перед дополнительной терапией (например, за 1-30 дней или больше до дополнительной терапии), одновременно с дополнительной терапией (в тот же день) или после дополнительной терапии (например, через 1-30 дней и более после дополнительной терапии). В определенных вариантах осуществления LVV или CAR-модифицированные лимфоциты (например, Т-клетки или НК-клетки) вводят одновременно с одним или несколькими дополнительными видами терапии. В дополнительных вариантах осуществления LVV или CAR-модифицированные лимфоциты (например, Т-клетки или НК-клетки) вводят за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 дней до или после введения одного или нескольких дополнительных видов терапии. В еще одних дополнительных вариантах осуществления LVV или CAR-модифицированные лимфоциты (например, Т-клетки или НК-клетки) вводят в течение 4 недель, в течение 3 недель, в течение 2 недель или в течение 1 недели до или после введения одного или нескольких дополнительных видов терапии. Если один или несколько дополнительных видов терапии включают несколько доз, LVV или CAR-модифицированные лимфоциты (например, Т-клетки или НК-клетки) можно вводить до или после начальной дозы одного или нескольких дополнительных видов терапии, после окончательной дозы одной или нескольких дополнительных видов терапии, или между несколькими дозами одного или нескольких дополнительных видов терапии.

Субъекты, которых можно лечить с помощью композиций и способов по настоящему изобретению, включают животных, таких как люди, приматы, коровы, лошади, овцы, собаки, кошки, мыши, крысы, кролики, морские свинки или свиньи. Субъект может быть мужчиной или женщиной и может быть любого подходящего возраста, включая младенцев, несовершеннолетних, подростков, взрослых и гериатрических субъектов.

## **ПРИМЕРЫ**

### Пример 1. Способы создания лентивирусных векторов с определенным тропизмом

Самоинактивирующиеся лентивирусные векторы (LVV), как описано в данном документе, получали с использованием производственной системы третьего поколения. Плазмиду экспрессии, которая содержит последовательности генов, необходимые для доставки с помощью LVV, объединяли в определенных соотношениях с тремя упаковывающими плазмидами, VSV-G, GagPol и Rev, и использовали для трансфекции клеток-продуцентов HEK293. Продуктивные вирусные частицы собирали из культуральной среды HEK293 через 2-3 дня.

Тропизм полученного LVV тестировали, чтобы определить, можно ли его

перенаправить с помощью невирусного нацеливающего белка, как описано в данном документе, экспрессированного из одной из трех упаковывающих плазмид, или с помощью добавления пятой плазмиды к смеси для трансфекции. Вектор LVV содержит мутантный оболочечный белок VSV-G, где мутантный VSV-G содержит мутации, которые устраняют связывание мутантного VSV-G с его интактным рецептором, так что проникновение вируса происходит посредством определяющего тропизм невирусного белка. Было обнаружено, что мутации в сайте связывания рецептора LDL VSV-G устраняют связывание с его природным рецептором. VSV-G, несущие множество мутаций (Trop-002 (SEQ ID NO: 74), Trop-051 (SEQ ID NO: 93), Trop-052 (SEQ ID NO: 95), Trop-055 (SEQ ID NO: 97) или Trop-061 (SEQ ID NO: 103)), экспрессировали вместе с CD80 (SEQ ID NO: 2) на LVV. CD80 является природным лигандом Т-клеточных поверхностных рецепторов, CD28 и CTLA4, и обеспечивает тропизм к Т-клеткам, а не к В-клеткам. Связывание с природным рецептором VSV-G оценивают с помощью трансдукции В-клеток Raji. Некоторые мутации в VSV-G запрещают трансдукцию В-клеток Raji, но трансдукция Т-клеток Jurkat сохраняется (**фиг. 2А-2В**).

В первом способе определяющий тропизм целевой белок, полученный из CD80 (SEQ ID NO: 76), экспрессировали из упаковывающей плазмиды с VSV-G. CD80 является природным лигандом Т-клеточных поверхностных рецепторов, CD28 и CTLA4, и обеспечивает тропизм к Т-клеткам. Кодон-оптимизированную молекулу CD80 (кодирующую SEQ ID NO: 2) клонировали ниже мутантного VSV-G (Trop-002, кодирующего SEQ ID NO: 74), который содержит мутации, устраняющие связывание рецептора LDL, и использовали для упаковки экспрессирующего зеленый флуоресцентный белок (GFP) LVV. CD80 и VSV-G экспрессировали при относительно эквивалентных уровнях на поверхности клеток-продуцентов HEK293, что позволяет предположить сопоставимое декорирование частиц LVV (**фиг. 3А**). LVV, созданный с помощью этого подхода, был способен трансдуцировать Т-клетки, что оценивали с помощью экспрессии GFP (**фиг. 3В**).

Во втором способе определяющий тропизм нацеливающий белок CD80 (кодирующий SEQ ID NO: 2), клонировали в упаковывающую плазмиду с Rev и трансфицировали при более низкой молярной концентрации в плазмиду с env VSV-G (кодирующую Trop-002 (SEQ ID NO: 74)). Модифицированные плазмиды использовали для упаковки экспрессирующего GFP LVV. Оценка экспрессии VSV-G и CD80 на клетках-продуцентах HEK-293 показала, что относительные уровни экспрессии имеют тенденцию к изменению молярных концентраций упаковывающих плазмид. LVV, созданный с помощью этих подходов к упаковке, был способен трансдуцировать Т-клетки, что

оценивали с помощью экспрессии GFP (**фиг. 4**). Сниженную экспрессию CD80 наблюдали в LVV, упакованных с нацеливающим белком CD80, содержащимся в упаковывающей плазмиде с Rev, вследствие более низкого соотношения плазмиды с Rev.

В третьем способе определяющий тропизм нацеливающий белок CD80 (кодирующий SEQ ID NO: 2) добавляли в качестве дополнительной плазмиды во время трансфекции клеток HEK293, предназначенных для продуцирования LVV (Trop-002 VSV-G env). Количество плазмиды с CD80, используемой во время продуцирования LVV, было ассоциировано с экспрессией на клетках-продуцентах HEK293 и, вероятно, отражает декорирование частиц LVV. LVV, созданный с помощью этого подхода к упаковке, был способен трансдуцировать Т-клетки, что оценивали с помощью экспрессии GFP, а эффективность трансдукции была ассоциирована с уровнями CD80 на частицах LVV (**фиг. 5**).

Независимо от выбранного способа, перенаправленный с помощью тропизма LVV с высоким титром можно получить с помощью прикрепленных или суспензионных клеток-продуцентов HEK293 и концентрировать с помощью центрифугирования или анионообменной хроматографии (АЕХ) с последующей тангенциальной проточной фильтрацией (ТФФ) (**фиг. 6А-6С**). Концентрирование с помощью АЕХ/ТФФ приводило к получению препаратов LVV с высоким уровнем чистоты и извлечения (**фиг. 6D**).

#### Пример 2. CD4, Т-клетки обогащенные LVV с CD80

Определяющая тропизм молекула точно определяет конкретный тип клеток, трансдуцируемых этим LVV. Лиганд CD80, CD28, естественным образом экспрессируется на Т-клетках. Однако CD4 Т-клетки с большей частотой экспрессируют CD28 в периферической крови человека по сравнению с CD8 Т-клетками (80% по сравнению с 50%). Когда LVV упаковывали для декорирования оболочки Trop-002 VSV-G нацеливающим белком CD80 (SEQ ID NO: 76), и использовался для трансдукции РВМС человека, наблюдали более высокую частоту в составе трансдуцированных CD4 Т-клеток по сравнению с трансдуцированными CD8 Т-клетками, поддерживаемую в культуре до недели (**фиг. 13**).

Пример 3. Способы получения ex vitro опухоlereактивных Т-клеток, сконструированных для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), с использованием лентивирусного вектора, характеризующегося специфическим для Т-клеток тропизмом

По сравнению со стандартными лентивирусными векторами (LVV), в которых используются обычные упаковывающие системы третьего поколения, LVV, упакованный для перенаправления тропизма, как представлено в данном документе, может иметь улучшенную эффективность и специфичность трансдукции. Уровни доступных вирусных



частиц, вероятно, возрастают при трансдукции определенного типа клеток как части гетерогенной смеси, поскольку частицы LVV не поглощаются другими, нежелательными типами клеток. Оценивали возможность улучшения трансдукции Т-клеток молекулой CAR в смеси гетерогенных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

5 Использовали репрезентативный CAR к BCMA (SEQ ID NO: 58), используемый для лечения множественной миеломы, или репрезентативный CAR к CD19 (SEQ ID NO: 42), используемый для лечения неходжкинской лимфомы. Репортер GFP использовали в качестве контроля. LVV упаковывали так, чтобы декорировать оболочку нацеливающим на CD3 белком и нацеливающим белком CD80, и перенаправить тропизм к Т-клеточным

10 поверхностным молекулам, CD3, CD28 и CTLA4. Нацеливающий белок CD80 клонировали в упаковывающую плазмиду с Trop-002 VSV-G env (SEQ ID NO: 76), а нацеливающий на CD3 белок (кодирующий SEQ ID NO: 10) экспрессировали из пятой упаковывающей плазмиды.

Проверяли эффективность трансдукции Т-клеток в PBMC, полученных в результате

15 лейкофереза здоровых доноров после получения информированного согласия. PBMC обогащали с помощью лизиса эритроцитов, а подобранных доноров трансдуцировали стандартным LVV или LVV с перенаправленным Т-клеточным тропизмом (антитело к CD3 и CD80) при концентрациях LVV в 5-25 раз ниже, чем обычно используется для трансдукции CAR Т-клеток. Экспрессию CAR к BCMA оценивали с помощью проточной

20 цитометрии после окрашивания флуоресцентно меченной молекулой BCMA для специфического обнаружения BCMA CAR Т-клеток. Даже при чрезвычайно низких уровнях вируса Т-клетки, трансдуцированные с использованием LVV с тропизмом к Т-клеткам, демонстрировали более высокие уровни трансдукции по сравнению со стандартным LVV (фиг. 7).

В том же исследовании оценивали, можно ли создавать BCMA CAR Т-клетки без

25 антител для активации Т-клеток. Антитела, активирующие Т-клетки (например, антитело к CD28 и антитело к CD3), обычно требуются для трансдукции с использованием стандартного LVV во время создания CAR Т-клеток. Было подтверждено, что стандартный LVV действительно требует активации с использованием антител для трансдукции

30 нормальных первичных Т-клеток человека (фиг. 7). В отличие от этого, перенаправленный Т-клетками LVV (антитело к CD3 и CD80) может вызывать трансдукцию даже в отсутствие предшествующей активации Т-клеток (без присутствия IL-2 и экзогенных активирующих антител к CD3 и антител к CD28) (фиг. 7). Следствием Т-клеточной активации является последующее размножение клеток при культивировании в среде, содержащей IL-2. PBMC,

35 трансдуцированные в присутствии или в отсутствие экзогенных активирующих антител к

CD3 и антител к CD28 после стандартного LVV или перенаправленного Т-клетками LVV (антитело к CD3 и CD80), показали, что перенаправленный Т-клетками LVV был уникально способен размножать Т-клетки даже в отсутствие активации антитела (**фиг. 8**). В другом примере трансдукция CAR к CD19 также была достигнута без предварительной Т-клеточной активации при использовании перенаправленного Т-клетками LVV (антитело к CD3 и CD80) (**фиг. 9**).

Т-клеточная активация и эффективность трансдукции могут определяться выбором антител к CD3, используемых для создания перенаправленного Т-клетками LVV. Примеры связанных с оболочкой CD3-связывающих белков, имеющих связывающие домены 12F6 в ориентации VH (SEQ ID NO:113)-VL (SEQ ID NO:115) и VL (SEQ ID NO:115)-VH (SEQ ID NO:113), показывают, что ориентация Т-клеток вызывает различную степень трансдукции Т-клеток, а также Т-клеточной активации (**фиг. 10**).

#### Пример 4. Т-клеточная специфичность нацеленного на Т-клетки лентивирусного вектора

Т-клеточную специфичность LVV, упакованного для декорации оболочки (Trop-002 VSV-G env) с нацеливающим на CD3 белком (SEQ ID NO: 10) и нацеливающим белком CD80 (SEQ ID NO: 2), подтверждали с помощью трансдукции Т-клеточной линии и панели В-клеточных линий (Raji, Ramos, Jeko-1, NALM-6). Трансдукцию этих клеточных линий, оцененную с помощью проточной цитометрии для трансгена GFP, сравнивали со стандартным LVV. Как стандартный LVV, так и нацеленный на Т-клетки LVV, эффективно трансдуцировали Т-клеточную линию (Jurkat). Стандартный LVV эффективно трансдуцировал все линии В-клеток, подтверждая, что эти линии чувствительны к трансдукции LVV, но никакой существенной трансдукции с помощью нацеливающего на Т-клетки LVV не обнаруживали ни в одной из В-клеточных линий (**фиг. 14**).

#### Пример 5. Опухоспецифические Т-клетки, полученные с использованием нацеленного на Т-клетки лентивирусного вектора

Используя способы, описанные в данном документе, Т-клетки, экспрессирующие CAR к ВСМА (SEQ ID NO: 58), создавали путем трансдукции PBMC от здоровых доноров LVV, имеющими Trop-002 VSV-G env, а также нацеливающий белок CD80 и нацеливающий на CD3 белок. Нацеливающий CD80 белок клонировали в упаковывающую плазмиду с Trop-002 VSV-G env (SEQ ID NO: 76), а нацеливающий на CD3 белок (кодирующий SEQ ID NO: 10) экспрессировали из пятой упаковывающей плазмиды для получения нацеливающих на Т-клетки LVV. Трансдукции Т-клеток выполняли в отсутствие какой-либо стимуляции Т-клеток, обычно необходимой для эффективного переноса генов, опосредованного LVV (экзогенное антитело к CD3 и антитело к CD28).

Во-первых, активность ВСМА CAR Т-клеток, создаваемых с помощью

перенаправленных Т-клетками LVV, исследовали по сравнению со стандартным LVV. Противоопухолевую активность оценивали путем окрашивания внутриклеточных цитокинов в отношении гамма-интерферона и фактора некроза опухоли-альфа после кокультивирования с ВСМА-отрицательной клеточной линией (Nalm-6) или ВСМА-положительной клеточной линией (RPMI-8826). ВСМА CAR Т-клетки демонстрируют повышенную экспрессию Т-клеточных эффекторных цитокинов после культивирования с ВСМА-положительными клеточными линиями, которая не наблюдается в случае ВСМА-отрицательных клеточных линий, независимо от того, создаются ли они стандартным LVV или перенаправленным Т-клетками LVV (**фиг. 11**).

