

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392536** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.29

(22) Дата подачи заявки
2019.08.30

(51) Int. Cl. *C12N 15/63* (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(54) CAR-ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ Т-КЛЕТКИ И CAR-ЭКСПРЕССИРУЮЩИЙ ВЕКТОР

(31) **2018-163310**

(32) **2018.08.31**

(33) **JP**

(62) **202190624; 2019.08.30**

(71) Заявитель:
НОЙЛ-ИММЬОН БАЙОТЕК, ИНК.;
ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)

(72) Изобретатель:

Таке Тихиро, Тагамия Такаюки,
Ямагути Акико (JP)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к иммунным клеткам (таким как CAR-T-клетки), имеющим более высокую противоопухолевую активность, чем иммунные клетки (такие как CAR-T-клетки), экспрессирующие только CAR (не экспрессирующие цитокины и/или хемокины). В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к Т-клетке, которая экспрессирует: (1) химерный антигенный рецептор (CAR), (2) по меньшей мере один цитокин, выбранный из группы, состоящей из интерлейкина-15 (IL-15), интерлейкина-18 (IL-18), интерлейкина-21 (IL-21) и интерлейкина-27 (IL-27), и (3) лиганд хемокина CC 19 (CCL19).

A1

202392536

202392536

A1

CAR-ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ Т-КЛЕТКИ И CAR-ЭКСПРЕССИРУЮЩИЙ ВЕКТОР

Область техники

[0001] Настоящее изобретение относится к иммунным клеткам, которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (далее называемый «CAR») (эти клетки далее называются «CAR-экспрессирующими иммунными клетками»), и которые могут быть использованы для иммунотерапии рака, а именно, к Т-клеткам, экспрессирующим CAR (далее называемым «CAR-Т-клетками»), и к экспрессионному вектору для получения CAR-экспрессирующих иммунных клеток (таких как CAR-Т-клетки). Более конкретно, настоящее изобретение относится к CAR-экспрессирующим иммунным клеткам (таким как CAR-Т-клетки), экспрессирующим предварительно определенные цитокины и хемокины, и к экспрессионному вектору для продуцирования этих клеток.

Предпосылки к созданию изобретения

[0002] Было показано, что иммунотерапия рака, проводимая путем введения CAR-Т-клеток, эффективна для лечения злокачественных гемопозитических новообразований, таких как лейкоз и лимфома, однако, существуют такие типы рака и случаи раковых заболеваний, при которых терапевтический эффект не наблюдается из-за таких проблем, как низкая эффективность выживания CAR-Т-клеток *in vivo* и ингибирование активности CAR-Т-клеток в микроокружении раковых опухолей посредством механизма «ускользания» раковых клеток от «иммунного надзора», особенно при солидных раковых опухолях. Следовательно, необходимость в получении CAR-Т-клеток, дающих терапевтический эффект и обладающих более высокой противоопухолевой активностью, особенно при солидных раковых опухолях, остается актуальной.

[0003] В патентном документе 1 и в непатентном документе 1 раскрыты CAR-Т-клетки, которые экспрессируют IL-7 и CCL19 и имеют более высокую противоопухолевую активность, чем обычные CAR-Т-клетки. Однако патентный документ 1 и непатентный документ 1 не включают конкретных описаний других комбинаций цитокинов и хемокинов.

[0004] В непатентном документе 2 раскрыты CAR-Т-клетки, которые имеют повышенную персистенцию независимо от передачи сигналов CAR и экспрессируют мембраносвязанный химерный IL-15 (mbIL-15). Однако непатентный документ 2 не включает конкретных описаний комбинаций mbIL-15 с хемокинами, такими как CCL19.

[0005] В непатентном документе 3 указано, что использование слитого белка, содержащего IL-15, связанный с доменом IL-15R α sushi посредством гибкого линкера, может сообщать более высокую активность в пролиферации лимфоцитов (таких как NK-клетки, NK-Т-клетки и CD8-позитивные клетки памяти), в активации дендритных клеток и т.п. по сравнению со стандартным комбинированным использованием домена IL-15 и IL-15R α sushi. Однако, непатентный документ 3 не включает конкретных описаний комбинаций домена IL-15 и IL-15R α sushi с хемокинами, такими как CCL19.

[0006] В непатентном документе 4 указано, что трансфекция секреторного слитого белка мышинных IL-15 и IL-15R α повышает жизнеспособность и пролиферацию CD8-позитивных Т-клеток. Однако непатентный документ 4 не включает конкретных описаний комбинаций IL-15 с хемокинами, такими как CCL19.

[0007] В непатентном документе 5 описаны одноцепочечный IL-27 (p28 и EB13, связанные гибким линкером) и его эффект при лечении воспалительного заболевания кишечника (ВЗК). Однако непатентный документ 5 не включает конкретных описаний CAR-Т-клеток и комбинаций одноцепочечного IL-27 с хемокинами, такими как CCL19.

[0008] В патентном документе 2 раскрыты Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный IL-7, рекомбинантный IL-15 или их комбинации, и указано, что экспрессия таких цитокинов повышает выживаемость Т-клеток. Однако патентный документ 2 не включает конкретных описаний CAR-Т-клеток и комбинаций специфических цитокинов с хемокинами, такими как CCL19.

[0009] В патентном документе 3 раскрыты модифицированные природные Т-клетки-киллеры, содержащие экспрессионную конструкцию, кодирующую IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 или их комбинации, и конструкцию CAR. Однако патентный документ 3 не включает конкретных описаний комбинаций специфических цитокинов с хемокинами, такими как CCL19.

[0010] В патентном документе 4 раскрыты CAR-Т-клетки, экспрессирующие мембраносвязанные цитокины, такие как IL-7, IL-15 (слитый белок IL-15/IL-15R α) и IL-21. Однако патентный документ 4 не включает конкретных описаний комбинаций специфических цитокинов с хемокинами, такими как CCL19.

[0011] В патентном документе 5 раскрыты CAR-Т-клетки, экспрессирующие IL-15 и нацеленные на CD19. Однако патентный документ 5 не включает конкретных описаний комбинаций IL-15 с хемокинами, такими как CCL19.

[0012] В непатентном документе 6 раскрыты CAR-Т-клетки, экспрессирующие IL-15 и и/или IL-21 и нацеленные на GPC3. Однако патентный документ 6 не включает конкретных описаний комбинаций специфических цитокинов с хемокинами, такими как CCL19.

Список цитируемых документов

[0013] Патентные документы

Патентный документ 1: WO 2016/056228

Патентный документ 2: WO 2007/037780

Патентный документ 3: WO 2013/040371

Патентный документ 4: WO 2014/186469

Патентный документ 5: US 2013/0071414

Непатентные документы

[0014] Непатентный документ 1: Adachi et al., Nature Biotechnology, VOL 36, № 4, 346-353

Непатентный документ 2: Hurton et al., Proc Natl Acad Sci., 113 (48), E7788-97, 2016

Непатентный документ 3: Mortier et al., J Biol Chem. 281 (3), 1612-9, 2006.

Непатентный документ 4: Rowley et al., Eur J Immunol. 39 (2), 491-506, 2009.

Непатентный документ 5: Sasaoka et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 300: G568-576

Непатентный документ 6: Barta et al., Armored Glypican-3-Specific CAR T cells for the Immunotherapy of Hepatocellular Carcinoma, ASGCT 2018, May 2018, abstract

Сущность изобретения

Техническая задача

[0015] Целью настоящего изобретения является получение иммунных клеток (таких как CAR-T-клетки), имеющих более высокую противоопухолевую активность, чем иммунные клетки (такие как CAR-T-клетки), экспрессирующие только CAR (не экспрессирующие цитокины и/или хемокины).

Решение задачи

[0016] *In vivo* существует по меньшей мере несколько сотен молекул, которые могут регулировать функции иммунных клеток, таких как Т-клетки. Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что противоопухолевая активность усиливается CAR-T-клетками, экспрессирующими по меньшей мере один цитокин, выбранный из группы, состоящей из интерлейкина-15 (IL-15), интерлейкина-18 (IL-18), интерлейкина-21 (IL-21) и интерлейкина-27 (IL-27), которые представляют собой цитокины, в комбинации с лигандом хемокина CC-19 (CCL19), который представляет собой хемокин, в комбинации с CAR, по сравнению с клетками, экспрессирующими только CAR, и в частности, повышается персистенция и пролиферация CAR-T-клеток, и на этой основе может быть реализовано настоящее изобретение.

[0017] IL-15, IL-18, IL-27 и CCL19 представляют собой цитокины и хемокин, которые не экспрессируются природными Т-клетками (в которые не вводятся экзогенные гены) *in vivo*. IL-21 представляет собой цитокин, экспрессируемый природными Т-клетками *in vivo* (такими как NK-Т-клетки и CD4-позитивные Т-клетки). В настоящем изобретении, экспрессия предварительно определенного цитокина и хемокина означает экспрессию предварительно определенного цитокина и хемокина на более высоких уровнях, чем в природных Т-клетках *in vivo* при введении генов, экспрессирующих предварительно определенные экзогенные цитокин и хемокин, в Т-клетки.

[0018] Кроме того, вариант осуществления переноса генов и экспрессии вышеупомянутых предварительно определенных интерлейкинов и хемокина вместе с CAR в Т-клетках может быть расширен до варианта переноса генов и их экспрессии в иммунных клетках, отличающихся от Т-клеток, таких как NK-клетки, моноциты, макрофаги и дендритные клетки.

[0019] Настоящее изобретение включает по меньшей мере следующие аспекты:

[1] Т-клетку, экспрессирующую:

(1) химерный антигенный рецептор (CAR);

(2) по меньшей мере один цитокин, выбранный из группы, состоящей из

интерлейкина-15 (IL-15), интерлейкина-18 (IL-18), интерлейкина-21 (IL-21) и интерлейкина-27 (IL-27); и

(3) лиганд хемокина CC 19 (CCL19).

[2] Т-клетку согласно пункту 1, где (2) представляет собой IL-15.

[3] Т-клетку согласно пункту 2, где IL-15 связывается с IL-15R α с образованием слитого белка.

[4] Т-клетку согласно пункту 3, где слитый белок представляет собой слитый белок, содержащий IL-15LSP, связанный с IL-15 (IL15_{LSP}), слитый белок, содержащий внеклеточный домен IL-15R α , связанный с IL-15 (sIL15_{RA}), слитый белок, содержащий IL-15, связанный с полноразмерным IL-15R α (mbIL15_{RA}), или слитый белок, содержащий IL-15R α , включающий сигнальный пептид и домен sushi, связанный с IL-15 (sushiIL-15).

[5] Т-клетку согласно пункту 3, где слитый белок представляет собой слитый белок, содержащий IL-15, связанный с полноразмерным IL-15R α (mbIL15_{RA}), или слитый белок, содержащий IL-15R α , включающий сигнальный пептид и домен sushi, связанный с IL-15 (sushiIL-15).

[6] Лекарственное средство, содержащее Т-клетку согласно пункту 1.

[7] Лекарственное средство согласно пункту 6, где лекарственное средство представляет собой терапевтическое средство против рака.

[8] Лекарственное средство согласно пункту 7, где рак представляет собой меланому, рак клеток Меркеля, рак прямой и ободочной кишки, рак почек, рак молочной железы, рак яичника, рак фаллопиевых труб, рак шейки матки, рак печени, рак легких, немелкоклеточный рак легких, рак головы и шеи, рак тонкой кишки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак прямой кишки, рак поджелудочной железы, саркому Юинга, рабдомиосаркому, рак носоглотки, рак пищевода, рак желчных путей, нейробластому, остеосаркому, острый миелоидный лейкоз, множественную миелому, лимфому или лейкоз.

[9] Экспрессионный вектор, содержащий:

(1) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR;

(2) нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере один цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-15, IL-18, IL-21 и IL-27; и

(3) нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19.

[10] Экспрессионный вектор согласно пункту 9, где (2) представляет собой IL-15.

[11] Экспрессионный вектор согласно пункту 10, где IL-15 связывается с IL-15R α с образованием слитого белка.

[12] Экспрессионный вектор согласно пункту 11, где слитый белок представляет собой слитый белок, содержащий IL-15LSP, связанный с IL-15 (IL15_{LSP}), слитый белок, содержащий внеклеточный домен IL-15R α , связанный с IL-15 (sIL15_{RA}), слитый белок, содержащий IL-15, связанный с полноразмерным IL-15R α (mbIL15_{RA}), или слитый белок, содержащий IL-15R α , включающий сигнальный пептид и домен sushi, связанный с IL-15 (sushiIL-15).

[13] Экспрессионный вектор согласно пункту 11, где слитый белок представляет собой слитый белок, содержащий IL-15, связанный с полноразмерным IL-15R α (mbIL15R α), или слитый белок, содержащий IL-15R α , включающий сигнальный пептид и домен sushi, связанный с IL-15 (sushiIL-15).

[14] Способ получения CAR-T-клетки, включающий стадию введения экспрессионного вектора согласно пункту 9 в T-клетку.

[15] Способ лечения рака, включающий стадию введения T-клетки согласно пункту 1 индивидууму, нуждающемуся в лечении рака.

[16] Способ лечения согласно пункту 15, где рак представляет собой меланому, рак клеток Меркеля, рак прямой и ободочной кишки, рак почек, рак молочной железы, рак яичника, рак фаллопиевых труб, рак шейки матки, рак печени, рак легких, немелкоклеточный рак легких, рак головы и шеи, рак тонкой кишки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак прямой кишки, рак поджелудочной железы, саркому Юинга, рабдомиосаркому, рак носоглотки, рак пищевода, рак желчных путей, нейробластому, остеосаркому, острый миелоидный лейкоз, множественную миелому, лимфому или лейкоз.

[17] T-клетку согласно пункту 1 для применения в качестве активного компонента для лечения рака.

[18] T-клетку согласно пункту 17, где рак представляет собой меланому, рак клеток Меркеля, рак прямой и ободочной кишки, рак почек, рак молочной железы, рак яичника, рак фаллопиевых труб, рак шейки матки, рак печени, рак легких, немелкоклеточный рак легких, рак головы и шеи, рак тонкой кишки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак прямой кишки, рак поджелудочной железы, саркому Юинга, рабдомиосаркому, рак носоглотки, рак пищевода, рак желчных путей, нейробластому, остеосаркому, острый миелоидный лейкоз, множественную миелому, лимфому или лейкоз.

[0020] Далее, T-клетка по указанному выше [1] также называется «T-клеткой согласно изобретению», лекарственное средство по указанному выше [6] также называется «лекарственным средством согласно изобретению», экспрессионный вектор по указанному выше [9] также называется «экспрессионным вектором согласно изобретению», а способ получения CAR-T-клетки по указанному выше [14] также называется «способом получения согласно изобретению».

[0021] Специалист в данной области может соответствующим образом преобразовать варианты (категории) осуществления изобретения с учетом содержания, в основном, раскрытого в данном документе. Так, например, лекарственное средство согласно изобретению по вышеуказанному [6] может быть преобразовано в «способ лечения рака, включающий стадию введения T-клетки, экспрессирующей: (1) CAR; (2) по меньшей мере один цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-15, IL-18, IL-21 и IL-27; и (3) CCL19 индивидууму, нуждающемуся в лечении рака»; «T-клетку, экспрессирующую: (1) CAR; (2) по меньшей мере один цитокин, выбранный из группы,

состоящей из IL-15, IL-18, IL-21 и IL-27; и (3) CCL19 для использования в качестве активного компонента для лечения рака», и «использование Т-клетки экспрессирующей: (1) CAR; (2) по меньшей мере один цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-15, IL-18, IL-21 и IL-27; и (3) CCL19 для получения лекарственного средства для лечения рака».

[0022] Специалист в данной области может соответствующим образом преобразовать вариант Т-клетки согласно изобретению, которая может быть получена так, чтобы она экспрессировала предварительно определенные цитокин и хемокин вместе с CAR, и их соответствующие варианты, такие как лекарственное средство согласно изобретению, экспрессионный вектор согласно изобретению и способ получения согласно изобретению, в вариант иммунных клеток, отличающихся от Т-клеток (таких как НК-клетки, моноциты, макрофаги и дендритные клетки), предварительно определенных цитокинов и хемокинов, вместе с CAR и их соответствующие варианты, такие как лекарственное средство, экспрессионный вектор и способ получения, с учетом содержания, в основном, раскрытого в настоящей заявке.

Предпочтительные эффекты изобретения

[0023] Персистенция и пролиферацию Т-клетки согласно изобретению повышают посредством экспрессии Т-клеткой предварительно определенного цитокина (такого как IL-15) и хемокина (CCL19). Следовательно, может быть усилена противоопухолевая активность под действием CAR (например, уменьшение количества остаточных опухолевых клеток, повышение количества продуцируемого IFN γ и усиление миграции и аккумуляции иммунных клеток хозяина (таких как Т-клетки, дендритные клетки, НК-клетки) в очаге опухоли). Кроме того, терапевтический эффект в отношении рака может быть улучшен с использованием лекарственного средства, содержащего Т-клетку согласно изобретению. В частности, Т-клетка согласно изобретению может участвовать в активации НК-клеток и, следовательно, может быть использована для лечения карцином, чувствительных к НК-клеткам (таких как меланома, рак клеток Меркеля, рак прямой и ободочной кишки, рак почек, рак молочной железы, рак яичника, рак фаллопиевых труб, рак шейки матки, рак печени, рак легких, немелкоклеточный рак легких, рак головы и шеи, рак тонкой кишки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак прямой кишки, рак поджелудочной железы, саркома Юинга, рабдомиосаркома, рак носоглотки, рак пищевода, рак желчных путей, нейробластома, остеосаркома, острый миелоидный лейкоз, множественная миелома, лимфома или лейкоз). Кроме того, поскольку усиление противоопухолевой активности снижает количество вводимых клеток, то ожидаются такие эффекты, как снижение побочных эффектов, таких как CRS (синдром высвобождения цитокинов), и снижение стоимости производства.

[0024] Комбинация предварительно определенных цитокинов и хемокина согласно изобретению оказывает такое действие и эффект, которые позволяют получить различные CAR-экспрессирующие иммунные клетки с высокой противоопухолевой активностью

даже в том случае, когда гены переносятся и экспрессируются вместе с геном CAR в иммунных клетках в целом, то есть не только в Т-клетках, как упомянуто выше, но также и в НК-клетках, моноцитах, макрофагах и дендритных клетках.

Краткое описание чертежей

[0025] [Фигура 1] На фигуре 1 показаны результаты анализа уровня экспрессии CAR (горизонтальная ось) и CD8 (вертикальная ось) в Т-клетках, упомянутых ниже в Примере (Экспериментальном примере 1) с помощью проточной цитометрии. Числовое значение (%) на этой фигуре означает процент популяции клеток в каждом компартменте по отношению к общему количеству клеток. «Трансдукция (-)» означает нетрансдуцированные Т-клетки Сравнительного примера 1 (Т-клетки без трансдукции), «преобразованные CAR-Т» означают преобразованные CAR-Т-клетки Сравнительного примера 2 (CAR-Т-клетки против человеческого CD20), « $IL15_{LSP} \times 19$ CAR-Т» означает $IL15_{LSP} \times CCL19$ -CAR-Т-клетки Примера 1-1 (Т-клетки, содержащие CAR $IL15_{LSP}$ _CCL19 против человеческого CD20), « $sIL15_{RA} \times 19$ CAR-Т» означает $sIL15_{RA} \times CCL19$ -CAR-Т-клетки Примера 1-2 (Т-клетки, содержащие CAR $sIL15_{RA}$ _CCL19 против человеческого CD20), « $mbIL15_{RA} \times 19$ CAR-Т» означает $mbIL15_{RA} \times CCL19$ -CAR-Т-клетки Примера 1-3 (Т-клетки, содержащие CAR $mbIL15_{RA}$ _CCL19 против человеческого CD20), « $sushiIL15 \times 19$ CAR-Т» означает $sushiIL15 \times CCL19$ -CAR-Т-клетки Примера 1-4 (Т-клетки, содержащие CAR $sushiIL15$ _CCL19 против человеческого CD20), « $IL-18 \times 19$ CAR-Т» означает $IL-18 \times CCL19$ -CAR-Т-клетки Примера 2 (Т-клетки, содержащие CAR $IL18$ _CCL19 против человеческого CD20), « $IL-21 \times 19$ CAR-Т» означает $IL-21 \times CCL19$ -CAR-Т-клетки Примера 3 (Т-клетки, содержащие CAR $IL21$ _CCL19 против человеческого CD20), и « $scIL27 \times 19$ CAR-Т» означает $scIL27 \times CCL19$ -CAR-Т-клетки Примера 4 (Т-клеток, содержащих CAR $scIL27$ _CCL19 против человеческого CD20). Этот также применимо к фигурам 2-6, представленным ниже.

[Фигура 2] На фигуре 2 представлены результаты измерения количества (А) IL-15, (В) IL-18, (С) IL-21, (D) IL-27 и (Е) CCL19, секретлируемых в супернатант культуры Т-клеток, в Примере (в Экспериментальном Примере 1) с помощью ELISA.

[Фигура 3] На фигуре 3 представлены результаты измерения количества живых клеток в Т-клетках через 3 дня, 5 дней и 7 дней после стимуляции активации путем совместного культивирования с мастоцитомой P815, экспрессирующей человеческий CD20 (hCD20/P815) в Примере (в Экспериментальном Примере 2).

[Фигура 4] На фигуре 4 показаны в виде гистограммы результаты анализа на интенсивность окрашивания реагентом CytoTell в Т-клетках в Примере (в Экспериментальном Примере 2). Пик гистограммы соответствует числу поколений в результате деления клеток, а числовое значение (%) на кольцевом графике указывает на процент стробированных фракций в популяции Thy1.2-позитивных Т-клеток (1 представляет первое поколение без деления, 2 представляет второе поколение после одного деления, 3 представляет третье поколение после двух делений, 4 представляет четвертое поколение после трех делений, >5 представляет пятое и последующие

поколения после четырех или более делений).