10 Пример 6. Способы специфической в отношении Т-клеток доставки генетического материала in vivo с использованием лентивирусного вектора с тропизмом к Т-клеткам

Эффективная и специфическая трансдукция Т-клеток нацеленным на Т-клетки LVV может обеспечить безопасную и эффективную доставку генетического материала к Т-клеткам in vivo. Для проверки этой гипотезы использовали модель гуманизированной мыши, которой

15 внутривенно вводили экспрессирующий GFP нацеленный на Т-клетки LVV. Получали LVV, имеющие VSV-G с мутацией Trop-002 и покрытые нацеливающим на CD3 белком и нацеливающим белком CD80. Нацеливающий CD80 белок клонировали в упаковывающую плазмиду с Trop-002 VSV-G env (SEQ ID NO: 76), а нацеливающий на CD3 белок (кодирующий SEQ ID NO: 10) экспрессировали из пятой упаковывающей плазмиды для

20 получения нацеливающих на Т-клетки LVV. Мышей NCG с ослабленным иммунитетом гуманизировали посредством внутривенной инъекции PBMC человека и поддерживали ежедневным внутрибрюшинным введением рекомбинантного IL-2 в течение 4 дней. Через день после введения PBMC нацеленный на Т-клетки лентивирусный вектор вводят внутривенно мышам. Периферическую кровь и клетки селезенки собирали в день 7 и

25 специфичность Т-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии. GFP-положительные клетки обнаруживали только в Т-клетках человека (CD3+), но не в В-клетках человека (CD20+), что подтверждает Т-клеточную специфичность трансдукции LVV (**фиг. 12А**). GFP обнаруживали как в CD8+, так и в CD8- (CD4) Т-клетках, что указывает на то, что специфический для Т-клеток LVV трансдуцирует как CD4, так и CD8

30 Т-клетки in vivo (**фиг. 12В**).

Специфическая трансдукция Т-клеток имеет ключевое преимущество в безопасности по сравнению с другими подходами доставки CAR in vivo за счет минимизации риска трансдукции опухолевых клеток. Трансдукцию Т-клеток без трансдукции опухолевых клеток оценивают с использованием PBMC от пациентов с хроническим лимфоцитарным

35 лейкозом с обнаруживаемыми CD19 опухолевыми клетками. PBMC трансдуцируют

нацеленным на Т-клетки LVV и трансдуцированные клетки оценивают с помощью проточной цитометрии.

Различные варианты осуществления, описанные выше, можно объединить для создания дополнительных вариантов осуществления. Все патенты США, публикации 5 заявок на патент США, заявки на патент США, иностранные патенты, заявки на иностранные патенты и непатентные публикации, упомянутые в настоящем описании и/или перечисленные в техническом описании заявки, включая без ограничения предварительную заявку на патент США № 63/154,639, поданную 26 февраля 2021 г., включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Аспекты вариантов осуществления 10 могут быть изменены, если необходимо использовать концепции различных патентов, заявок и публикаций для обеспечения дополнительных вариантов осуществления.

Эти и другие изменения могут быть внесены в варианты осуществления в свете приведенного выше подробного описания. В общем, в следующей формуле изобретения используемые термины не следует истолковывать как ограничивающие формулу 15 изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в описании и формуле изобретения, а следует истолковывать как включающие все возможные варианты осуществления вместе с полным объемом эквивалентов, к которым такая формула изобретения относится. Соответственно, формула изобретения не ограничивается настоящим изобретением.

20

25

30

35

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Lentивирусный вектор, содержащий:

(а) вирусную оболочку, содержащую:

5 гетерологичный нацеливающий на лимфоциты белок, при этом нацеливающий на лимфоциты белок содержит:

внеклеточный домен, содержащий нацеливающий на лимфоциты домен; и трансмембранный домен; и

10 (b) мутантный оболочечный белок VSV-G, который ингибирует связывание с LDL-R, но опосредует слияние мембран; и

(с) кассету экспрессии, содержащую гетерологичный трансген.

2. Lentивирусный вектор по п. 1, где гетерологичный нацеливающий на лимфоциты белок представляет собой гетерологичный нацеливающий на Т-клетки белок, содержащий внеклеточный домен, содержащий нацеливающий на Т-клетки домен.

15 3. Lentивирусный вектор по п. 1, где гетерологичный нацеливающий на лимфоциты белок представляет собой гетерологичный нацеливающий на естественные клетки-киллеры (NK) белок, содержащий внеклеточный домен, содержащий нацеливающий на NK-клетки домен.

4. Lentивирусный вектор по п. 1, где гетерологичный нацеливающий на лимфоциты белок представляет собой гетерологичный нацеливающий на В-клетки белок, содержащий 20 внеклеточный домен, содержащий нацеливающий на В-клетки домен.

5. Lentивирусный вектор по п. 1 или п. 2, где гетерологичный нацеливающий на лимфоциты белок представляет собой гетерологичный нацеливающий на Т-клетки белок, который специфически связывается с:

25 (а) Т-клеточным маркером, выбранным из CD3, CD28, CD80, 4-1BB, AhR, CD3, CD2, CD7, CD4, CD8, CD25, CD44, CD45RA, CD47, CD62L, CD69, CD94, CD95, CD127, CD161, CD183 (CXCR3), CD184 (CXCR4), CD185 (CXCR5), CD193 (CCR3), CD194 (CCR4), CD195 (CCR5), CD196 (CCR6), CD197 (CCR7), CCR10, PD-1, TCRa/b, CD5, CD27, CD45RO, CD45RB, CD57, CD103, CD122, P2RX7, TIGIT, LAG-3, TIM-3 и IL6ST, или любой их комбинации.

30 (b)  $\gamma\delta$ -Т-клеточным маркером, выбранным из  $\gamma\delta$ -TCR, Vdelta1, Vdelta2 и NKG2D (KLRK1, CD314);

(с) NK-Т-клеточным маркером, выбранным из инвариантного TCR (Va24-Ja18), CD185 (CXCR5), CXCR6 и IL-21R, или любой их комбинации; или

35 (d) клеточным маркером MAIT, выбранным из Va7.2, Ja33, CXCR6, IL-18R, KLRB1 (CD161) и VLA4 (альфа4бета1-интегрин), или любой их комбинации.

6. Lentiviral vector по п. 1, 2 или п. 5, где гетерологичный нацеливающий на лимфоциты белок представляет собой гетерологичный нацеливающий на Т-клетки белок, содержащий внеклеточный домен, содержащий нацеливающий на Т-клетки домен, который специфически связывается с белком CD3 или белком CD28.
- 5 7. Lentiviral vector по п. 1 или п. 3, где гетерологичный нацеливающий на лимфоциты белок представляет собой гетерологичный нацеливающий на NK-клетки белок, который специфически связывается с NK-клеточным маркером, выбранным из белков CD56, NKp46, CD16, KIR, NKG2 (например, NKG2D (KLRK1, CD314)), KLRB1 (CD161), KLRD1 (cd94), IL2Rb (CD122), IL-21R, SLAMF6 (CD352), SLAMF7 (CD319) и IL-18R, или
- 10 любой их комбинации.
8. Lentiviral vector по п. 1 или п. 4, где гетерологичный нацеливающий на лимфоциты белок представляет собой нацеливающий на В-клетки белок, который специфически связывается с В-клеточным маркером, выбранным из CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD38, CD40, CD72, CD32b, CD268, CD269, CD267, CD86, CD80, CD52,
- 15 CD138, CD27, CD28, CD23, CD84, CD257, CD270, CD37, CD74 и CD269, или любой их комбинации.
9. Lentiviral vector по любому из пп. 1, 2, 5 и 6, где нацеливающий белок включает белок CD80, содержащий внеклеточный домен, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%,
- 20 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 6.
10. Lentiviral vector по любому из пп. 1, 2, 5, 6 и 9, где нацеливающий белок включает белок CD80, содержащий трансмембранный и внутриклеточный домен, которые на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуются идентичностью с SEQ ID NO: 8
- 25 11. Lentiviral vector по п. 1, 2, 5, 6, 9 или п. 10, отличающийся тем, что нацеливающий белок включает белок CD80, содержащий SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 2 без сигнального пептида SEQ ID NO: 4.
12. Lentiviral vector по любому из пп. 1, 2, 5 и 6, где нацеливающий белок включает scFv к CD3, имеющий вариабельную область легкой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%,
- 30 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 14, и вариабельную область тяжелой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 18.
- 35 13. Lentiviral vector по п. 12, где нацеливающий белок включает нацеливающий на

CD3 белок, содержащий: (i) SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 10 без сигнального пептида SEQ ID NO: 12; или (ii) SEQ ID NO: 117 или SEQ ID NO: 117 без сигнального пептида SEQ ID NO: 12.

5 14. Lentivirusный вектор по любому из предыдущих пунктов, где нацеливающий белок, экспрессируемый в клетке-хозяине, содержит сигнальную последовательность.

15. Lentivirusный вектор по любому из предыдущих пунктов, где зрелый нацеливающий белок не содержит сигнальной последовательности.

16. Lentivirusный вектор по любому из пп. 1-14, где зрелый нацеливающий белок содержит по меньшей мере одну аминокислоту из сигнальной последовательности.

10 17. Lentivirusный вектор по любому из предыдущих пунктов, где мутантный оболочечный белок VSV-G содержит мутацию, выбранную из одной или более из:

мутации в H8, N9, Q10, K47, K50, A51, S183, S179, N180, I182, M184, Y209, I347, T350, T352, E353 и R354;

15 вставки TT между N9 и Q10, вставки GGS между H8 и N9, вставки GGS между N9 и Q10, вставки TT между N208 и Y209, вставки GGS между P46 и K47 и вставки GGS между N208 и Y209; и

делеции остатков 1-8.

18. Lentivirusный вектор по любому из предыдущих пунктов, где мутантный оболочечный белок VSV-G содержит мутацию, выбранную из двух или более из:

20 мутации в H8, N9, Q10, K47, K50, A51, S183, S179, N180, I182, M184, Y209, I347, T350, T352, E353 и R354;

вставки TT между N9 и Q10, вставки GGS между H8 и N9, вставки GGS между N9 и Q10, вставки TT между N208 и Y209, вставки GGS между P46 и K47 и вставки GGS между N208 и Y209; и

25 делеции остатков 1-8.

19. Lentivirusный вектор по любому из предыдущих пунктов, где мутантный оболочечный белок VSV-G содержит мутацию, выбранную из одной или более из H8A, N9A, Q10A, K47A, K47Q, N180A, I182A, Y209A, T352A, T352W, E353A, R354A и R354Q.

30 20. Lentivirusный вектор по любому из предыдущих пунктов, где мутантный оболочечный белок VSV-G содержит мутацию, выбранную из одной или нескольких из H8A, K47A, K47Q, Y209A, R354A и R354Q.

21. Lentivirusный вектор по любому из предыдущих пунктов, где мутантный оболочечный белок VSV-G содержит:

(a) мутацию K47 и мутацию R354;

35 (b) мутацию N180, мутацию I182, мутацию T352 и мутацию E353;

- (c) мутацию T352 и мутацию E353;
- (d) мутацию N9, мутацию Q10 и мутацию N180; или
- (e) вставку GGS между H8 и N9 и вставку GGS между N9 и Q10;
- (f) вставку TT между N9 и Q10; или
- 5 (g) вставку GGS между P46 и K47.
22. Lentivirusный вектор по п. 21, где мутантный оболочечный белок VSV-G содержит:
- (a) мутацию K47Q и мутацию R354A;
- (b) мутацию N180A, мутацию I182A, мутацию T352A и мутацию E353A;
- (c) мутацию T352W и мутацию a E353A; или
- 10 (d) мутацию N9A, мутацию Q10A и мутацию N180A.
23. Lentivirusный вектор по любому из предыдущих пунктов, где мутантный оболочечный белок VSV-G содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 74, 93, 95, 97, 99 и 103.
24. Lentivirusный вектор по любому из предыдущих пунктов, где гетерологичный
- 15 трансген кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный домен, содержащий связывающий домен, который специфически связывается с целевой молекулой; внутриклеточный сигнальный домен, при этом внутриклеточный сигнальный домен содержит мотив активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM) и, необязательно, костимулирующий сигнальный домен; и трансмембранный домен,
- 20 соединяющий внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен.
25. Lentivirusный вектор по п. 24, где CAR, кодируемый трансгеном, содержит:
- (a) связывающий домен, который специфически связывает одно или несколько из CD19, BCMA, рецептора альфа-фолата, 5T4, интегрина Ab, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD20, CD22, CD23, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD52, CD70, CD79a, CD79b,
- 25 CD80, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EpCAM, FAP, фетального AchR, FLT3, Fra, GD2, GD3, глипикана-3 (GPC3), HLA-A1 + MAGE1, HLA-A2 + MAGE1, HLA-A3 + MAGE1, HLA-A1 + NY-ESO-1, HLA-A2 + NY-ESO-1, HLA-A3 + NY-ESO-1, HLADR, IL-11Ralpha, IL-13 Ralpha2, Lambda, Lewis-Y, Кappa, мезотелина, Muc1, Muc16, NCAM, лигандов NKG2d, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA,
- 30 ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEM, VEGFR2, BAFF-R, клаудина 18.2, CD86, FcRL5, GPRC5 и TACI;
- (b) трансмембранный домен, выбранный из трансмембранного домена CD28, CD2, CD4, CD8a, CD5, CD3ε, CD3δ, CD3ζ, CD9, CD16, CD22, CD25, CD27, CD33, CD37, CD40, CD45, CD64, CD79A, CD79B, CD80, CD86, CD95 (Fas), CD134 (OX40), CD137 (4-1BB),
- 35 CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD154 (CD40L), CD200R, CD223 (LAG3), CD270



(HVEM), CD272 (BTLA), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), CD279 (PD-1), CD300, CD357 (GITR), A2aR, DAP10, FcR $\alpha$ , FcR $\beta$ , FcR $\gamma$ , Fyn, GAL9, KIR, Lck, LAT, LRP, NKG2D, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, PTCH2, ROR2, Ryk, Slp76, SIRP $\alpha$ , pT $\alpha$ , TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TIM3, TRIM, LPA5 и Zap70;

5 (c) внутриклеточный сигнальный домен, выбранный из домена CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ , CD5, CD22, CD79a, CD278 (ICOS), DAP10, DAP12, FcR $\gamma$  и CD66d;

(d) костимулирующий домен, выбранный из одного или нескольких доменов CD27, CD28, CD40L, GITR, NKG2C, CARD1, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX-40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD226,  
10 CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, LFA-1, LIGHT, NKG2C, NKD2C, SLP76, TRIM и ZAP70; и

(e) необязательно, внеклеточный несигнальный линкерный домен между связывающим доменом и трансмембранным доменом, где несигнальный линкерный домен выбран из:

15 (i) шарнирной области иммуноглобулина, выбранной из шарнирной области дикого типа или модифицированного IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgD;

(ii) шарнирной области, выбранной из шарнирной области дикого типа или модифицированного CD8a, CD4, CD28 и CD7;

(iii) всего или части домена Fc, выбранного из одного или нескольких из  
20 домена CH1, домена CH2 и домена CH3; и

(iv) области стебля С-лектина типа II, происходящего из области стебля CD23, CD69, CD72, CD94, NKG2A и NKG2D.

26. Lentивирусный вектор по любому из п. 24 или п. 25, где CAR, кодируемый трансгеном, представляет собой CAR к CD19, содержащий:

25 связывающий домен, содержащий scFv к CD19, содержащий вариабельную область легкой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 46, и вариабельную область тяжелой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%,  
30 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 50;

шарнир CD8a и трансмембранный домен, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 52;

эффекторный домен CD3 $\zeta$ , который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%,  
35 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется

идентичностью с SEQ ID NO: 56; и

костимулирующий домен 4-1BB, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 54.

5 27. Lentivirusный вектор по п. 26, где CAR, кодируемый трансгеном, содержит SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 42 без сигнального пептида SEQ ID NO: 44.

28. Lentivirusный вектор по любому из п. 24 или п. 25, где CAR, кодируемый трансгеном, представляет собой CAR к BCMA, содержащий:

связывающий домен, содержащий scFv к BCMA, содержащий переменную область легкой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 10 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 62, и переменную область тяжелой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 66;

15 шарнир CD8a и трансмембранный домен, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 52;

эффекторный домен CD3 $\zeta$ , который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется

20 идентичностью с SEQ ID NO: 122; и

костимулирующий домен 4-1BB, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 54.

29. Lentivirusный вектор по п. 26, где CAR, кодируемый трансгеном, содержит SEQ ID 25 NO: 58 или SEQ ID NO: 58 без сигнального пептида SEQ ID NO: 60.

30. Способ получения нацеленного на лимфоциты лентивирусного вектора по любому из предыдущих пунктов, при этом способ включает:

(a) трансфекцию клетки-производителя плазмидой с GagPol, плазмидой с Rev, плазмидой с трансгеном и плазмидой с env VSV-G, при этом:

30 (i) плазида с GagPol содержит один или несколько полинуклеотидов, кодирующих лентивирусный ген gag и лентивирусный ген pol, и способна экспрессировать лентивирусный полипротеин Gag и лентивирусный полипротеин Pol в клетке-производителе;

(ii) плазида с Rev содержит полинуклеотид, кодирующий лентивирусный 35 ген rev, и способна экспрессировать лентивирусный белок Rev в клетке-производителе;

(iii) трансгенная плазида содержит кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, кодирующий CAR; и

(iv) плазида с env VSV-G содержит кассету тандемной экспрессии, при этом кассета тандемной экспрессии содержит полинуклеотид, кодирующий мутантный оболочечный белок VSV-G, и полинуклеотид, кодирующий нацеливающий на лимфоциты белок, и плазида с env VSV-G способна экспрессировать мутантный оболочечный белок VSV-G и нацеливающий на лимфоциты белок в клетке-производителе;

(b) культивирование клетки-производителя в культуральной среде; и

(c) сбор лентивирусного вектора из культуральной среды.

31. Способ получения нацеленного на лимфоциты лентивирусного вектора по любому из пп. 1-29, при этом способ включает:

(a) трансфекцию клетки-производителя плазмидой с GagPol, плазмидой с Rev, плазмидой с трансгеном и плазмидой с env VSV-G, при этом:

(i) плазида с GagPol содержит кассету тандемной экспрессии, которая кодирует предшественник полипротеина Gag и предшественник полипротеина Pol, а также нацеливающий на лимфоциты белок, и плазида с GagPol способна экспрессировать лентивирусный полипротеин Gag, лентивирусный полипротеин Pol и нацеливающий на лимфоциты белок в клетке-производителе;

(ii) плазида с Rev содержит полинуклеотид, кодирующий лентивирусный ген rev, и способна экспрессировать лентивирусный белок Rev в клетке-производителе;

(iii) трансгенная плазида содержит кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, кодирующий CAR; и

(iv) плазида с env VSV-G содержит полинуклеотид, кодирующий мутантный оболочечный белок VSV-G, и плазида с env VSV-G способна экспрессировать мутантный оболочечный белок VSV-G в клетке-производителе;

(b) культивирование клетки-производителя в культуральной среде; и

(c) сбор лентивирусного вектора из культуральной среды.

32. Способ получения нацеленного на лимфоциты лентивирусного вектора по любому из пп. 1-29, при этом способ включает:

(a) трансфекцию клетки-производителя плазмидой с GagPol, плазмидой с Rev, плазмидой с трансгеном и плазмидой с env VSV-G, при этом:

(i) плазида с GagPol содержит один или несколько полинуклеотидов, кодирующих лентивирусный ген gag и лентивирусный ген pol, и способна экспрессировать лентивирусный полипротеин Gag и лентивирусный полипротеин

Pol в клетке-продуcente;

(ii) плазида с Rev содержит кассету тандемной экспрессии, при этом кассета тандемной экспрессии содержит полинуклеотид, кодирующий лентивирусный ген rev, и полинуклеотид, кодирующий нацеливающий на лимфоциты белок, и плазида с Rev способна экспрессировать лентивирусный белок Rev и нацеливающий на лимфоциты белок в клетке-продуcente;

(iii) трансгенная плазида содержит кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, кодирующий CAR; и

(iv) плазида с env VSV-G содержит полинуклеотид, кодирующий мутантный оболочечный белок VSV-G, и плазида с env VSV-G способна экспрессировать мутантный оболочечный белок VSV-G в клетке-продуcente;

(b) культивирование клетки-продуцента в культуральной среде; и

(c) сбор лентивирусного вектора из культуральной среды.

33. Способ получения нацеленного на лимфоциты лентивирусного вектора по любому из пп. 1-29, при этом способ включает:

(a) трансфекцию клетки-продуцента плазмидой с GagPol, плазмидой с Rev, плазмидой с трансгеном, плазмидой с env VSV-G и плазмидой с нацеливающим на лимфоциты белком;

(i) плазида с GagPol содержит один или несколько полинуклеотидов, кодирующих лентивирусный ген gag и лентивирусный ген pol, и способна экспрессировать лентивирусный полипротеин Gag и лентивирусный полипротеин Pol в клетке-продуcente;

(ii) плазида с Rev содержит полинуклеотид, кодирующий лентивирусный ген rev, и способна экспрессировать лентивирусный белок Rev в клетке-продуcente;

(iii) трансгенная плазида содержит кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, кодирующий CAR; и

(iv) плазида с env VSV-G содержит полинуклеотид, кодирующий мутантный оболочечный белок VSV-G, и способна экспрессировать мутантный оболочечный белок VSV-G в клетке-продуcente; и

(v) плазида на основе нацеливающего на лимфоциты белка содержит полинуклеотид, кодирующий нацеливающий на лимфоциты белок, и способна экспрессировать нацеливающий на лимфоциты белок в клетке-продуcente;

(b) культивирование клетки-продуцента в культуральной среде; и

(c) сбор лентивирусного вектора из культуральной среды.

34. Способ по любому из пп. 30-33, где нацеливающий на лимфоциты белок, кодируемый

плазмидой с нацеливающим на лимфоциты белком, представляет собой нацеливающий на Т-клетки белок.

35. Способ по любому из пп. 30-33, где нацеливающий на лимфоциты белок, кодируемый плазмидой с нацеливающим на лимфоциты белком, представляет собой нацеливающий на 5 НК-клетки белок.

36. Способ по любому из пп. 30-33, где нацеливающий на лимфоциты белок, кодируемый плазмидой с нацеливающим на лимфоциты белком, представляет собой нацеливающий на В-клетки белок.

37. Способ по любому из пп. 30-33 и 34, где нацеливающий на лимфоциты белок, 10 кодируемый плазмидой с нацеливающим на лимфоциты белком, представляет собой нацеливающий на Т-клетки белок, который специфически связывается с:

(a) Т-клеточным маркером, выбранным из CD3, CD28, CD80, 4-1BB, AhR, CD3, CD2, CD7, CD4, CD8, CD25, CD44, CD45RA, CD47, CD62L, CD69, CD94, CD95, CD127, CD161, CD183 (CXCR3), CD184 (CXCR4), CD185 (CXCR5), CD193 (CCR3), CD194 (CCR4), CD195 15 (CCR5), CD196 (CCR6), CD197 (CCR7), CCR10, PD-1, TCRa/b, CD5, CD27, CD45RO, CD45RB, CD57, CD103, CD122, P2RX7, TIGIT, LAG-3, TIM-3 и IL6ST, или любой их комбинации.

(b)  $\gamma\delta$ -Т-клеточным маркером, выбранным из  $\gamma\delta$  TCR, Vdelta1, Vdelta2 и NKG2D (KLRK1, CD314 или любой их комбинации);

(c) НК-Т-клеточным маркером, выбранным из инвариантного TCR (Va24-Ja18), 20 CD185 (CXCR5), CXCR6 и IL-21R, или любой их комбинации; или

(d) клеточным маркером MAIT, выбранным из Va7.2, Ja33, CXCR6, IL-18R, KLRB1 (CD161) и VLA4 (альфа4бета1-интегрин), или любой их комбинации.

38. Способ по п. 37, где нацеливающий белок включает белок CD80, содержащий 25 внеклеточный домен, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 6.

39. Способ по любому из пп. 37 и 38, где нацеливающий белок включает белок CD80, содержащий трансмембранный и внутриклеточный домен, которые на по меньшей мере 30 приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуются идентичностью с SEQ ID NO: 8

40. Способ по любому из пп 37, 38 и 39, где нацеливающий белок включает белок CD80, содержащий SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 2 без сигнального пептида SEQ ID NO: 4.

41. Способ по любому из пп. 30-34 и 37, где нацеливающий белок содержит: (i) scFv к CD3, 35 имеющий переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере приблизительно

- 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 14, и варибельную область тяжелой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO:
- 5 18; или (ii) scFv к CD3, имеющий варибельную область легкой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 115, и варибельную область тяжелой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100%
- 10 характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 113.
42. Способ по любому из пп. 30-34, 37 и 41, где нацеливающий белок включает нацеливающий на CD3 белок, содержащий: (i) SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 10 без сигнального пептида SEQ ID NO: 12; или (ii) SEQ ID NO: 117 или SEQ ID NO: 117 без сигнального пептида SEQ ID NO: 12.
- 15 43. Способ по любому из пп. 30-33 и 35, где нацеливающий на лимфоциты белок, кодируемый плазмидой с нацеливающей на лимфоциты белком, представляет собой нацеливающий на NK-клетки белок, который специфически связывается с NK-клеточным маркером, выбранным из CD56, NKp46, CD16, KIR, белков NKG2 (например, NKG2D (KLRK1, CD314)), KLRB1 (CD161), KLRD1 (cd94), IL2Rb (CD122), IL-21R, SLAMF6
- 20 (CD352), SLAMF7 (CD319) и IL-18R, или любой их комбинации.
44. Способ по любому из пп. 30-33 и 36, где нацеливающий на лимфоциты белок, кодируемый плазмидой с нацеливающим на лимфоциты белком, представляет собой нацеливающий на В-клетки белок, который специфически связывается с В-клеточным маркером, выбранным из CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD38, CD40, CD72, CD32b,
- 25 CD268, CD269, CD267, CD86, CD80, CD52, CD138, CD27, CD28, CD23, CD84, CD257, CD270, CD37, CD74 и CD269, или любой их комбинации.
45. Способ по любому из пп. 30-44, где мутантный оболочечный белок VSV-G, кодируемый плазмидой с env VSV-G, содержит мутацию, выбранную из одной или более из:
- 30 мутации в H8, N9, Q10, K47, K50, A51, S183, S179, N180, I182, M184, Y209, I347, T350, T352, E353 и R354;
- вставки TT между N9 и Q10, вставки GGS между H8 и N9, вставки GGS между N9 и Q10, вставки TT между N208 и Y209, вставки GGS между P46 и K47 и вставки GGS между N208 и Y209; и
- делеции остатков 1-8.
- 35 46. Способ по любому из пп. 30-45, где мутантный оболочечный белок VSV-G, кодируемый

плазмидой с env VSV-G, содержит мутацию, выбранную из двух или более из:  
мутации в H8, N9, Q10, K47, K50, A51, S183, S179, N180, I182, M184, Y209, I347, T350,  
T352, E353 и R354;

5 вставки TT между N9 и Q10, вставки GGS между H8 и N9, вставки GGS между N9 и  
Q10, вставки TT между N208 и Y209, вставки GGS между P46 и K47 и вставки GGS между  
N208 и Y209; и

делеции остатков 1-8.

10 47. Способ по любому из пп. 30-46, где мутантный оболочечный белок VSV-G содержит  
мутацию, выбранную из одной или более из H8A, N9A, Q10A, K47A, K47Q, N180A, I182A,  
Y209A, T352A, T352W, E353A, R354A и R354Q.

48. Способ по любому из пп. 30-47, где мутантный оболочечный белок VSV-G, кодируемый  
плазмидой с env VSV-G, содержит мутацию, выбранную из одной или более из H8A, K47A,  
K47Q, Y209A, R354A и R354Q.

15 49. Способ по любому из пп. 30-48, где мутантный оболочечный белок VSV-G содержит:

(a) мутацию K47 и мутацию R354;

(b) мутацию N180, мутацию I182, мутацию T352 и мутацию E353;

(c) мутацию T352 и мутацию E353;

(d) мутацию N9, мутацию Q10 и мутацию N180; или

(e) вставку GGS между H8 и N9 и вставку GGS между N9 и Q10;

20 (f) вставку TT между N9 и Q10; или

(g) вставку GGS между P46 и K47.

50. Способ по п. 49, где мутантный оболочечный белок VSV-G содержит:

(a) мутацию K47Q и мутацию R354A;

(b) мутацию N180A, мутацию I182A, мутацию T352A и мутацию E353A;

25 (c) мутацию T352W и мутацию а E353A; или

(d) мутацию N9A, мутацию Q10A и мутацию N180A.

51. Способ по любому из пп. 30-50, где мутантный оболочечный белок VSV-G содержит  
аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 74, 93, 95, 97, 99 и 103.

30 52. Способ по любому из пп. 30-51, где CAR, кодируемый плазмидой с трансгеном,  
содержит внеклеточный домен, содержащий связывающий домен, который специфически  
связывается с целевой молекулой; внутриклеточный сигнальный домен, при этом  
внутриклеточный сигнальный домен содержит мотив активации иммунорецептора на  
основе тирозина (ITAM) и, необязательно, костимулирующий сигнальный домен; и  
35 трансмембранный домен, соединяющий внеклеточный домен и внутриклеточный  
сигнальный домен.

53. Способ по любому из пп. 30-52, где CAR, кодируемый плазмидой с трансгеном, содержит:

(а) связывающий домен, который специфически связывает одно или несколько из CD19, BCMA, рецептора альфа-фолата, 5T4, интегрина Ab, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD20, CD22, CD23, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD52, CD70, CD79a, CD79b, CD80, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EpCAM, FAP, фетального AchR, FLT3, Fra, GD2, GD3, глипикана-3 (GPC3), HLA-A1 + MAGE1, HLA-A2 + MAGE1, HLA-A3 + MAGE1, HLA-A1 + NY-ESO-1, HLA-A2 + NY-ESO-1, HLA-A3 + NY-ESO-1, HLADR, IL-11Ralpha, IL-13Ralpha2, Lambda, Lewis-Y, Кappa, мезотелина, Muc1, Muc16, NCAM, лигандов NKG2d, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEM, VEGFR2, BAFF-R, клаудина 18.2, CD86, FcRL5, GPRC5 и TACI;

(b) трансмембранный домен, выбранный из трансмембранного домена CD28, CD2, CD4, CD8a, CD5, CD3e, CD3d, CD3z, CD9, CD16, CD22, CD25, CD27, CD33, CD37, CD40, CD45, CD64, CD79A, CD79B, CD80, CD86, CD95 (Fas), CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD154 (CD40L), CD200R, CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD272 (BTLA), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), CD279 (PD-1), CD300, CD357 (GITR), A2aR, DAP10, FcRa, FcRb, FcRg, Fyn, GAL9, KIR, Lck, LAT, LRP, NKG2D, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, PTCH2, ROR2, Ryk, Slp76, SIRPa, pTa, TCRa, TCRb, TIM3, TRIM, LPA5 и Zap70;

(c) внутриклеточный сигнальный домен, выбранный из домена CD3g, CD3d, CD3e, CD3z, CD5, CD22, CD79a, CD278 (ICOS), DAP10, DAP12, FcRg и CD66d;

(d) костимулирующий домен, выбранный из одного или нескольких доменов CD27, CD28, CD40L, GITR, NKG2C, CARD1, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX-40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD226, CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, LFA-1, LIGHT, NKG2C, NKD2C, SLP76, TRIM и ZAP70; и

(e) необязательно, внеклеточный несигнальный линкерный домен между связывающим доменом и трансмембранным доменом, при этом несигнальный линкерный домен выбран из:

(i) шарнирной области иммуноглобулина, выбранной из шарнирной области дикого типа или модифицированного IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgD;

(ii) шарнирной области, выбранной из шарнирной области дикого типа или модифицированного CD8a, CD4, CD28 и CD7;

(iii) всего или части домена Fc, выбранного из одного или нескольких из



домена CH1, домена CH2 и домена CH3; и

(iv) области стебля С-лектина типа II, происходящего из области стебля CD23, CD69, CD72, CD94, NKG2A и NKG2D.