[Фигура 5] На фигуре 5 представлены результаты определения цитотоксической активности Т-клеток (А) по отношению к опухолевым клеткам-мишеням (hCD20/P815) и (В) к контрольным опухолевым клеткам (P815) в Примере (в Экспериментальном примере 3) с помощью проточной цитометрии.

[Фигура 6] На фигуре 6 представлены результаты определения концентрации IFN γ в супернатанте культуры Т-клеток во время совместного культивирования (А) с опухолевыми клетками-мишенями (hCD20/P815) и (В) с контрольными опухолевыми клетками (P815) в Примере (в Экспериментальном примере 3).

[Фигура 7] На Фигуре 7 показано расположение генов и т.п., содержащихся в нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 (фрагмента ДНК CAR против человеческого CD20).

[Фигура 8] На Фигуре 8 показано расположение генов и т.п., содержащихся в нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3 (фрагмента ДНК MCS).

[Фигура 9] На Фигуре 9 показано расположение генов и т.п., содержащихся в нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4 (фрагмента ДНК IL15_{LSP}_F2A_CCL19).

[Фигура 10] На фигуре 10 показано расположение генов и т.п., содержащихся в нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6 (фрагмента ДНК sIL15_{RA}_F2A_CCL19).

[Фигура 11] На Фигуре 11 показано расположение генов и т.п., содержащихся в нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8 (фрагмента ДНК _{mb}IL15_{RA}_F2A_CCL19).

[Фигура 12] На Фигуре 12 показано расположение генов и т.п., содержащихся в нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 10 (фрагмента ДНК _{sushi}IL15_F2A_CCL19).

[Фигура 13] На Фигуре 13 показано расположение генов и т.п., содержащихся в нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 12 (фрагмента ДНК IL-18_F2A_CCL19).

[Фигура 14] На Фигуре 14 показано расположение генов и т.п., содержащихся в нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 (фрагмент ДНК IL-21_F2A_CCL19).

[Фигура 15] На Фигуре 15 показано расположение генов и т.п., содержащихся в нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16 (фрагмента ДНК _{sc}IL27_F2A_CCL19).

[Фигура 16] На Фигуре 16 представлены результаты определения противоопухолевой активности (изменения объема опухоли) для мышинной модели трансплантата меланомы в Примере (в Экспериментальном примере 4).

[Фигура 17] На Фигуре 17 показано результаты определения противоопухолевой активности (изменения объема опухоли) для мышинной модели рака прямой и ободочной кишки в Примере (в Экспериментальном примере 4).

Описание вариантов осуществления изобретения

[0026] Используемый здесь термин «трансфекция» означает введение любого вещества в клетку. Клетка включает по меньшей мере цитоплазму и ядро.

[0027] «Культура» или «культивирование» означает поддержание, пролиферацию и/или дифференцировку клеток вне тканей или вне организма, например, в чашке, в чашке Петри, в колбе или резервуаре для культивирования.

[0028] «Плюрипотентность» означает способность дифференцироваться в ткани и в клетки, имеющие различную морфологию и различные функции, и способность дифференцироваться в клетки любой линии дифференцировки трех зародышевых слоев. «Плюрипотентность» отличается от «тотипотентности», которая означает способность дифференцироваться в любую ткань организма, включая бластоцисты, то есть, плюрипотентность не означает способность дифференцироваться в бластоцисты и, следовательно, не обладает способностью образовывать живые организмы.

[0029] «Мультипотентность» означает способность дифференцироваться в клетки ограниченного числа линий. Так, например, мезенхимальные стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки и нервные стволовые клетки являются мультипотентными, но не плюрипотентными.

[0030] Примеры «стволовых клеток» включают плюрипотентные стволовые клетки.

[0031] «Плюрипотентные стволовые клетки», которые могут быть использованы в настоящем изобретении, означают стволовые клетки, которые могут дифференцироваться в ткани и клетки, имеющие различную морфологию и функции живого организма, и обладают способностью дифференцироваться в клетки любой линии трех зародышевых слоев (энтодермы, мезодермы и эктодермы). Их примеры включают, но не ограничиваются ими, эмбриональные стволовые клетки (ESC), эмбриональные стволовые клетки, происходящие от клонированных эмбрионов, полученных путем трансплантации в ядро; стволовые клетки сперматозоидов; эмбриональные зародышевые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (далее также называемые «iPSC»).

[0032] Кроме того, «мультипотентные стволовые клетки», которые могут быть использованы в настоящем изобретении, относятся к стволовым клеткам, обладающим способностью дифференцироваться в клетки ограниченного числа линий. Примерами «мультипотентных стволовых клеток», которые могут быть использованы в настоящем изобретении, являются соматические стволовые клетки, полученные из стволовых клеток пульпы зуба, стволовых клеток слизистой оболочки полости рта, стволовых клеток волосяных фолликул, фибробластов культуры и стволовых клеток костного мозга. Предпочтительными плюрипотентными стволовыми клетками являются ESC и iPSC.

[0033] «Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC)» относятся к клеткам, полученным путем введения специфического фактора (фактора ядерного перепрограммирования) в соматические клетки млекопитающих или недифференцированные стволовые клетки и перепрограммирования клеток. В настоящее время известны различные типы «индуцированных плюрипотентных стволовых клеток». Помимо iPSC, полученных путем введения четырех факторов Oct3/4, Sox2, Klf4 и c-Myc в мышинные фибробласты как описано Yamanaka et al. (Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006) 126: 663-676), могут быть также использованы iPSC, происходящие от человеческих клеток и полученные путем введения тех же четырех факторов в фибробласты человека (Takahashi K, Yamanaka S., et al. Cell, (2007) 131: 861-872.), клетки

Nanog-iPS, полученные путем введения четырех факторов и последующей сортировки клеток посредством экспрессии Nanog в качестве индекса (Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). *Nature* 448, 313-317), iPS-клетки, полученные способом, исключаящим c-Мyc (Nakagawa M, Yamanaka S., et al. *Nature Biotechnology*, (2008) 26, 101-106); и iPS-клетки, полученные путем введения шести факторов безвирусным методом (Okita K et al. *Nat. Methods* 2011 May; 8 (5): 409-12, Okita K et al. *Stem Cells*. 31(3): 458-66). Кроме того, могут быть также использованы индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные Thomson и др., путем введения четырех факторов OCT3/4, SOX2, NANOG и LIN28 (Yu J., Thomson JA. Et al., *Science* (2007) 318: 1917-1920.); индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные Daley, et al. (Park IH, Daley GQ. Et al., *Nature* (2007) 451: 141-146); индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные Sakurada, et al. (JP 2008-307007) и т.п. Помимо вышеуказанных клеток могут быть также использованы любая из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, известных специалистам в данной области и описанных во всех опубликованных статьях (таких как Shi Y., Ding S., et al., *Cell Stem Cell*, (2008) Vol 3, Issue 5, 568-574; Kim JB., Scholer HR., Et al., *Nature*, (2008) 454, 646-650; и Huangfu D., Melton, DA., Et al., *Nature Biotechnology*, (2008) 26, № 7, 795-797) или в патентах (таких как, JP 2008-307007, JP 2008-283972, US 2008-2336610, US 2009-047263, WO 2007-069666, WO 2008-118220, WO 2008-124133, WO 2008-151058, WO 2009-006930, WO 2009-006997 и WO 2009-007852).

[0034] В качестве «индуцированных плюрипотентных стволовых клеток» могут быть использованы различные линии iPSC, созданные специалистами НИИ, Института физических и химических исследований (RIKEN), Киотского Университета т.п. Примеры линий человеческих iPSC включают линию HiPS-RIKEN-1A, линию HiPS-RIKEN-2A, линию HiPS-RIKEN-12A и линию Nips-B2 от RIKEN, а также линию 253G1, линию 201B7, линию 409B2, линию 454E2, линию 606A1, линию 610B1 и линию 648A1 Киотского университета. Альтернативно, могут быть использованы клинически ценные клеточные линии, предоставленные Киотским Университетом, Cellular Dynamics International или т.п., и клеточные линии для их применения в исследовательских и клинических целях, полученные с использованием таких клеточных линий.

[0035] В качестве «эмбриональных стволовых клеток (ESC)» могут быть использованы мышинные ESC, такие как различные мышинные линии ESC, созданные в специальной лаборатории inGenious, RIKEN (Института физических и химических исследований) и т.п., а также человеческие ESC, такие как различные человеческие линии ESC созданные в НИИ, Институте физических и химических исследований, в Киотском Университете и в Cellartis. Так, например, могут быть использованы человеческие линии ESC, такие как линии CHB-1 - CHB-12, линия RUES1, линия RUES2 и линии HUES1 - HUES28 от НИИ, линия H1 и линия H9 от WisCell Research, и линия KhES-1, линия KhES-2, KhES-3, линия KhES-4, линия KhES-5, линия SSES1, линия SSES2 и линия SSES3 от RIKEN. Альтернативно, могут быть использованы клинически ценные клеточные линии, и клеточные линии для их применения в исследовательских и клинических целях,

полученные с использованием таких клеточных линий.

[0036] Термин «содержит или содержащий» указывает на включение элементов, перечисленных за этим термином, но не ограничивается этими элементами. В соответствии с этим, предполагается включение элементов, перечисленных за этим термином, но при этом не исключается присутствие каких-либо других элементов. Термин «состоит из или состоящий из» означает включение всех элементов, перечисленных за этим термином, и ограничивается этими элементами. Соответственно, термин «состоит из или состоящий из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или незаменимыми, а другие элементы, по существу, отсутствуют. Термин «состоит по существу, из или состоящий, по существу, из» указывает на включение любого элемента, следующего за этим термином, а другие элементы ограничиваются элементами, которые не влияют на активность или действие элемента, указанного в настоящей заявке. Соответственно, термин «состоит по существу, из или состоящий, по существу, из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или незаменимыми, но, при этом могут быть выбраны, но необязательно, и другие элементы, и эти элементы могут присутствовать или отсутствовать в зависимости от того, влияют ли эти другие элементы на активность или функцию перечисленных элементов.

[0037] Комбинация предварительно определенных цитокинов и хемокина согласно изобретению может обеспечивать CAR- экспрессирующие иммунные клетки с высокой противоопухолевой активностью благодаря переносу генов в иммунные клетки, а в частности, в Т-клетки, ответственные за клеточно-опосредованный приобретенный иммунитет, и NK-клетки, моноциты, макрофаги и дендритные клетки, которые являются ответственными за природный иммунитет вместе с геном CAR и экспрессируют эти гены. Другими словами, перенос гена и экспрессия комбинации предварительно определенного цитокина и хемокина согласно изобретению могут сообщать дополнительные специфические свойства Т-клеткам (CAR-Т-клеткам), NK-клеткам (CAR-NK-клеткам), моноцитам (CAR-моноцитам), макрофагам (CAR-макрофагам) и дендритным клеткам (CAR-дендритным клеткам), в которые переносится и в которых экспрессируется ген CAR.