54. Способ по любому из пп. 30-53, где CAR, кодируемый плазмидой с трансгеном, представляет собой CAR к CD19, содержащий:

(a) связывающий домен, содержащий scFv к CD19, содержащий переменную область легкой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 46, и переменную область тяжелой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 50;

(b) шарнир CD8a и трансмембранный домен, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 52;

(c) эффекторный домен CD3 $\zeta$ , который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 56; и

(d) костимулирующий домен 4-1BB, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 54.

55. Способ по п. 54, где CAR, кодируемый трансгеном, содержит SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 42 без сигнального пептида SEQ ID NO: 44.

56. Способ по любому из пп. 30-53, где CAR, кодируемый плазмидой с трансгеном, представляет собой CAR к VCMA, содержащий:

(a) связывающий домен, содержащий scFv к VCMA, содержащий переменную область легкой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 62, и переменную область тяжелой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 66;

(b) шарнир CD8a и трансмембранный домен, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 52;

(c) эффекторный домен CD3 $\zeta$ , который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100%

характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 122; и

(d) костимулирующий домен 4-1BB, который на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% характеризуется идентичностью с SEQ ID NO: 54.

5 57. Способ по п. 56, где CAR, кодируемый трансгеном, содержит SEQ ID NO: 58 или SEQ ID NO: 58 без сигнального пептида SEQ ID NO: 60.

58. Способ по любому из пп. 30-57, где клетку-продуцент трансдуцируют с использованием определенного соотношения плазмиды с трансгеном, плазмиды с GagPol, плазмиды с env VSV-G и плазмиды с Rev, необязательно, при этом определенное соотношение плазмиды с трансгеном, плазмиды с GagPol, плазмиды с env VSV-G и плазмиды с Rev составляет от  
10 приблизительно 1:1:1:1 до приблизительно 5:4:1:1, соответственно.

59. Способ по п. 58, где клетку-продуцент трансдуцируют с использованием определенного соотношения плазмиды с трансгеном, плазмиды с GagPol, плазмиды с env VSV-G и плазмиды с Rev, составляющего приблизительно 4:2:1:1.

15 60. Способ по п. 58, где клетку-продуцент трансдуцируют с использованием определенного соотношения плазмиды с трансгеном, плазмиды с GagPol, плазмиды с env VSV-G и плазмиды с Rev, составляющего приблизительно 3,125:3,125:2,5:1,25.

61. Способ по любому из пп. 30-60, где сбор лентивирусного вектора из культуральной среды включает центрифугирование, анионообменную хроматографию или любую их  
20 комбинацию.

62. Способ по любому из пп. 30-61, где продукт LVV, собранный из культуральной среды, имеет титр вируса от приблизительно  $1e7$  TU/мл до приблизительно  $1e12$  TU/мл в концентрированном продукте LVV.

63. Способ получения Т-клетки, экспрессирующей гетерологичный трансген, при этом  
25 способ включает:

трансдуцирование Т-клетки одним или несколькими LVV по любому из пп. 1, 2, 5, 6 и 9-29, где трансдукция Т-клетки приводит к экспрессии гетерологичного трансгена Т-клеткой.

64. Способ по п. 63, где Т-клетка представляет собой покоящуюся Т-клетку.

30 65. Способ по п. 63 или п. 64, где трансдукцию Т-клетки осуществляют *in vivo* или *ex vivo*.

66. Способ по любому из пп. 63-65, где один или несколько LVV вводят субъекту внутривенно, внутривентально, внутрипупочково, внутрикостно или интранодально.

67. Способ по любому из пп. 63-66, где трансдуцирование Т-клетки включает приведение Т-клеток цельной крови или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC),  
35 полученных от субъекта, в контакт с одним или несколькими LVV.

68. Способ по любому из пп. 63-67, где трансдукцию осуществляют без применения экзогенного стимулирующего Т-клетки средства.
69. Способ по п. 68, где экзогенное стимулирующее Т-клетки средство содержит антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело к CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент, или и то, и другое.
- 5 70. Способ получения Т-клетки, экспрессирующей CAR, при этом способ включает:  
трансдуцирование Т-клетки одним или несколькими LVV по любому из пп. 24-29, и трансдукция Т-клетки приводит к экспрессии трансгена CAR Т-клеткой.
71. Способ по п. 70, где Т-клетка представляет собой покоящуюся Т-клетку.
- 10 72. Способ по п. 70 или п. 71, где трансдукцию Т-клетки осуществляют *in vivo* или *ex vivo*.
73. Способ по любому из пп. 70-72, где один или несколько LVV вводят субъекту внутривенно, внутривентально, внутриопухолево, внутрикостно или интранодально.
74. Способ по любому из пп. 70-72, где трансдуцирование Т-клетки включает приведение Т-клеток цельной крови или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC),  
15 полученных от субъекта, в контакт с одним или несколькими LVV.
75. Способ по любому из пп. 70-74, где трансдукцию осуществляют без применения экзогенного стимулирующего Т-клетки средства.
76. Способ по п. 75, где экзогенное стимулирующее Т-клетки средство содержит антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, антитело к CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент, или и то, и другое.
- 20 77. Способ получения NK-клетки, экспрессирующей гетерологичный трансген, при этом способ включает:  
трансдуцирование NK-клетки одним или несколькими LVV по любому из пп. 1, 3, 7 и 14-29, где трансдукция NK-клетки приводит к экспрессии гетерологичного трансгена NK-  
25 клеткой.
78. Способ по п. 77, где NK-клетка представляет собой покоящуюся NK-клетку.
79. Способ по п. 77 или п. 78, где трансдукцию NK-клетки осуществляют *in vivo* или *ex vivo*.
80. Способ по любому из пп. 77-79, где один или несколько LVV вводят субъекту внутривенно, внутривентально, внутриопухолево, внутрикостно или интранодально.
- 30 81. Способ по любому из пп. 77-79, где трансдуцирование NK-клетки включает приведение в контакт NK-клеток цельной крови или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), полученных от субъекта.
82. Способ по любому из пп. 77-81, где трансдукцию осуществляют без применения экзогенного стимулирующего NK-клетки средства.
- 35 83. Способ получения NK-клетки, экспрессирующей CAR, при этом способ включает:

- трансдуцирование NK-клетки одним или несколькими LVV по любому из пп. 24-29, и трансдукция NK-клетки приводит к экспрессии трансгена CAR NK-клеткой.
84. Способ по п. 83, где NK-клетка представляет собой покоящуюся NK-клетку.
85. Способ по п. 83 или п. 84, где трансдукцию NK-клетки осуществляют *in vivo* или *ex vivo*.
- 5 86. Способ по любому из пп. 83-85, где один или несколько LVV вводят субъекту внутривенно, внутрибрюшинно, внутриопухолево, внутрикостно или интранодально.
87. Способ по любому из пп. 83-85, где трансдуцирование NK-клетки включает приведение NK-клеток цельной крови или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), полученных от субъекта, в контакт с одним или несколькими LVV.
- 10 88. Способ по любому из пп. 83-87, где трансдукцию осуществляют без применения экзогенного стимулирующего NK-клетки средства.
89. Способ получения В-клетки, экспрессирующей гетерологичный трансген, при этом способ включает:
- трансдуцирование В-клетки одним или несколькими LVV по любому из пп. 1, 4, 8 и
- 15 14-29, при этом трансдукция В-клетки приводит к экспрессии гетерологичного трансгена В-клеткой.
90. Способ по п. 89, где В-клетка представляет собой покоящуюся В-клетку.
91. Способ по п. 89 или п. 90, где трансдукцию В-клетки осуществляют *in vivo* или *ex vivo*.
92. Способ по любому из пп. 89-91, где один или несколько LVV вводят субъекту
- 20 внутривенно, внутрибрюшинно, внутриопухолево, внутрикостно или интранодально.
93. Способ по любому из пп. 89-91, где трансдуцирование В-клетки включает приведение в контакт В-клеток цельной крови или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), полученных от субъекта.
94. Способ по любому из пп. 89-93, где трансдукцию осуществляют без применения
- 25 стимулирующих В-клетки средств.
95. Способ получения В-клетки, экспрессирующей CAR, при этом способ включает:
- трансдуцирование В-клетки одним или несколькими LVV по любому из пп. 24-29, и трансдукция В-клетки приводит к экспрессии трансгена CAR В-клеткой.
96. Способ по п. 95, где В-клетка представляет собой покоящуюся В-клетку.
- 30 97. Способ по п. 95 или п. 96, где трансдукцию В-клетки осуществляют *in vivo* или *ex vivo*.
98. Способ по любому из пп. 95-97, где один или несколько LVV вводят субъекту внутривенно, внутрибрюшинно, внутриопухолево, внутрикостно или интранодально.
99. Способ по любому из пп. 95-97, где трансдуцирование В-клетки включает приведение В-клеток цельной крови или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC),
- 35 полученных от субъекта, в контакт с одним или несколькими LVV.

100. Способ по любому из пп. 95-99, где трансдукцию осуществляют без применения экзогенного стимулирующего В-клетки средства.

5

10

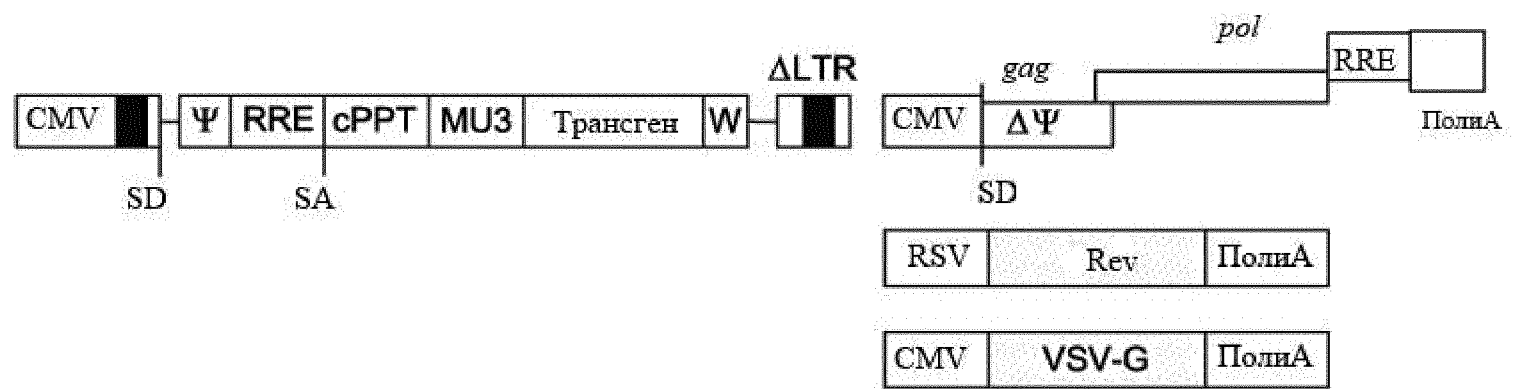
15

20

25

30

35



Фиг. 1



Фиг. 2А

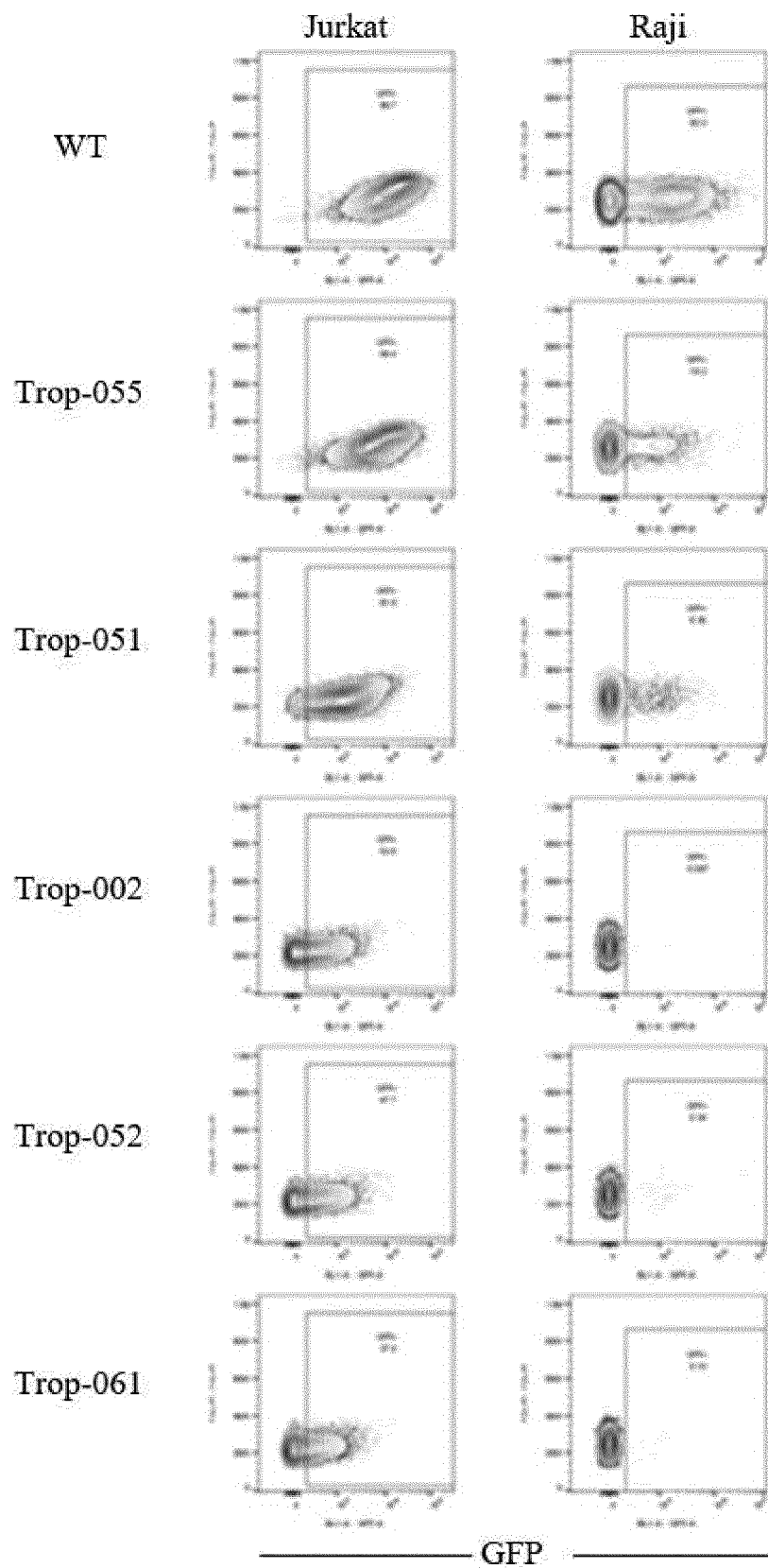


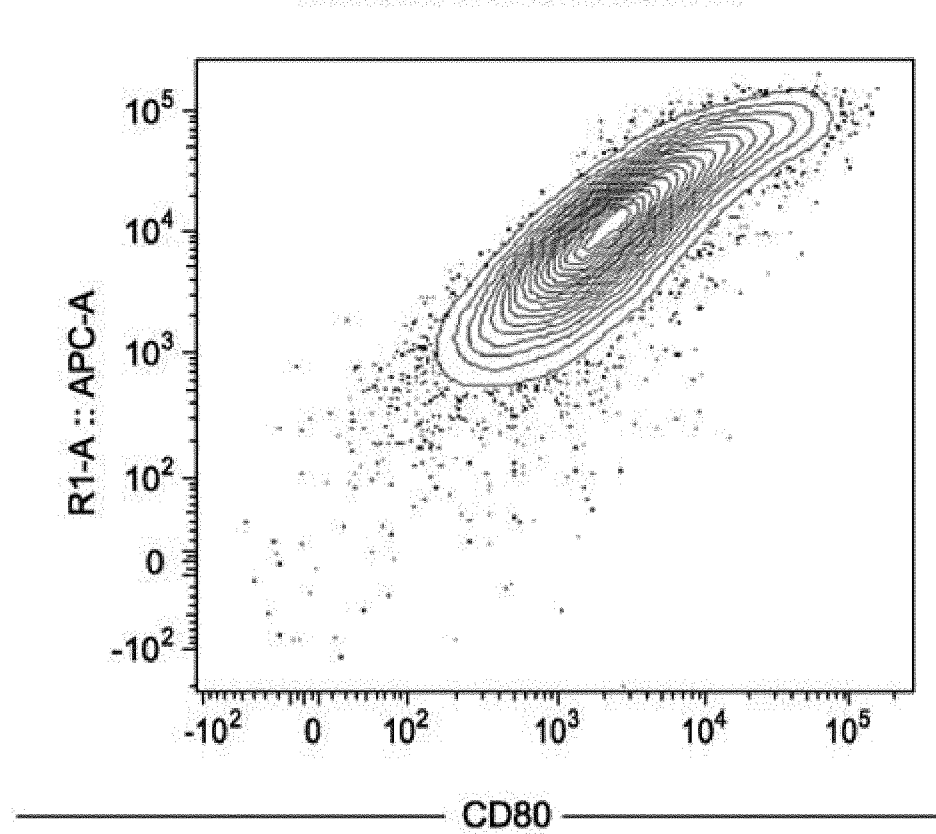
Fig. 2B



Клетки-продуценты НЕК293Т

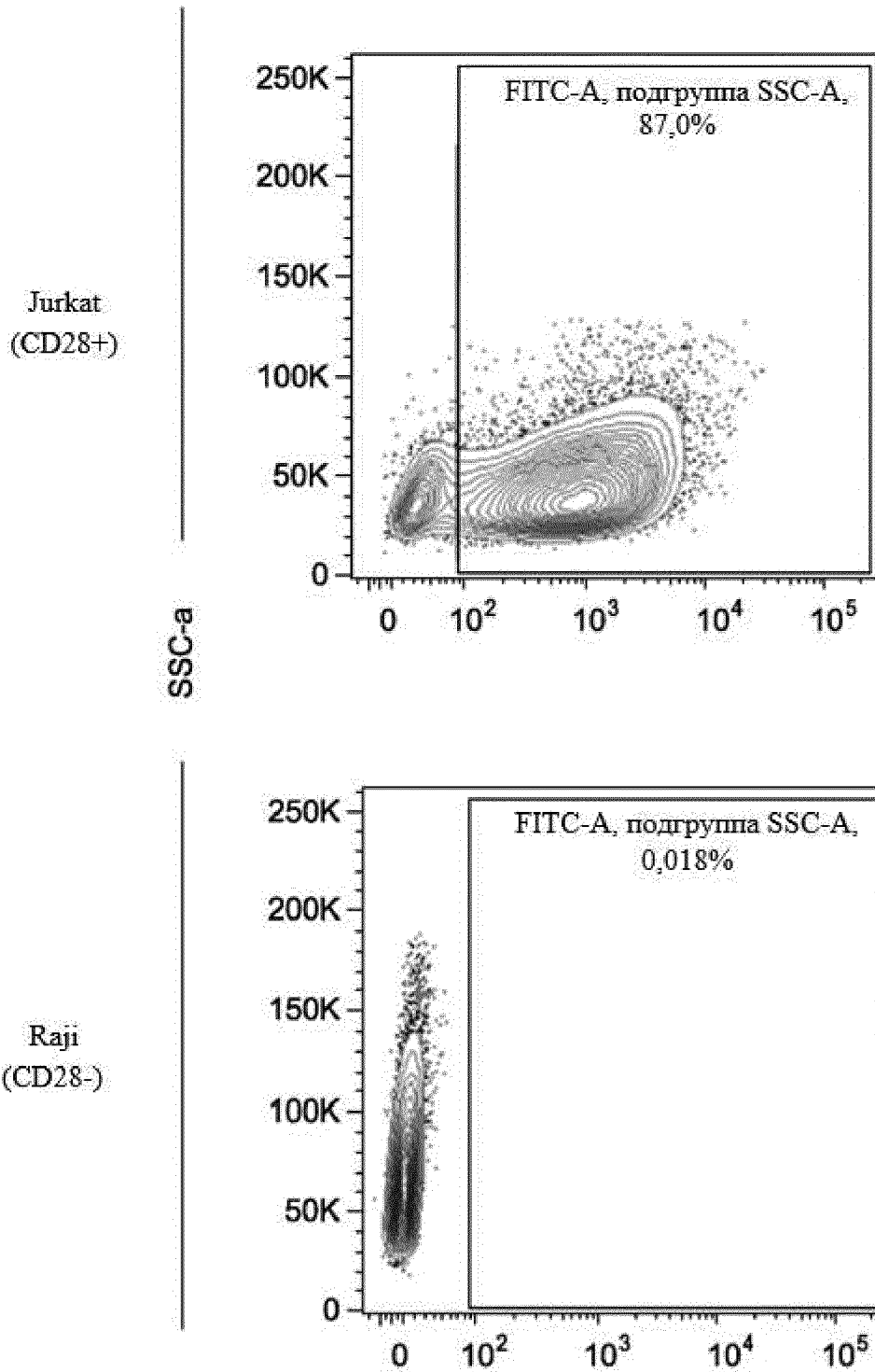
VSVG

Плазмида CD80-P2A-VSVGmut



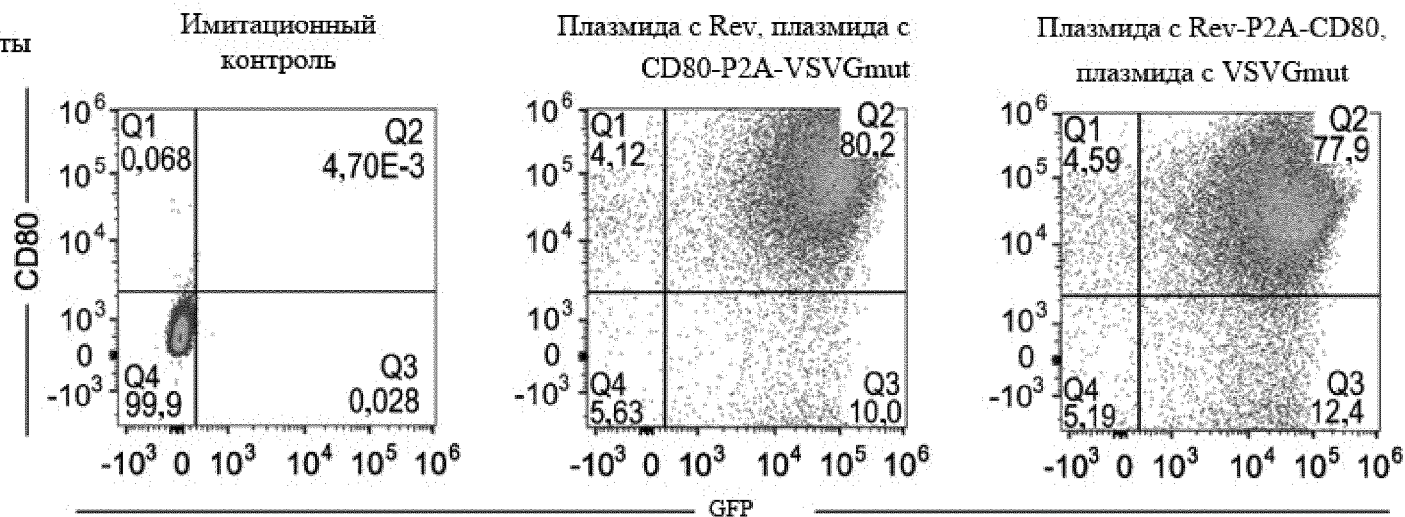
Фиг. 3А

Плазмида CD80-P2A-VSVGmut



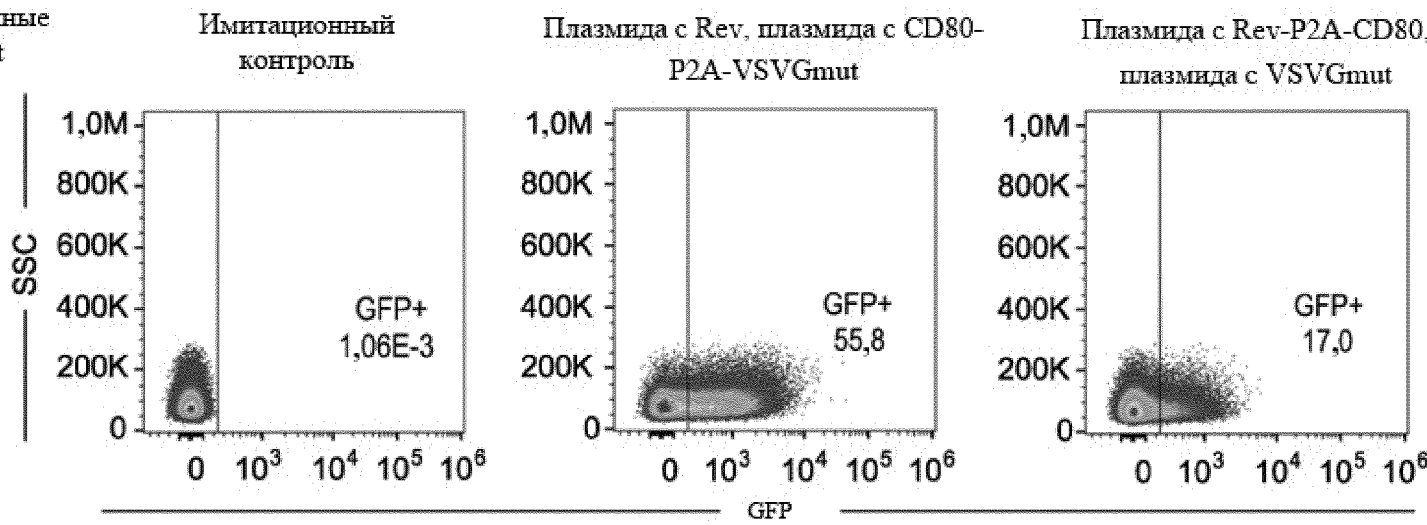
Фиг. 3В

Клетки-продуценты  
HEK293T



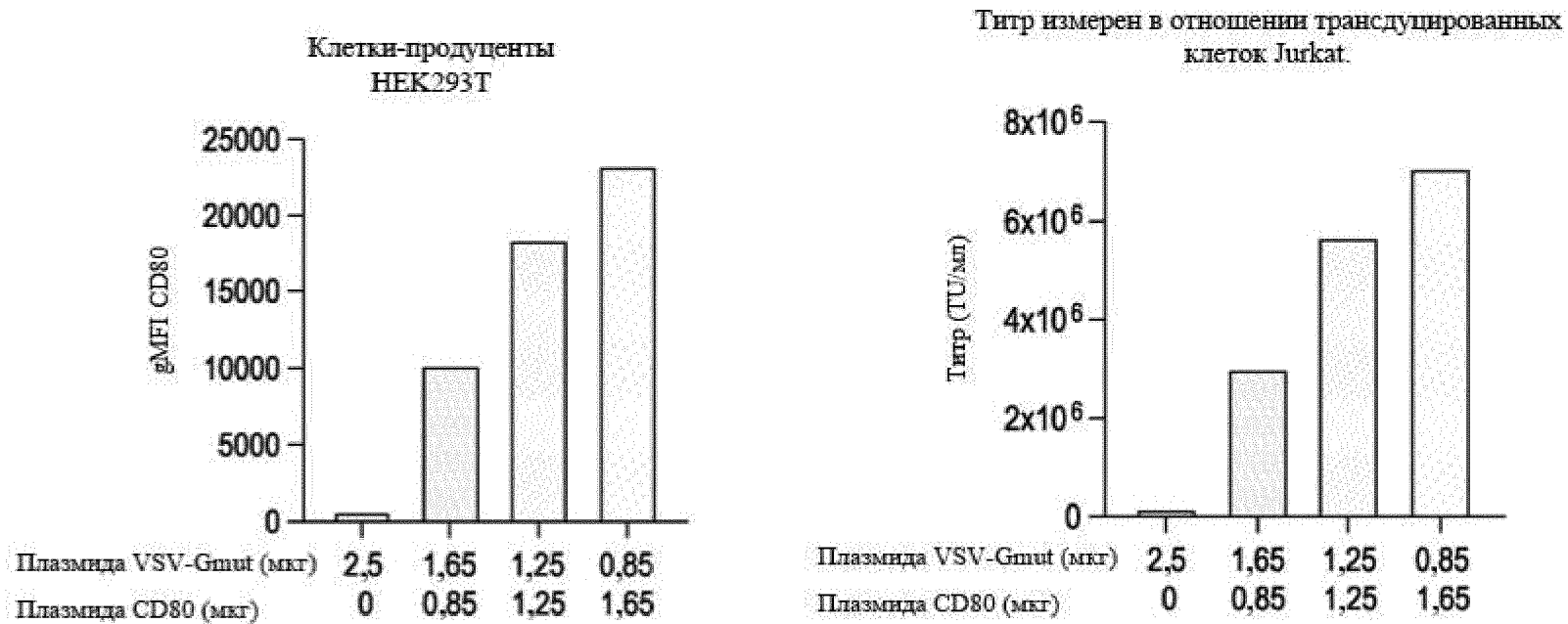
9

Трансдуцированные  