[0038] «Иммунные клетки» не имеют конкретных ограничений, при условии, что они являются клетками, способными повреждать клетки-мишени (патогенные клетки), такие как раковые клетки, посредством определенного механизма действия (так называемые эффекторные иммунные клетки). Примерами иммунных клеток являются Т-клетки, ответственные за клеточно-опосредованный приобретенный иммунитет, и NK-клетки, моноциты, макрофаги и дендритные клетки, которые ответственны за природный иммунитет. В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения, иммунные клетки могут представлять собой Т-клетки. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, иммунные клетки могут представлять собой клетки, ответственными за природный иммунитет, такие как NK-клетки, макрофаги и дендритные клетки. Считается, что хотя Т-клетки ассоциируются с высоким риском развития реакции

«трансплантат против хозяина» (РТПХ) при аллогенной трансплантации (аллотрансплантации) даже в случае совпадения типов HLA, однако, алло-НК-клетки не вызывают РТПХ. В соответствии с этим, благодаря получению различных аллоиммунных клеток с соответствующими типами HLA становится возможным использование коммерчески доступного препарата. Клетки CAR-НК описаны, например, в патенте США 2016/0096892, Mol. Ther. 25 (8): 1769-1781 (2017) и т.д., а дендритные CAR-клетки, CAR-макрофаги и т.п. описаны, например, в WO 2017/019848, eLIFE. 2018 e36688 и др.

[0039] Далее, настоящее изобретение будет описано со ссылкой на варианты его осуществления, в которых Т-клетки используются в качестве репрезентативного примера иммунных клеток. Однако, настоящее изобретение не ограничивается только вариантами, в которых иммунные клетки представляют собой Т-клетки, и настоящее изобретение также включает варианты, в которых иммунные клетки представляют собой НК-клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки или т.п. В нижеследующем описании, «CAR-Т-клетки» можно соответствующим образом интерпретировать как «CAR-НК-клетки», «CAR-моноциты», «CAR-макрофаги», «дендритные CAR-клетки», или т.п.

[0040] Далее будет подробно описана Т-клетка согласно изобретению.

[0041] Т-клетка согласно изобретению экспрессирует: (1) CAR; (2) по меньшей мере один цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-15, IL-18, IL-21 и IL-27; и (3) CCL19.

[0042] Т-клетки согласно изобретению могут представлять собой любые Т-клетки, такие как $\alpha\beta$ -Т-клетки, $\gamma\delta$ -Т-клетки, CD8⁺-Т-клетки, CD4⁺-Т-клетки, Т-клетки, инфильтрирующие опухоль, Т-клетки памяти, «необученные» Т-клетки и NK-Т-клетки, то есть, Т-клетки, экспрессирующие широко распространенные или известные CAR.

[0043] Т-клетка может быть выделена и очищена от иммунных клеток, проникающих в физиологические жидкости, такие как кровь и жидкость костного мозга, ткани, такие как селезенка, тимус, лимфатические узлы, или раковые ткани, такие как первичные опухоли, метастазирующие опухоли и раковые асциты. Кроме того, Т-клетка может быть получена путем культивирования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS-клеток), эмбриональных стволовых клеток (ES-клеток), других стволовых клеток, клеток-предшественников и т.п. в соответствующих условиях и, тем самым, индуцирования и дифференцировки таких клеток в Т-клетки.

[0044] Т-клетки могут происходить от человека или от млекопитающих, кроме человека (млекопитающих, не являющихся человеком). Примерами млекопитающих, кроме человека, являются мыши, крысы, хомячки, морские свинки, кролики, собаки, кошки, свиньи, коровы, лошади, овцы и обезьяны.

[0045] (1) CAR

CAR, экспрессируемый Т-клеткой согласно изобретению, в основном, состоит из пептидов в сайтах (i) одноцепочечного антитела, которое распознает поверхностный антиген раковых клеток, (ii) трансмембранного домена и (iii) сигнального домена, индуцирующего активацию Т-клеток, где указанные пептиды, если это необходимо,

связаны посредством спейсеров, как обычные или известные CAR.

[0046] Одноцепочечное антитело (i), которое распознает антиген поверхности раковых клеток, обычно представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), состоящий из вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи, происходящих от антигенсвязывающих сайтов моноклонального антитела, которое специфически связывается с антигеном, и линкерного пептида, связывающего такие области.

[0047] «Антиген клеточной поверхности раковых клеток», на который нацелен CAR, может представлять собой биомолекулу, которая специфически экспрессируется в раковых клетках и в их клетках-предшественниках; биомолекулу, которая была предварительно экспрессирована посредством малигнизации клеток; или биомолекулу с повышенным уровнем экспрессии в раковых клетках по сравнению с нормальными клетками. Такой антиген обычно называют «опухолеассоциированным антигеном» (ТАА), и его примеры могут включать BCMA, B7-H3, B7-H6, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD56, CD70, CD74, CD97, CD123, CD133, CD138, CD171, CD248, CAIX, CEA, c-Met, CS1 (CD319), CSPG4, CLDN6, CLD18A2, CYP1B1, DNAM-1, GD2, GD3, GM2, GFR α 4, GPC3, GPR20, GPRC5D, globoH, Gp100, GPR20, GPRC5D, EGFR, вариант EGFR, EpCAM, EGP2, EGP40, FAP, FITC, HER2, HER3, HPV E6, HPV E7, hTERT, цепь IgG κ , IL-11Ra, IL-13Ra2, KIT, антиген Льюиса А, антиген Льюиса Y, легумаин, LMP1, LMP2, Ly6k, LICAM, MAD-CT-1, MAD-CT-2, MAGE-A1, ассоциированный с меланомой антиген 1, MUC1, MUC16, NA-17, NY-BR-1, NY-ESO-1, О-ацетил-GD2, h5T4, PANX3, PDGRFb, PLAC1, полисиаловую кислоту, PSCA, PSMA, RAGE1, ROR1, sLe, SSEA-4, TARP, TAG-72, TEM7R, антиген Tn, рецептор TRAIL, TRP2, TSHR, α -фетопротеин, мезотелин, рецептор фолиевой кислоты α (FR α), рецептор фолиевой кислоты β (FR β), FBP, UPK2, VEGF-R2 и WT-1, но не ограничивается этими примерами.

[0048] Трансмембранный домен (ii) представляет собой полипептид, служащий областью для фиксации CAR на клеточной мембране Т-клеток. Примеры трансмембранного домена могут включать BTLA, CD3 ϵ , CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, 4-1BB (CD137), CTLA-4, GITR, ICOS, LAG3, OX40, SLAMF4 (CD244, 2B4), или трансмембранные домены, происходящие от α - или β -цепи Т-клеточного рецептора. Альтернативно, могут быть также использованы мутантные трансмембранные домены, имеющие аминокислотную последовательность, которая на 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более или 99% или более гомологична природной аминокислотной последовательности вышеупомянутого трансмембранного домена. В одном варианте осуществления изобретения, в качестве такого трансмембранного домена предпочтительным является трансмембранный домен CD8.

[0049] К трансмембранному домену может быть присоединена шарнирная область,

которая представляет собой пептид (олигопептид или полипептид), состоящий из любой аминокислотной последовательности, имеющей длину от 1 до 100 аминокислот, а предпочтительно от 10 до 70 аминокислот. Примеры шарнирной области могут включать шарнирные области, происходящие от CD3, CD8, KIR2DS2 или IgG4, IgD или других иммуноглобулинов. Альтернативно, могут быть также использованы мутантные шарнирные области, имеющие аминокислотную последовательность, которая на 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, или 99% или более гомологична природным аминокислотным последовательностям вышеупомянутых шарнирных областей. В одном варианте осуществления изобретения, в качестве такой шарнирной области предпочтительной является шарнирная область CD8.

[0050] Сигнальный домен (iii), который индуцирует активацию Т-клеток, представляет собой полипептид, служащий областью для передачи сигналов внутри Т-клеток, если одноцепочечное антитело распознает антиген поверхности раковых клеток и связывается с ним. Примеры сигнального домена могут включать один или более внутриклеточных доменов, выбранных из группы, состоящей из молекул МНС класса I, белков рецепторов TNF, иммуноглобулин-подобных белков, рецепторов цитокинов, интегринов, рецепторов активированных NK-клеток, ловушко-подобных рецепторов, B7-H3, BAFFR, BTLA, BY55 (CD160), CD2, CD3 ζ , CD4, CD7, CD8 α , CD8 β , CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD18, CD19, CD19a, CD27, CD28, CD29, CD30, CD40, CD49a, CD49D, CD49f, CD69, CD84, CD96 (Tactile), CD103, 4-1BB (CD137), CDS, CEACAM1, CRTAM, CNAM1 (CD226), DAP10, γ -цепи, ассоциированной с Fc-рецептором, GADS, GITR, HVEM (LIGHTR), IA4, ICAM-1, ICOS (CD278), IL2R β , IL2R γ , IL7R α , ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB1, ITGB2, ITGB7, KIRDS2, Ly9 (CD229), LAT, LFA-1 (CD11a/CD18), LIGHT, LTBR, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), OX40, PAG/Cbp, PSGL1, SELPLG (CD162), SEMA4D (CD100), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), SLAMF4 (CD244, 2B4), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAMF7, SLAMF8 (BLAME), SLP-76, TNFR2, TRANCE/RANKL, VLA1 и VLA-6. Альтернативно, могут быть также использованы мутантные сигнальные домены (внутриклеточные домены), имеющие аминокислотную последовательность, которая на 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, или 99% или более гомологична природной аминокислотной последовательности вышеупомянутого сигнального домена (внутриклеточного домена). В одном варианте осуществления изобретения, сигнальный домен предпочтительно содержит три внутриклеточных домена: CD28, 4-1BB и CD3 ζ .

[0051] В случае, если сигнальный домен содержит множество внутриклеточных доменов, то внутриклеточные домены могут быть связаны друг с другом посредством линкерных пептидов (олигопептидов или полипептидов), состоящих из 2-10 аминокислот. Примеры таких линкерных пептидов могут включать пептид, состоящий из непрерывной последовательности глицин-серин.

[0052] Между каждым одноцепочечным антителом и трансмембранным доменом и каждым трансмембранным доменом и сигнальным доменом может присутствовать спейсерная область, которая представляет собой пептид (олигопептид или полипептид), состоящий из любой аминокислотной последовательности, имеющей длину от 1 до 100 аминокислот, а предпочтительно от 10 до 50 аминокислот. Примеры спейсерной области могут включать пептид, состоящий из непрерывной последовательности глицин-серин.