клетки Jurkat



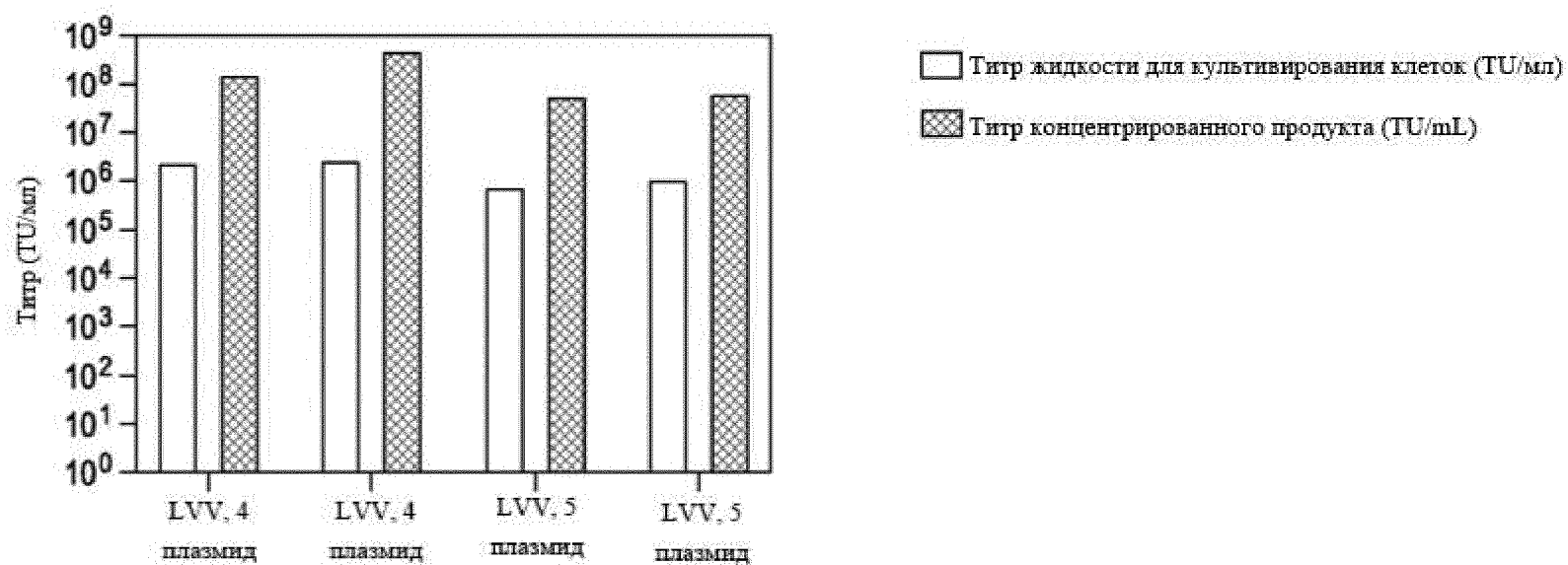
Фиг. 4

L



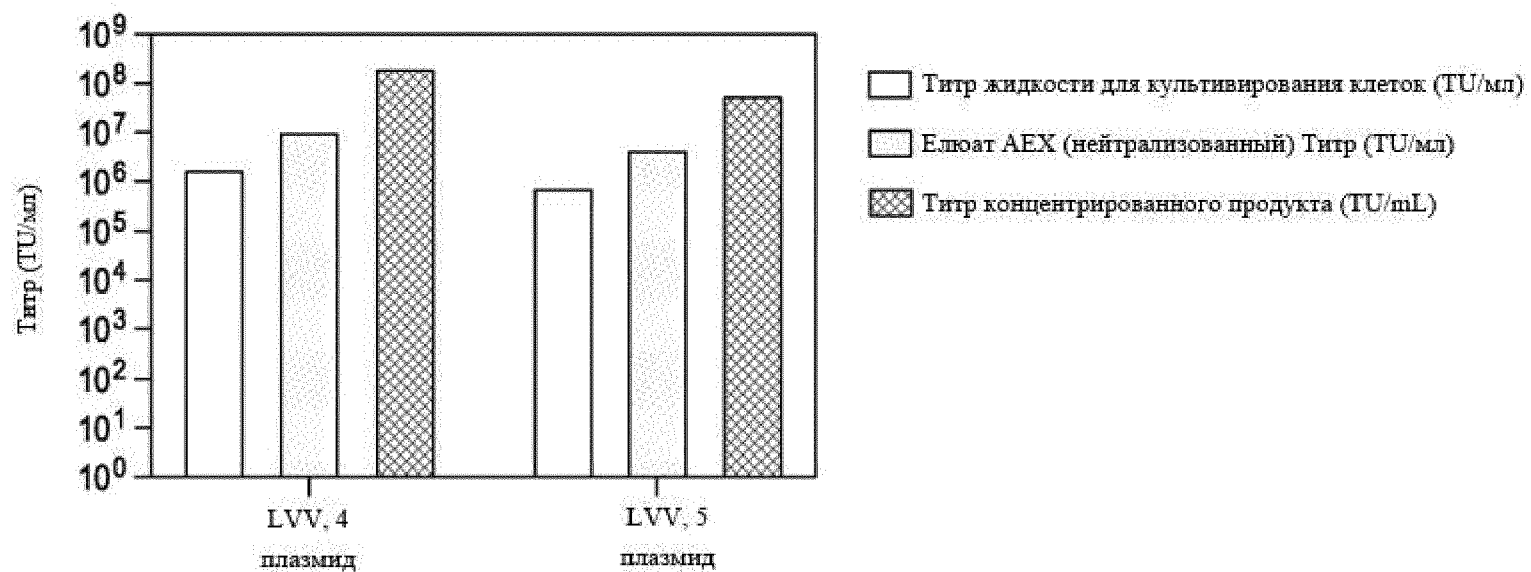
Фиг. 5

Получение перенаправленных LVV с 4 и 5  
плазмидами, прикрепляемыми с помощью  
центрифугирования



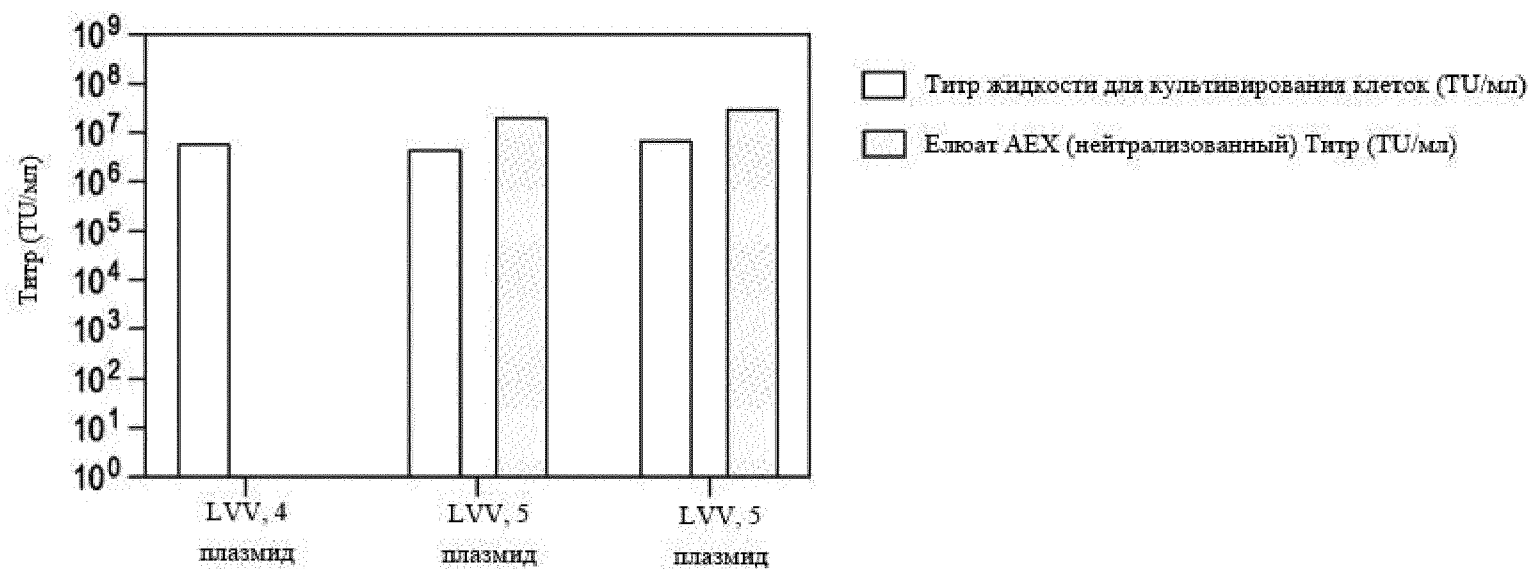
Фиг. 6А

Получение перенаправленных LVV с 4 и 5  
плазмидами, прикрепляемыми с помощью AEX и TFF

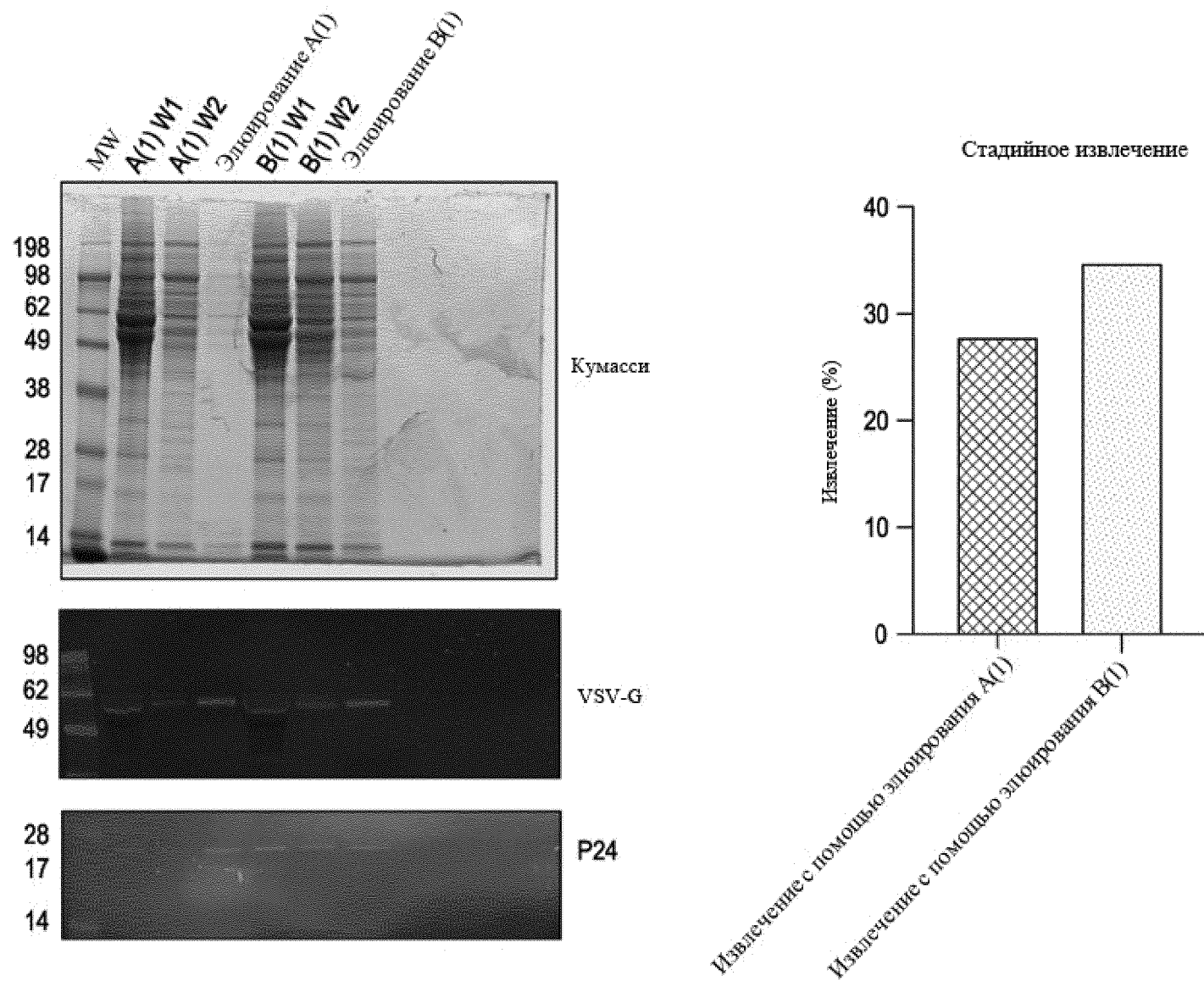


Фиг. 6B

Получение перенаправленных LVV с 4 и 5 плазмидами,  
суспендированными с помощью АЕХ