[0053] Аминокислотная последовательность вышеупомянутого CAR, экспрессируемого Т-клеткой согласно изобретению, может быть соответствующим образом определена в зависимости от применения Т-клетки, а обычно, ее функций в качестве активного компонента лекарственного средства для лечения рака. В качестве аминокислотной последовательности одноцепочечного антитела (i) против антигена клеточной поверхности раковых клеток, в настоящем изобретении могут быть использованы различные известные аминокислотные последовательности, и информация о таких аминокислотных последовательностях также может быть использована в настоящем изобретении. Альтернативно, новое антитело против антигена клеточной поверхности раковых клеток-мишеней может быть получено обычным методом, и информация, полученная путем определения аминокислотной последовательности нового антитела (предпочтительно вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи, а в частности, CDR) может быть использована в настоящем изобретении. Кроме того, различные аминокислотные последовательности, полученные от человека и млекопитающих, не являющихся человеком, известны как аминокислотные последовательности трансмембранного домена (ii) и сигнального домена активации Т-клеток (iii), и такие аминокислотные последовательности также зарегистрированы в базах данных, таких как база данных NCBI (Национального Центра Биотехнологической Информации; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) и UniProt (Универсальный ресурс по белкам; <https://www.uniprot.org>). Следовательно, такая информация может быть также использована в настоящем изобретении.

[0054] (2) Цитокин

Цитокин, экспрессируемый Т-клеткой согласно изобретению, представляет собой по меньшей мере один цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-15, IL-18, IL-21 и IL-27. Т-клетка согласно изобретению может экспрессировать любой из четырех вышеупомянутых цитокинов или два или более из них.

[0055] IL-15 представляет собой цитокин, имеющий функции, связанные с выживанием и активацией Т-клеток, дифференцировкой в Т-клетки памяти, активацией НК-клеток и т.п. В настоящем изобретении, термин «IL-15» включает не только полноразмерный природный белок IL-15, но также и его различные варианты, при условии, что будут сохраняться функции IL-15 в отношении действия и эффекта согласно изобретению. То есть, в настоящем изобретении, «IL-15» включает не только полноразмерный белок (полипептид), состоящий из аминокислотной последовательности природного IL-15, но также его часть (функциональный неполный полипептид) и

варианты всего или части природного IL-15, в которых одна или более аминокислотных последовательностей были deletированы, заменены или добавлены к природной аминокислотной последовательности (предпочтительно в пределах интервала, имеющего описанную ниже гомологию), и, кроме того, полноразмерный природный IL-15 или его часть или его варианты, связанные с другими белками и образующие слитый белок (например, связанные с полноразмерным IL-15R α или с его частью и образующие слитый белок). В настоящем изобретении, термин Т-клетка «экспрессирует IL-15» означает, что Т-клетка экспрессирует IL-15 в различных формах, как описано выше (в виде полноразмерного белка или его части, имеющих природную аминокислотную последовательность или ее варианты, которые могут присутствовать, а могут и не присутствовать, в форме гибридных белков), при условии, что будут сохраняться действие и эффект согласно изобретению.

[0056] Примеры IL-15 включают следующие четыре варианта осуществления изобретения. Все они являются известными (см. выше, непатентный документ 2, непатентный документ 3, непатентный документ 4 и патентный документ 4). Однако, IL-15, который может быть использован в настоящем изобретении, не ограничивается этими конкретными примерами, и могут быть также использованы различные IL-15, модифицированные в соответствии с присутствием или отсутствием и типами сигнальных пептидов и линкеров в последовательностях; порядком расположения элементов и другими аспектами (далее эти IL-15 будут также называться «модифицированным» IL-15).

[0057] Первый вариант IL-15: IL-15LSP/IL-15 (далее также обозначаемый «IL15_{LSP}»).

«IL-15LSP» представляет собой длинноцепочечный сигнальный пептид, состоящий из 29 аминокислот и связывающийся с N-концевой стороной IL-15 в первом варианте осуществления изобретения. Экспрессия IL-15 согласно первому варианту осуществления изобретения усиливает противоопухолевую активность CAR-T-клеток. Термин «IL-15LSP» также включает не только весь полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности природного IL-15LSP, но также его часть (функциональный неполный полипептид) и варианты полноразмерного или части природного IL-15LSP, в котором одна или множество аминокислотных последовательностей были deletированы, заменены или добавлены к природной аминокислотной последовательности (предпочтительно в пределах интервала, имеющего описанную ниже гомологию). В качестве примера модифицированного типа первого варианта осуществления изобретения, может быть упомянут «IL-15LSP», который был заменен на «IL-2SP» (сигнальный пептид IL-2, который может представлять собой полноразмерный природный белок или его часть или его варианты, например IL15LSP).

[0058] Второй вариант IL-15: внеклеточный домен IL-15/IL-15R α (далее также называемый «IL15_{RA}»)

Термин «внеклеточный домен IL-15R α » означает часть IL-15R α (цепи α рецептора интерлейкина 15), за исключением трансмембранного домена и внутриклеточного домена.

Внеклеточный домен IL-15R α включает домен sushi (мотив, общий для различных связывающихся белков). Термин «внеклеточный домен IL-15R α » также включает не только полноразмерный полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности природного внеклеточного домена IL-15R α , но также его часть (функциональный неполный полипептид) и варианты полноразмерного природного IL-15R α или его части, в которой одна или множество аминокислотных последовательностей были делетированы, заменены или добавлены к природной аминокислотной последовательности (предпочтительно в пределах интервала, имеющего описанную ниже гомологию). Во втором варианте осуществления изобретения, внеклеточный домен IL-15R α обычно связывается с N-концевой стороной IL-15 посредством линкера (например, глицин-серинового линкера, состоящего из 26 аминокислот). Во втором варианте, IL-2SP (сигнальный пептид IL-2, который может представлять собой полноразмерный природный белок или его часть или варианты) обычно связывается с N-концевой стороной IL-15 вместо IL-15LSP. Второй вариант относится к секреторному типу и представляет собой агонист, который прочно связывается с IL-15R β (β -цепи рецептора интерлейкина 15, которая является общей для рецептора интерлейкина 2) и γ c (γ -цепи, которая является общей для рецептора интерлейкина 2, 4, 7, 9, 15, 21 или т.п.).

[0059] Третий вариант IL-15: IL-15/полноразмерный IL-15R α (далее также называемый «mbIL15R α »)

«Полноразмерный IL-15R α » включает внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен IL-15R α , и обычно связывается с C-концевой стороной IL-15 посредством линкера (например, глицин-серинового линкера, состоящего из 20 аминокислот) в третьем варианте. Термин «полноразмерный IL-15R α » также включает не только весь белок (полипептид), состоящий из аминокислотной последовательности полноразмерного природного IL-15R α , но также и варианты полноразмерного природного IL-15R α , в которых одна или более аминокислотных последовательностей были делетированы, заменены или добавлены к природной аминокислотной последовательности (предпочтительно в пределах интервала, имеющего описанную ниже гомологию). Кроме того, IL-2SP (который может представлять собой полноразмерный природный белок или его часть или его варианты) обычно связывается с N-концевой стороной IL-15 вместо IL-15LSP также и в третьем варианте осуществления изобретения. Третий вариант осуществления изобретения относится к мембраносвязанному типу, и его экспрессия усиливает противоопухолевую активность CAR-T-клеток.

[0060] Четвертый вариант IL-15: IL-15R α sushi/IL-15 (далее также называемый «sushiIL15»).

В четвертом варианте осуществления изобретения, IL-15R α , содержащий сигнальный пептид и домен sushi, обычно связывается с N-концевой стороной IL-15 посредством линкера (например, линкера, состоящего из 20 аминокислот). Термин «IL-15R α sushi» также включает не только полноразмерный полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности природного IL-15R α sushi, но также его часть

(функциональный неполный полипептид) и варианты полноразмерного природного IL-15R α sushi или его часть, в которой одна или множество аминокислотных последовательностей были deletированы, заменены или добавлены к природной аминокислотной последовательности (предпочтительно в пределах интервала, имеющего описанную ниже гомологию). Четвертый вариант относится к секреторному типу.

[0061] В настоящем изобретении, IL-15 предпочтительно представляет собой IL-15 (полноразмерный белок или часть белка, имеющего природную аминокислотную последовательность или его варианты) в форме слитого белка с IL-15R α (полноразмерного белка или его части, имеющей природную аминокислотную последовательность или ее варианты) с учетом персистенции и пролиферации клеток, как описано ниже в Примерах (в Экспериментальных примерах). Так, например, предпочтительными являются вышеупомянутые второй, третий или четвертый варианты или их модифицированные типы, а более предпочтительными являются вышеупомянутые третий и четвертый варианты или их модифицированные типы.

[0062] IL-18 представляет собой цитокин, имеющий функции, ассоциированные с активацией Т-клеток, активацией НК-клеток, активацией дендритных клеток и т.п. В настоящем изобретении, термин «IL-18» включает не только полноразмерный природный белок IL-18, но также и его различные варианты, при условии, что будут сохраняться функции IL-18 в отношении действия и эффекта согласно изобретению. То есть, в настоящем изобретении, «IL-18» включает не только полноразмерный белок (полипептид), состоящий из аминокислотной последовательности природного IL-18, но также его часть (функциональный неполный полипептид) и варианты полноразмерного или части природного IL-18, в которых одна или более аминокислотных последовательностей были deletированы, заменены или добавлены к природной аминокислотной последовательности (предпочтительно в пределах интервала, имеющего описанную ниже гомологию), и, кроме того, полноразмерный природный IL-18 или его часть или его варианты, связанные с другими белками с образованием слитого белка. В настоящем изобретении, термин «экспрессирует IL-18», если он относится к Т-клетке, включает экспрессию IL-18 в различных формах, как описано выше (в виде полноразмерного белка или его части, имеющих природную аминокислотную последовательность или ее варианты, которые могут присутствовать, а могут и не присутствовать, в форме гибридных белков), при условии, что будут сохраняться действие и эффект согласно изобретению.

[0063] IL-21 представляет собой цитокин, имеющий функции, ассоциированные с функциями CD8⁺-Т-клеток, дифференцировкой CD8⁺-Т-клеток в Т-клетки памяти, с выживанием НК-клеток и т.п. В настоящем изобретении, термин «IL-21» включает не только полноразмерный природный белок IL-21, но также и его различные варианты, при условии, что будут сохраняться функции IL-21 в отношении действия и эффекта согласно изобретению. То есть, в настоящем изобретении, «IL-21» включает не только полноразмерный белок (полипептид), состоящий из аминокислотной последовательности

природного IL-21, но также его часть (функциональный неполный полипептид) и варианты полноразмерного природного IL-21 или его части, в которой одна или множество аминокислотных последовательностей были deletированы, заменены или добавлены к природной аминокислотной последовательности (предпочтительно в пределах интервала, имеющего описанную ниже гомологию), и, кроме того, полноразмерный природный IL-21 или его часть, связанные с другими белками и образующие слитый белок. В настоящем изобретении, термин «экспрессирует IL-21», если он относится к Т-клетке, включает экспрессию IL-21 в различных формах, как описано выше (в виде полноразмерного белка или его части, имеющих природную аминокислотную последовательность или ее варианты, которые могут присутствовать, а могут и не присутствовать, в форме гибридных белков), при условии, что будут сохраняться действие и эффект согласно изобретению.

[0064] IL-27 представляет собой цитокин, имеющий функции, ассоциированные с выживанием Т-клеток, активацией НК-клеток, ингибированием пролиферации и ангиогенеза опухоли и т.п. В настоящем изобретении, термин «IL-27» включает не только полноразмерный природный белок IL-27, но также и его различные варианты, при условии, что будут сохраняться функции IL-27 в отношении действия и эффекта согласно изобретению. То есть, в настоящем изобретении, «IL-27» включает не только полноразмерный белок (полипептид), состоящий из аминокислотной последовательности природного IL-27, но также его часть (функциональный неполный полипептид) и варианты полноразмерного или части природного IL-18, в которой одна или множество аминокислотных последовательностей были deletированы, заменены или добавлены к природной аминокислотной последовательности (предпочтительно в пределах интервала, имеющего описанную ниже гомологию), и, кроме того, полноразмерный природный IL-27 или его часть, связанные с другими белками и образующие слитый белок. В настоящем изобретении, термин «экспрессирует IL-27», если он относится к Т-клетке, включает экспрессию IL-27 в различных формах, как описано выше (в виде полноразмерного белка или его части, имеющих природную аминокислотную последовательность или ее варианты, которые могут присутствовать, а могут и не присутствовать, в форме гибридных белков), при условии, что будут сохраняться действие и эффект согласно изобретению.

[0065] Примеры IL-27 включают слитый белок (одноцепочечный белок), где p28 и EB13 (ген 3, индуцированный вирусом Эпштейна-Барра), которые представляют собой две субъединицы, составляющие IL-27, связаны линкером, например, линкером, состоящим из 20-30 аминокислот, таким как (G₄S)₃ (см. выше, например, непатентный документ 5), или линкером, состоящим из GSTSGSGKPGSGEGSTKG (J. Immunol. 183, 6217-26 (2009)). Каждый из терминов «p28» и «EB13» также включает весь полипептид или его часть с природной аминокислотной последовательностью или ее вариантами.

[0066] Аминокислотные последовательности вышеупомянутых цитокинов, экспрессируемых Т-клеткой согласно изобретению, могут быть соответствующим

образом определены в зависимости от применения Т-клетки (CAR-T-клетки) согласно изобретению, а обычно, в зависимости от ее функций в качестве активного компонента лекарственного средства для лечения рака, с учетом влияния CAR-T-клеток на усиление противоопухолевой активности, включая повышение персистенции и пролиферации CAR-T-клеток. Аминокислотные последовательности природных IL-15, IL-18, IL-21, IL-27 и IL-15R α , происходящих от человека и млекопитающих, кроме человека (например, мышей), являются известными и также зарегистрированы в базах данных, таких как NCBI и UniProt, а поэтому, в настоящем изобретении может быть также использована информация об этих последовательностях. Так, например, SEQ ID NO: 18 представляет собой аминокислотную последовательность природного человеческого IL-15 (полноразмерного IL-15, включая сигнальный пептид и пропептидные части), зарегистрированного как UniProtKB-P40933, а SEQ ID NO: 19 представляет собой аминокислотную последовательность природного человеческого IL-15R α (полноразмерного IL-15R α , включая сигнальный пептид, домен sushi, внеклеточный домен и т.п.), зарегистрированную как UniProtKB-Q13261. В описанном ниже варианте осуществления изобретения, в котором природная мишиная аминокислотная последовательность была заменена на природную человеческую аминокислотную последовательность в аминокислотной последовательности с предварительно определенным идентификационным номером последовательности, можно сослаться на аминокислотные последовательности соответствующих частей, включенные в SEQ ID NO: 18 и 19. Кроме того, различные варианты, гибридные белки с другими белками и их модифицированные типы IL-15, IL-18, IL-21, IL-27 и IL-15R α являются известными и информация об их аминокислотных последовательностях может быть также использована в настоящем изобретении.

[0067] Примеры вариантов IL-15, IL-18, IL-21 и IL-27 включают варианты, в которых аминокислотная последовательность на 80% или более, на 85% или более, на 90% или более, на 91% или более, на 92% или более, на 93% или более, на 94% или более, на 95% или более, на 96% или более, на 97% или более, на 98% или более, или 99% или более, в целом или в определенной области (в домене) гомологична их природным аминокислотным последовательностям, происходящим от человека или млекопитающих, кроме человека, например, а в случае, когда сигнальный пептид был заменен, как показано ниже, она гомологична области, за исключением сигнального пептида. В качестве варианта, имеющего гомологию в таком диапазоне с природной аминокислотной последовательностью, происходящей от одного вида, может быть использована природная аминокислотная последовательность, происходящая от другого вида (по существу, включенная). Кроме того, сигнальный пептид в последовательности каждого из IL-15, IL-18, IL-21 и IL-27 может быть заменен известным сигнальным пептидом. В одном аспекте настоящего изобретения, аминокислотная последовательность природного мышинового IL-15, IL-18, IL-21 или IL-27 может быть заменена аминокислотной последовательностью варианта, имеющего такую гомологию; аминокислотной последовательностью

природного человеческого IL-15, IL-18, IL-21 или IL-27, которая по существу применима к такому варианту или его дополнительному варианту в аминокислотных последовательностях белков (полипептидов), экспрессируемых нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO: 4: фрагмента ДНК IL15_{LSP}_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #3), SEQ ID NO: 6: фрагмента ДНК _sIL15_{RA}_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #4), SEQ ID NO: 8: фрагмента ДНК _{mb}IL15_{RA}_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #5), SEQ ID NO: 10: фрагмента ДНК _{sushi}IL15_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #6), SEQ ID NO: 12: фрагмента ДНК IL-18_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #7), SEQ ID NO: 14: фрагмента ДНК IL-21_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #8), и SEQ ID NO: 16: фрагмента ДНК _{sc}IL27_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #9), или в аминокислотных последовательностях слитого белка, содержащего SEQ ID NO: 5: IL15_{LSP}, слитого белка, содержащего SEQ ID NO: 7: _sIL15_{RA}, слитого белка, содержащего SEQ ID NO: 9: _{mb}IL15_{RA}, слитого белка, содержащего SEQ ID NO: 11: _{sushi}IL15, слитого белка, содержащего SEQ ID NO: 13: IL-18, слитого белка, содержащего SEQ ID NO: 15: IL-21, и слитого белка, содержащего SEQ ID NO: 17: _{sc}IL27.

[0068] Примеры вариантов внеклеточного домена IL-15R α , полноразмерного IL-15R α и IL-15R α sushi включают варианты, имеющие аминокислотную последовательность, которая на 80% или более, на 85% или более, на 90% или более, на 91% или более, на 92% или более, на 93% или более, на 94% или более, на 95% или более, на 96% или более, на 97% или более, на 98% или более, или 99% или более гомологична их природным аминокислотным последовательностям, происходящим от человека или млекопитающих, кроме человека. В одном аспекте настоящего изобретения, аминокислотная последовательность природного мышинового внеклеточного домена IL-15R α , полноразмерного IL-15R α и IL-15R α sushi может быть заменена аминокислотной последовательностью варианта, имеющего такую гомологию; аминокислотной последовательностью природного человеческого внеклеточного домена IL-15R α , полноразмерного IL-15R α или IL-15R α sushi, которые по существу применимы к такому варианту, или его дополнительному варианту в аминокислотных последовательностях белков (полипептидов), экспрессируемых нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO: 4: фрагмента ДНК IL15_{LSP}_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #3), SEQ ID NO: 6: фрагмента ДНК _sIL15_{RA}_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #4), SEQ ID NO: 8: фрагмента ДНК _{mb}IL15_{RA}_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #5), SEQ ID NO: 10: фрагмента ДНК _{sushi}IL15_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #6), или в аминокислотных последовательностях слитого белка, содержащего SEQ ID NO: 5: IL15_{LSP}, слитого белка, содержащего SEQ ID NO: 7: _sIL15_{RA}, слитого белка, содержащего SEQ ID NO: 9: _{mb}IL15_{RA}, и слитого белка, содержащего SEQ ID NO: 11: _{sushi}IL15.

[0069] IL-15, IL-18, IL-21 и IL-27 предпочтительно происходят от человека или млекопитающих, не являющихся человеком (например, мышей), того же типа, от которого происходят Т-клетки (или рецепторы IL-15, IL-18, IL-21 и IL-27 Т-клеток), используемые для продуцирования Т-клеток согласно изобретению. Части, не являющиеся цитокинами

IL-15, IL-18, IL-21 и IL-27 (например, IL-15R α), содержащимися в гибридных белках IL-15, IL-18, IL-21 и IL-27, соответственно, также предпочтительно происходят от человека или млекопитающих, не являющихся человеком того же типа, от которого происходят Т-клетки, используемые для продуцирования Т-клетки согласно изобретению. В одном из аспектов настоящего изобретения, аминокислотная последовательность природного мышинового IL-15, IL-18, IL-21 или IL-27 или аминокислотная последовательность внеклеточного домена IL-15R α , полноразмерного IL-15R α или IL-15R α sushi могут быть заменены их природной человеческой аминокислотной последовательностью в аминокислотных последовательностях белков (полипептидов), экспрессируемых нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO: 4: фрагмента ДНК IL15_{LSP}_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #3), SEQ ID NO: 6: фрагмента ДНК sIL15_{RA}_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #4), SEQ ID NO: 8: фрагмента ДНК mbIL15_{RA}_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #5), SEQ ID NO: 10: фрагмента ДНК sushiIL15_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #6), SEQ ID NO: 12: фрагмента ДНК IL-18_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #7), SEQ ID NO: 14: фрагмента ДНК IL-21_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #8), и SEQ ID NO: 16: фрагмента ДНК scIL27_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #9), или в аминокислотных последовательностях слитого белка, содержащего SEQ ID NO: 5: IL15_{LSP}, слитого белка, содержащего SEQ ID NO: 7: sIL15_{RA}, слитого белка, содержащего SEQ ID NO: 9: mbIL15_{RA}, слитого белка, содержащего SEQ ID NO: 11: sushiIL15, слитого белка, содержащего SEQ ID NO: 13: IL-18, слитого белка, содержащего SEQ ID NO: 15: IL-21, и слитого белка, содержащего SEQ ID NO: 17: scIL27.

[0070] (3) Хемокин

Хемокин, экспрессируемый Т-клеткой согласно изобретению, представляет собой CCL19. CCL19, в основном, продуцируется дендритными клетками и макрофагами лимфатических узлов и обладает функцией индуцирования доставки Т-клеток, В-клеток и зрелых дендритных клеток посредством их рецептора CCR7. То есть, в настоящем изобретении, «CCL19» включает не только полноразмерный белок (полипептид), состоящий из аминокислотной последовательности природного CCL19, но также его часть (функциональный неполный полипептид) и варианты полноразмерного природного CCL19 или его части, в которой одна или множество аминокислотных последовательностей были делетированы, заменены или добавлены к природной аминокислотной последовательности (предпочтительно в пределах интервала, имеющего описанную ниже гомологию).