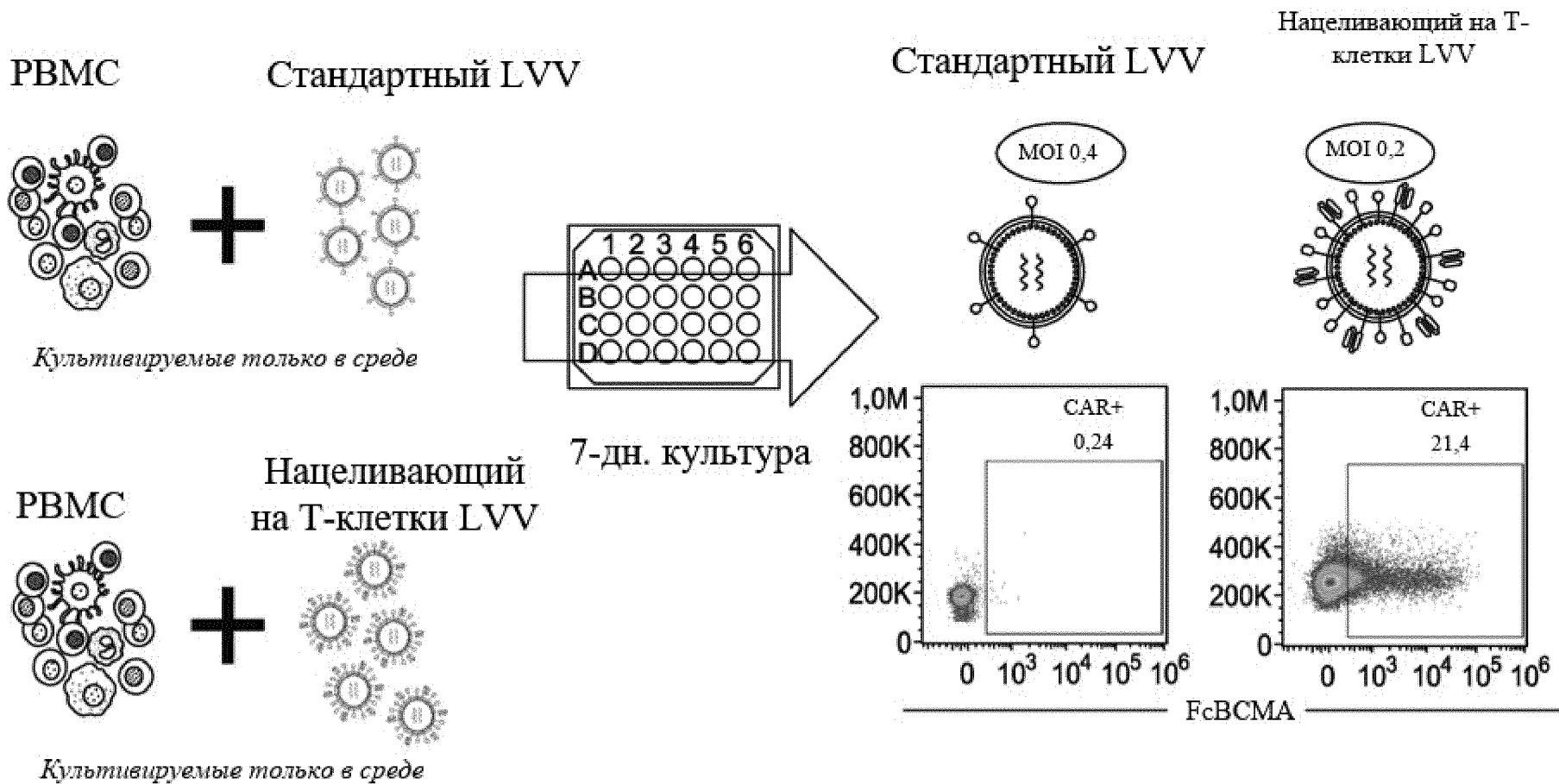


Фиг. 6С

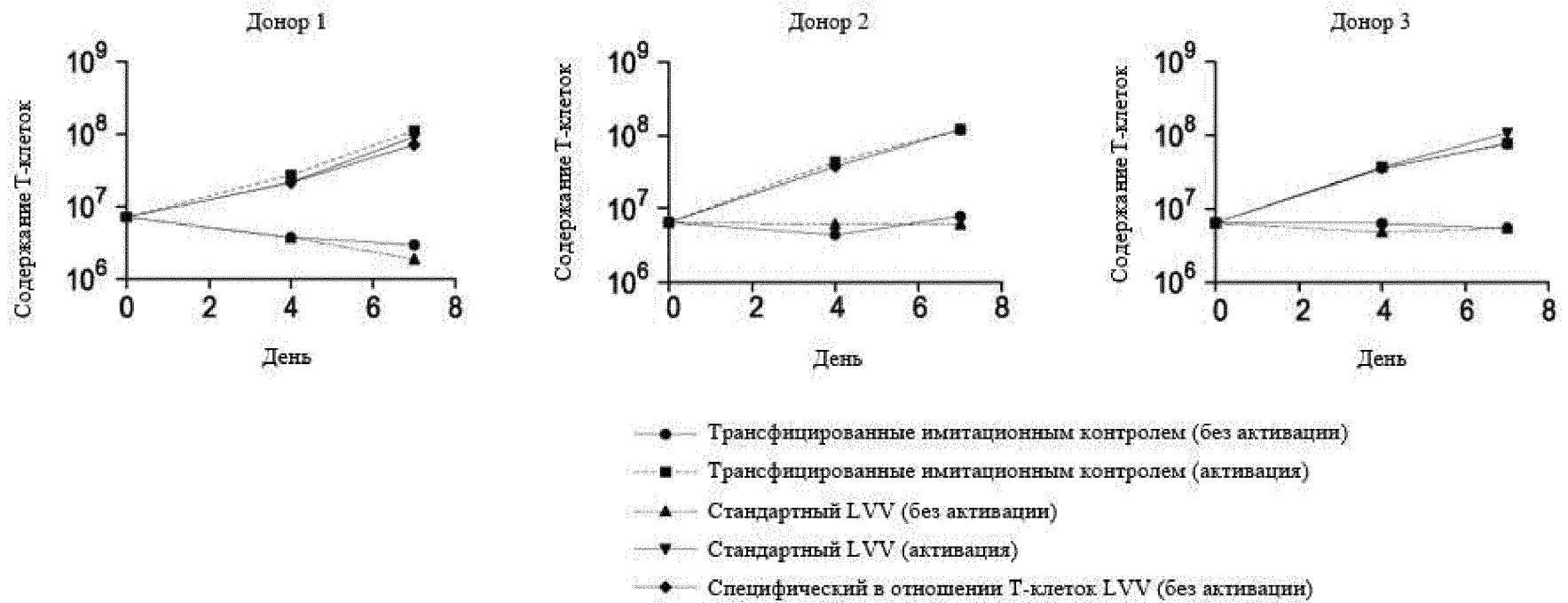


Фиг. 6D

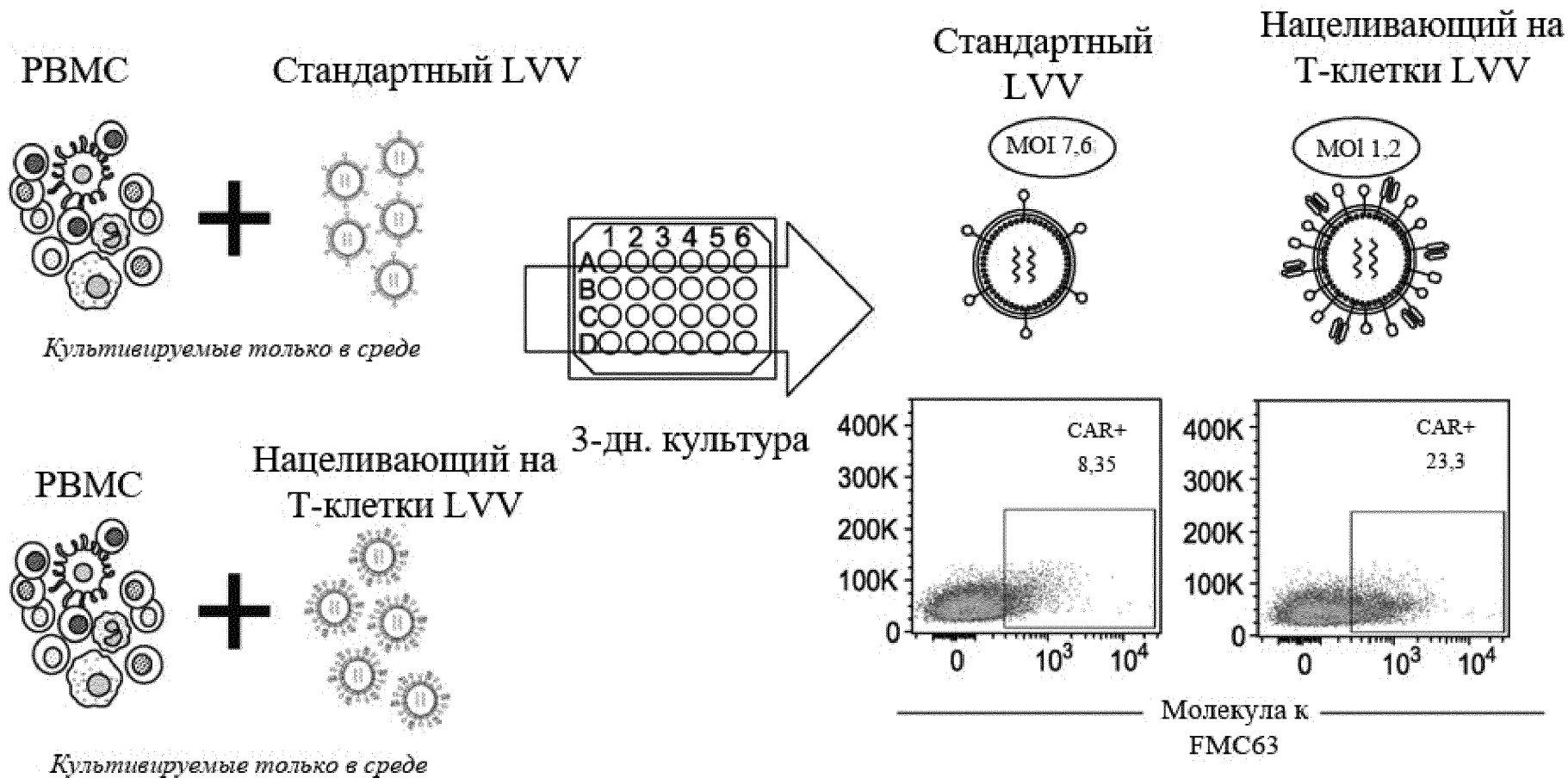




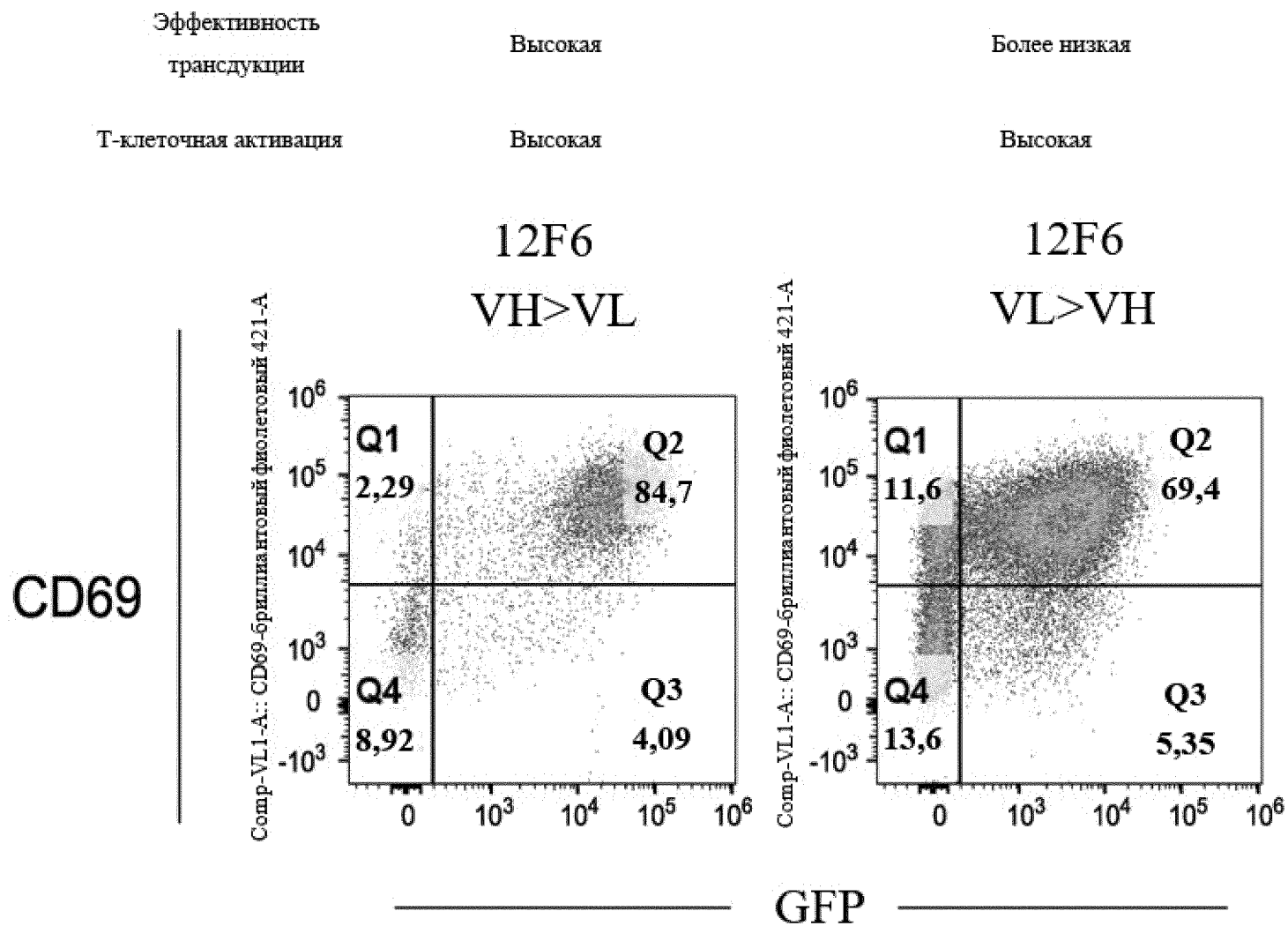
Фиг. 7



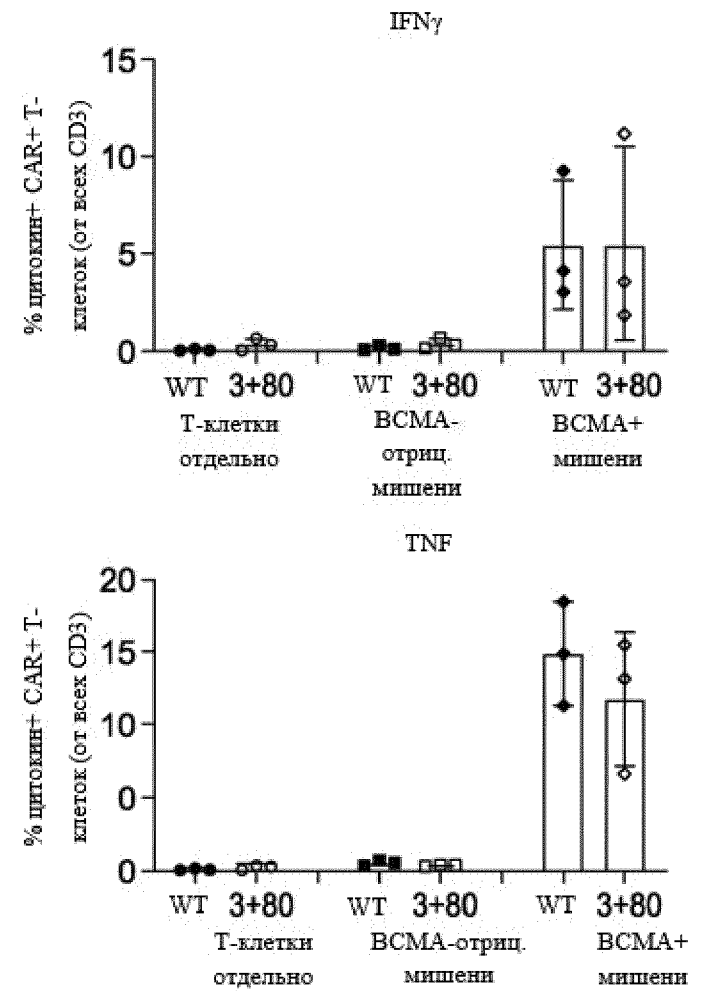
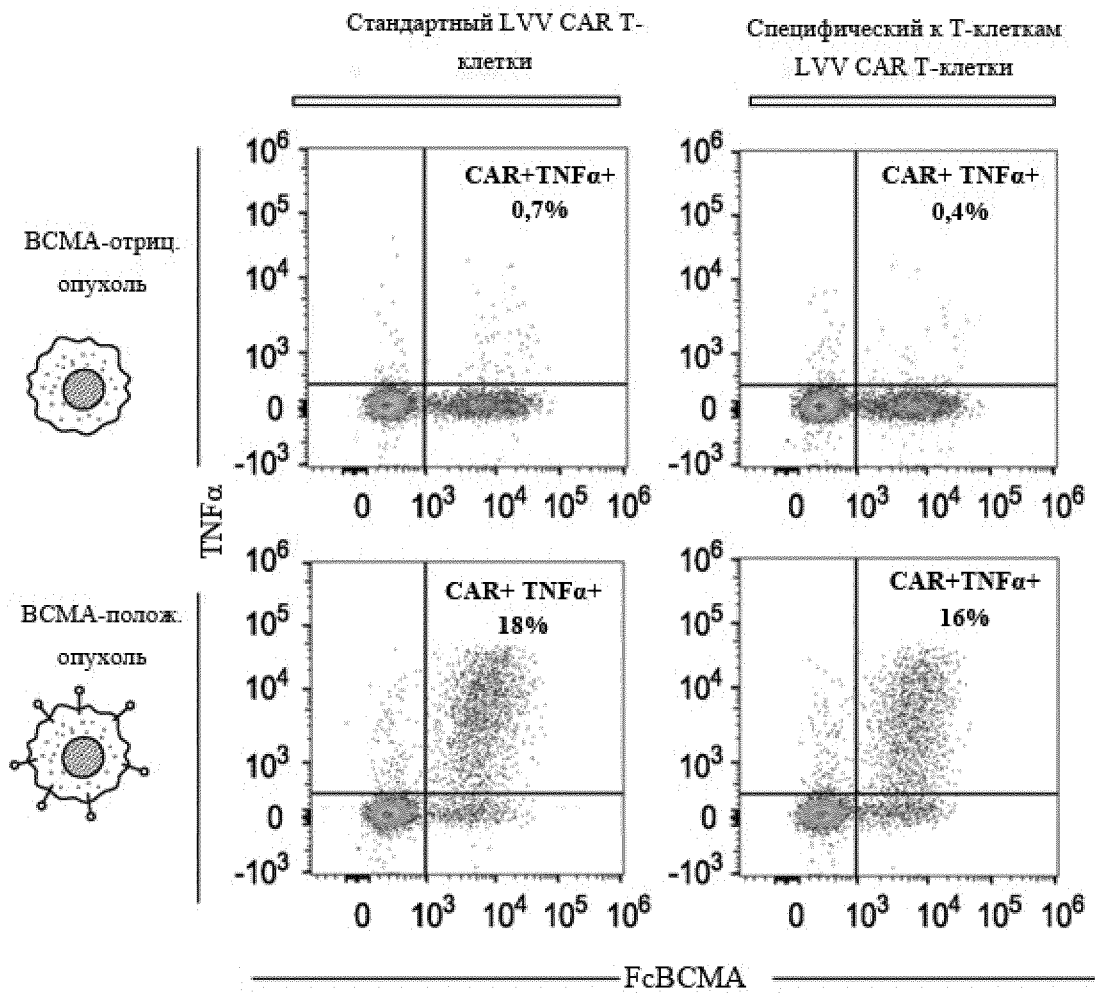
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11