[0071] Аминокислотная последовательность вышеупомянутого хемокина, экспрессируемого Т-клеткой согласно изобретению, может быть соответствующим образом определена в зависимости от применения Т-клетки (CAR-Т-клетки) согласно изобретению, а обычно, в зависимости от ее функции в качестве активного компонента лекарственного средства для лечения рака с учетом влияния CAR-Т-клетки на усиление противоопухолевой активности, включая повышение персистенции и пролиферации CAR-Т-клетки. Аминокислотные последовательности природного CCL19, происходящие

от человека или млекопитающих, не являющихся человеком (например, мышей), являются известными и также зарегистрированы в базах данных, таких как NCBI и UniProt, а поэтому их информация может быть также использована в настоящем изобретении. Кроме того, в настоящем изобретении также может использоваться информация об аминокислотных последовательностях известных вариантов CCL19.

[0072] Примеры вариантов CCL19 включают варианты, в которых аминокислотная последовательность на 80% или более, на 85% или более, на 90% или более, на 91% или более, на 92% или более, на 93% или более, на 94% или более, на 95% или более, на 96% или более, на 97% или более, на 98% или более, или 99% или более, по всей длине или в определенной области гомологична аминокислотным последовательностям природного CCL19, происходящего от человека или млекопитающих, кроме человека. В одном аспекте настоящего изобретения, аминокислотная последовательность природного мышинового CCL19 может быть заменена аминокислотной последовательностью варианта, имеющего такую гомологию, аминокислотной последовательностью природного человеческого CCL19, которая по существу применима к такому варианту или его дополнительному варианту в аминокислотных последовательностях белков (полипептидов), экспрессируемых нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO: 4: фрагмента ДНК IL15_{LSP}_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #3), SEQ ID NO: 6: фрагмента ДНК IL15_{RA}_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #4), SEQ ID NO: 8: фрагмента ДНК mbIL15_{RA}_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #5), SEQ ID NO: 10: фрагмента ДНК sushiIL15_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #6), SEQ ID NO: 12: фрагмента ДНК IL-18_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #7), SEQ ID NO: 14: фрагмента ДНК IL-21_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #8), и SEQ ID NO: 16: фрагмента ДНК scIL27_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #9).

[0073] CCL19 предпочтительно происходит от человека или млекопитающих, не являющихся человеком, (например, мышей) того же типа, от которого происходит Т-клетка, используемая для продуцирования Т-клетки согласно изобретению (рецептора CCL19 Т-клетки) или ее вариантов.

[0074] Далее приводится подробное описание лекарственного средства согласно изобретению.

[0075] Лекарственное средство согласно изобретению содержит Т-клетку согласно изобретению, как описано выше, и может также содержать другие компоненты, если это необходимо. Специалисты в данной области могут надлежащим образом приготовить лекарственное средство согласно изобретению с использованием Т-клеток согласно изобретению с учетом цели применения (цели лечения) и лекарственной формы.

[0076] Лекарственное средство согласно изобретению, в основном, представляет собой лекарственное средство (противораковое средство) для лечения рака, ассоциированного с антигеном поверхности раковых клеток (антигеном, специфичным для рака), на который нацелен CAR, экспрессируемый Т-клеткой согласно изобретению. В соответствии с этим, тип рака, на который нацелено лекарственное средство согласно

изобретению, не имеет конкретных ограничений, при условии, что раковые клетки, экспрессирующие антиген, на который нацелен CAR, присутствуют в раковой ткани, и что определенный уровень терапевтического эффекта будет достигаться с использованием Т-клеток согласно изобретению. Примеры рака, на который может быть нацелено лекарственное средство согласно изобретению, могут включать такие виды рака, как аденокарцинома, плоскоклеточная карцинома, плоскоклеточная аденокарцинома, недифференцированный рак, крупноклеточный рак, мелкоклеточный рак, рак кожи (например, меланома и рак клеток Меркеля), рак молочной железы, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак влагалища, рак шеи, рак головы и шеи, рак матки, рак шейки матки, рак печени, рак почек, рак поджелудочной железы, рак селезенки, рак легких, немелкоклеточный рак легких, рак трахеи, рак бронхов, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак тонкой кишки, рак прямой и ободочной кишки, рак желудка, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак яичек, рак яичников, рак фаллопиевых труб и рак носоглотки; рак костной ткани, рак хрящевой ткани, рак жировой ткани, рак мышечной ткани, рак сосудистой ткани и рак ткани кровеносных органов; саркомы, такие как хондросаркома, саркома Юинга, рабдомиосаркома, злокачественная гемангиоэндотелиома, злокачественная опухоль, остеосаркома и саркома мягких тканей; бластомы, такие как гепатобластома, медуллобластома, нефробластома, нейробластома, панкреатобластома, легочноплевральная бластома и ретинобластома; опухоли эмбриональных клеток; лимфома; лейкоз, острый миелоидный лейкоз и множественная миелома. Предпочтительные примеры включают карциномы, чувствительные к НК-клеткам (такие как меланома, рак клеток Меркеля, рак прямой и ободочной кишки, рак почек, рак молочной железы, рак яичников, рак фаллопиевых труб, рак шейки матки, рак печени, рак легких, немелкоклеточный рак легких, рак головы и шеи, рак тонкой кишки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак прямой кишки, рак поджелудочной железы, саркома Юинга, рабдомиосаркома, рак носоглотки, рак пищевода, рак желчных путей, нейробластома, остеосаркома, острый миелоидный лейкоз, множественная миелома, лимфома и лейкоз). Более предпочтительные примеры включают меланому, рак прямой и ободочной кишки, рак почек, множественную миелому, лимфому и лейкоз.

[0077] Примеры компонентов, которые могут содержаться в лекарственном средстве согласно изобретению, кроме Т-клеток, включают фармацевтически приемлемые добавки, а более конкретно, физиологический раствор, забуференный физиологический раствор, среды для культивирования клеток, декстрозу, воду для инъекций, глицерин, этанол, стабилизаторы, солубилизаторы, поверхностно-активные вещества, буферы, консерванты, изотонические агенты, наполнители и лубриканты.

[0078] Лекарственное средство согласно изобретению может быть введено индивидууму, нуждающемуся в лечении рака (например, больным раком и животным с раком), таким же способом, который применяется для введения известных CAR-экспрессирующих Т-клеток. Примеры способа введения включают внутриопухолевые, внутривенные, внутриартериальные, внутримышечные, подкожные и внутрибрюшинные

инъекции.

[0079] Количество Т-клеток согласно изобретению, которое должно содержаться в лекарственном средстве согласно изобретению, может быть соответствующим образом скорректировано, например, в зависимости от цели применения, лекарственной формы, предполагаемого терапевтического эффекта и т.п. с учетом типа, области локализации и тяжести рака, возраста, массы тела и состояния индивидуума, подвергаемого лечению, и т.п. Так, например, лекарственное средство согласно изобретению может быть приготовлено так, чтобы Т-клетки согласно изобретению были введены в количестве обычно от 1×10^4 до 1×10^{10} , предпочтительно, от 1×10^5 до 1×10^9 , а более предпочтительно от 5×10^6 до 5×10^8 в одной дозе.

[0080] Интервал между введениями лекарственного средства согласно изобретению не имеет конкретных ограничений, и может быть соответствующим образом скорректирован с учетом количества Т-клеток согласно изобретению, вводимых за один раз, и т.п. Лекарственное средство согласно изобретению может быть введено независимо, например, 4 раза, 3 раза, два раза или один раз в день, через день, через каждые 3 дня, через каждые 4 дня, через каждые 5 дней, через каждые 6 дней, один раз в неделю, через каждые 8 дней, через каждые 9 дней, через каждые 10 дней, два раза в неделю, один раз в месяц или два раза в месяц.

[0081] Лекарственное средство согласно изобретению (противораковое средство) может быть использовано в комбинации с известными противораковыми средствами. Примеры противораковых средств могут включать алкилирующие лекарственные средства, такие как циклофосфамид, бендамустин, иосфамид и дакарбазин; антиметаболиты, такие как пентостатин, флударабин, кладрибин, метотрексат, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин и эноцитабин; лекарственные средства для молекулярного таргетинга, такие как ритуксимаб, цетуксимаб и трастузумаб; ингибиторы киназ, такие как иматиниб, gefитиниб, эрлотиниб, афатиниб, дазатиниб, сунитиниб и траметиниб; ингибиторы протеасом, такие как бортезомиб; ингибиторы кальцинейрина, такие как циклоспорин и такролимус; противоопухолевые антибиотики, такие как идарубицин и доксорубицин, митомицин С; растительные алкалоиды, такие как иринотекан и этопозид; препараты на основе платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; гормональные терапевтические препараты, такие как тамоксифен и бикалутамид; и иммунорегуляторные препараты, такие как интерферон, ниволумаб и пембролизумаб.

[0082] Применение лекарственного средства согласно изобретению в комбинации с дополнительным противораковым средством может быть осуществлено в любой форме: (а) с использованием дополнительного противоракового средства, а затем лекарственного средства согласно изобретению, (б) с использованием лекарственного средства согласно изобретению и дополнительного противоракового средства одновременно, или (с) с использованием лекарственного средства согласно изобретению, а затем дополнительного противоракового средства. Если лекарственное средство согласно изобретению используется в комбинации с дополнительным противораковым средством, то ожидается,

что терапевтический ответ на рак будет более высоким, а побочные эффекты, вызванные противораковыми средствами, могут быть уменьшены за счет снижения количества введений или дозы лекарственного средства согласно изобретению и/или другого противоракового средства.

[0083] Далее приводится подробное описание экспрессионного вектора согласно изобретению.

[0084] Экспрессионный вектор согласно изобретению содержит: (1) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR; (2) нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере один цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-15, IL-18, IL-21 и IL-27; и (3) нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19.

[0085] В настоящем изобретении, термин «содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-15», если он относится к экспрессионному вектору, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую не только полноразмерный природный белок IL-15, но также IL-15 в различных формах, как описано выше. В случае экспрессионного вектора, термины «содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-18», «содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-21», «содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-27», или «содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19» имеют то же самое значение.

[0086] «Нуклеиновая кислота» может представлять собой любые молекулы, полученные посредством полимеризации нуклеотидов и молекул, имеющих функции, эквивалентные нуклеотидам. Примеры могут включать РНК, которая представляет собой полимер из рибонуклеотидов; ДНК, которая представляет собой полимер из дезоксирибонуклеотидов; полимер, содержащий смесь рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов, и нуклеотидный полимер, содержащий аналоги нуклеотидов. Кроме того, нуклеиновая кислота может представлять собой нуклеотидный полимер, содержащий производные нуклеиновой кислоты. Кроме того, нуклеиновая кислота может представлять собой одноцепочечную нуклеиновую кислоту или двухцепочечную нуклеиновую кислоту. Кроме того, двухцепочечная нуклеиновая кислота также включает двухцепочечную нуклеиновую кислоту, в которой одна цепь гибридизируется с другой цепью в жестких условиях.