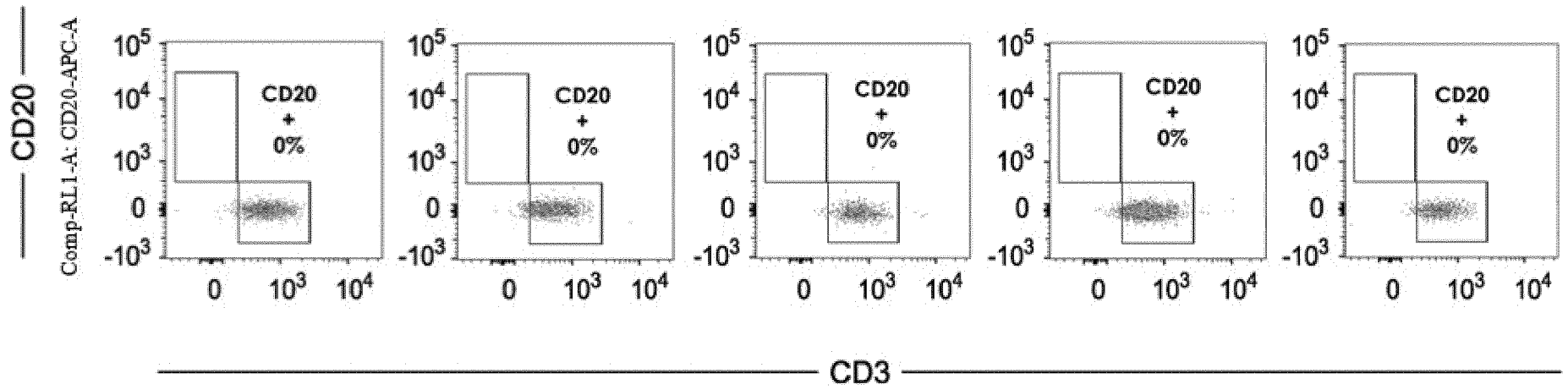
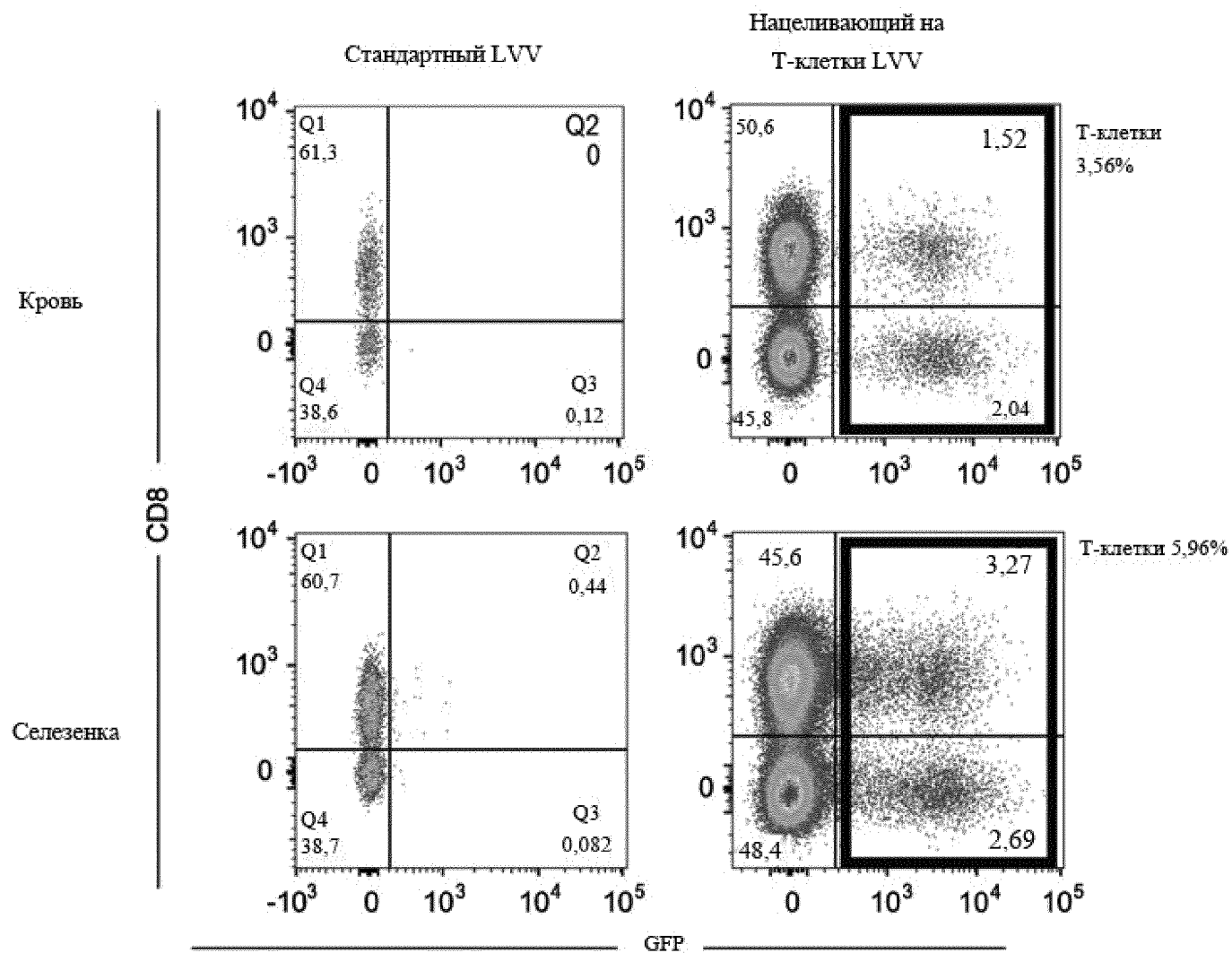
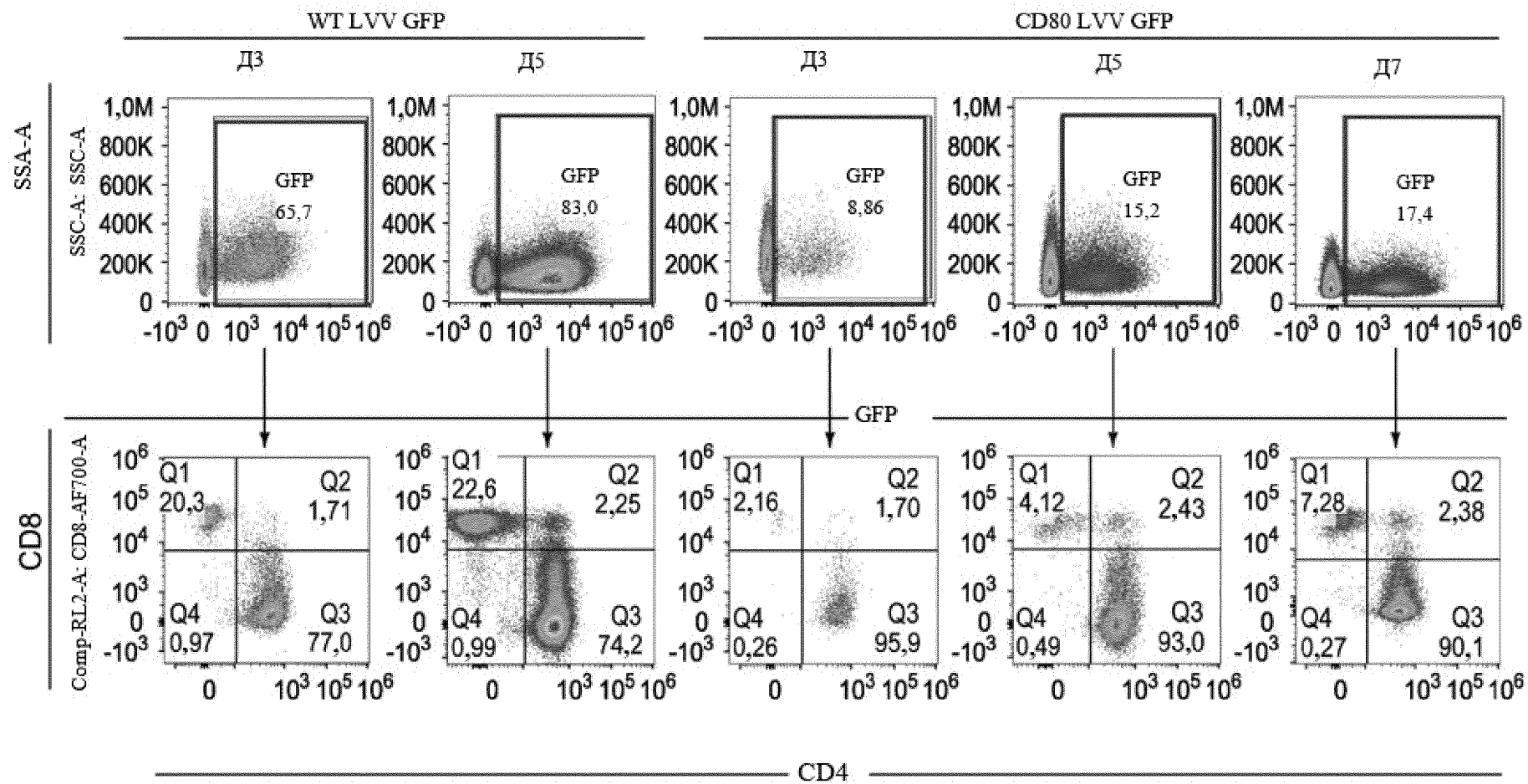


Fig. 12A

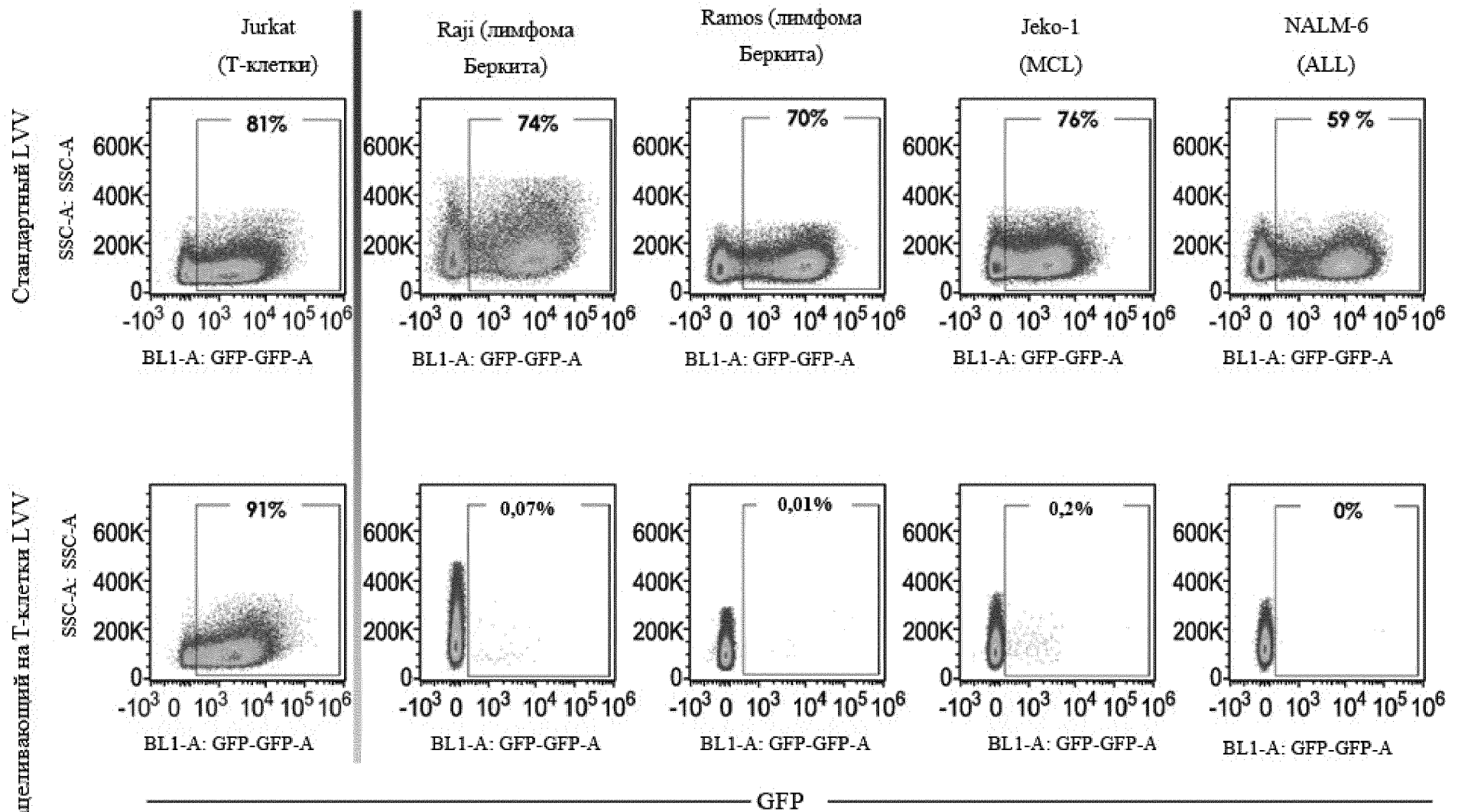


Фиг. 12В



Фиг. 13





Фиг. 14