[0087] Аналоги нуклеотидов могут представлять собой любые молекулы с модификацией рибонуклеотида, дезоксирибонуклеотида, РНК или ДНК для повышения резистентности к нуклеазам, стабилизации, повышения аффинности к комплементарным цепям нуклеиновых кислот, увеличения проницаемости клеток или улучшения визуализации клеток по сравнению с РНК или ДНК. Аналоги нуклеотидов могут представлять собой природные молекулы или не-природные молекулы. Примеры таких аналогов включают нуклеотидные аналоги, модифицированные сахаром, и нуклеотидные аналоги, модифицированные фосфодиэфирными связями.

[0088] Аналоги нуклеотидов, модифицированные сахаром, могут представлять собой любой аналог, полученный путем добавления любого химического структурного

вещества или замены любым химическим структурным веществом части или всей химической структуры сахара нуклеотида. Конкретные примеры таких аналогов могут включать аналоги нуклеотидов с заменой на 2'-О-метил-рибозу; аналоги нуклеотидов с заменой на 2'-О-пропил-рибозу; аналоги нуклеотидов с заменой на 2'-метоксиэтоксирибозу; аналоги нуклеотидов с заменой на 2'-О-метоксиэтилрибозу; аналоги нуклеотидов с заменой на 2'-О-[2-(гуанидий)этил]рибозу; аналоги нуклеотидов с заменой на 2'-фторорибозу; перекрестносшитые искусственные нуклеиновые кислоты, имеющие две циклические структуры в результате введения перекрестносшитых структур в сахарную часть (мостиковые нуклеиновые кислоты) (BNA), а более конкретно, блокированные искусственные нуклеиновые кислоты, в которых атом кислорода в 2'-положении и атом углерода в 4'-положении были перекрестно сшиты посредством метилена (блокированные нуклеиновые кислоты) (LNA), и искусственные нуклеиновые кислоты, перекрестно сшитые посредством этилена (этиленовые мостиковые нуклеиновые кислоты) (ENA) [Nucleic Acid Research, 32, e175 (2004)] и, кроме того, пептид-содержащие нуклеиновые кислоты (PNA) [Acc. Chem. Res., 32, 624 (1999)], оксипептидные нуклеиновые кислоты (OPNA) [J. Am. Chem. Soc., 123, 4653 (2001)] и пептидные рибонуклеиновые кислоты (PRNA) [J. Am. Chem. Soc., 122, 6900 (2000)].

[0089] Аналоги нуклеотидов с модифицированной фосфодиэфирной связью могут представлять собой любой аналог, полученный путем добавления любого химического вещества или замены любым химическим веществом части или всей химической структуры фосфодиэфирной связи нуклеотида. Конкретные примеры этих аналогов могут включать нуклеотидные аналоги с замененными фосфоротиоатными связями, и нуклеотидные аналоги с замененными фосфорамидитными связями N3'-P5' [Cell Technology, 16, 1463-1473 (1997)] [метод с использованием РНКи и антисмысловых последовательностей, Kodansha Ltd. (2005)].

[0090] Производные нуклеиновой кислоты могут представлять собой любые молекулы, полученные путем добавления другого химического вещества к нуклеиновым кислотам для повышения резистентности к нуклеазам, стабилизации, повышения аффинности к комплементарным цепям нуклеиновых кислот, увеличения проницаемости клеток или улучшения визуализации клеток по сравнению с нуклеиновыми кислотами. Конкретные примеры таких аналогов могут включать производные с добавлением 5'-полиамина, производные с добавлением холестерина, производные с добавлением стероидов, производные с добавлением желчных кислот, производные с добавлением витаминов, производные с добавлением Cu_5 , производные с добавлением Cu_3 , производные с добавлением 6-FAM, и производные с добавлением биотина.

[0091] Экспрессионный вектор согласно изобретению должен обладать способностью продуцировать только Т-клетку согласно изобретению посредством контактирования с Т-клеткой или ее предшественником, введения в клетку и экспрессии предварительно определенного белка (полипептида), кодируемого этим вектором в Т-клетке. Этот вариант осуществления изобретения не имеет конкретных ограничений.

Специалисты в данной области могут самостоятельно сконструировать и получить экспрессионный вектор, способный экспрессировать желаемый белок (полипептид) в Т-клетке.

[0092] Экспрессионный вектор согласно изобретению может быть линейным или циклическим и может быть невирусным вектором, таким как плаزمид, вирусным вектором или транспозонным вектором.

[0093] Примеры вирусного вектора могут включать ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор и аденоассоциированный вирусный вектор. Предпочтительные примеры ретровирусного вектора могут включать вектор pMSGV (Tamada K. et al., ClinCancer Res 18: 6436-6445 (2002)) и вектор pMSCV (поставляемый от Takara Bio Inc). В случае использования ретровирусного вектора, гены, содержащиеся в векторе, включают в геном клетки-хозяина (Т-клетки согласно изобретению), а поэтому гены могут стабильно экспрессироваться в течение длительного периода времени.

[0094] В одном варианте осуществления изобретения, один экспрессионный вектор содержит все элементы (1) нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, (2) нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере один цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-15, IL-18, IL-21 и IL-27, и (3) нуклеиновой кислоты, кодирующей CCL19. В другом варианте осуществления изобретения, первый экспрессионный вектор содержит один или два из вышеупомянутых элементов (1)-(3), а второй экспрессионный вектор содержит оставшийся элемент. В другом варианте осуществления изобретения, первый экспрессионный вектор содержит вышеупомянутый элемент (1), второй экспрессионный вектор содержит вышеупомянутый элемент (2), а третий экспрессионный вектор содержит вышеупомянутый элемент (3). Соответственно, экспрессионный вектор согласно изобретению может означать комбинацию (набор) множества экспрессионных векторов, то есть, комбинацию вышеупомянутых первого и второго экспрессионных векторов или комбинацию вышеупомянутых первого, второго и третьего экспрессионных векторов, в зависимости от варианта. В случае, когда один экспрессионный вектор содержит множество элементов, порядок расположения этих элементов слева направо не имеет конкретных ограничений.

[0095] Нуклеотидные последовательности предварительно определенных трех элементов (CAR, цитокина и хемокина), содержащихся в экспрессионном векторе согласно изобретению, могут быть сконструированы так, чтобы они кодировали аминокислотные последовательности белков (полипептидов), соответственно, соответствующих белкам (полипептидам), выбранным в качестве элементов. Нуклеиновые кислоты (олигонуклеотиды), содержащиеся в экспрессионном векторе, могут быть получены путем химического синтеза олиго-ДНК или могут быть получены (клонированы) в виде кДНК.

[0096] Экспрессионный вектор согласно изобретению может содержать (в случае вышеупомянутых комбинаций множества экспрессионных векторов, каждый из них независимо может содержать) последовательности промоторов, терминаторов,

энхансеров, старт-кодонов, стоп-кодонов, сигналов полиаденилирования, сигналов ядерной локализации (NLS), сайтов множественного клонирования (MCS) и т.п., которые участвуют в экспрессии каждого гена, если это необходимо в дополнение к последовательностям (генам), кодирующим вышеупомянутые предварительно определенные элементы.

[0097] В одном варианте осуществления изобретения, в случае, если один экспрессионный вектор содержит два или более из трех вышеупомянутых элементов, то ген, кодирующий саморасщепляющийся пептид (пептид 2A) или IRES (внутренний сайт связывания с рибозимом), может быть встроен между этими элементами.

[0098] Пептид 2A представляет собой саморасщепляющийся пептид, происходящий от вируса, и имеет особенность, заключающуюся в том, что предварительно определенное положение (положение одного остатка от С-конца) в аминокислотной последовательности расщепляется в эндоплазматическом ретикулуме (Szymczak et al., *Expert Opin. Biol. Ther.*, 5 (5): 627-638 (2005)). Следовательно, гены, интегрированные до и после пептида 2A, будут экспрессироваться в клетке независимо друг от друга. Примеры пептида 2A включают пептиды, происходящие от пикорнавируса, ротавируса, вируса насекомых, афтовируса или вируса трипаносомы.

[0099] Экспрессионный вектор согласно изобретению может дополнительно содержать нуклеиновые кислоты (нуклеотидные последовательности), кодирующие «функциональные гены», такие как репортерный ген (обычно ген, кодирующий флуоресцентный белок), ген для отбора лекарственных средств и «ген-самоубийца».

[0100] В случае использования «гена резистентности к лекарственному средству» в качестве функционального гена, клетки, в которые вводят экспрессионный вектор согласно изобретению, содержащий ген резистентности к лекарственному средству, могут быть отобраны путем добавления предварительно определенного лекарственного средства в среду в способе получения CAR-T-клеток согласно изобретению. Примеры гена резистентности к лекарственному средству включают ген резистентности к канамицину, ген резистентности к ампициллину и ген резистентности к пурамицину. При этом, может быть использован один из этих генов или два или более из них.

[0101] В случае использования «гена, кодирующего флуоресцентный белок» в качестве функционального гена, T-клетки с введенным экспрессионным вектором согласно изобретению можно наблюдать на флуоресцентном микроскопе, или клетки с введенным экспрессионным вектором согласно изобретению могут быть отсортированы на проточном цитометре (на клеточном сортере) в способе получения CAR-T-клеток согласно изобретению. Типичным примером репортерного гена является ген, кодирующий флуоресцентный белок. Примеры «гена, кодирующего флуоресцентный белок» включают гены, кодирующие белки, флуоресцирующие в синем диапазоне спектра, такие как Sirius, BFP и EBFP; белки, флуоресцирующие в голубом диапазоне спектра, такие как mTurquoise, TagCFP, AmCyan, mTFP1, MidoriishiCyan и CFP; белки, флуоресцирующие в зеленом диапазоне спектра, такие как TurboGFP, AcGFP, TagGFP,

Azami-Green (например, hmAG1), ZsGreen, EmGFP, EGFP, GFP2 и HyPer; белки, флуоресцирующие в желтом диапазоне спектра, такие как TagYFP, EYFP, Venus, YFP, PhiYFP, PhiYFP-m, TurboYFP, ZsYellow и mBanana; белки, флуоресцирующие в оранжевом диапазоне спектра, такие как KusabiraOrange (например, hmKO2) и mOrange; белки, флуоресцирующие в красном диапазоне спектра, такие как TurboRFP, DsRed-Express, DsRed2, TagRFP, DsRed-Monomer, AsRed2 и mStrawberry; и белки, флуоресцирующие в ближнем инфракрасном диапазоне спектра, такие как TurboFP602, mRFP1, JRed, KillerRed, mCherry, HcRed, KeimaRed (например, hdKeimaRed), mRaspberry и mPlum. При этом, может быть использован любой из этих генов или два или более из них. В случае использования двух или более генов, кодирующих флуоресцентные белки, эти флуоресцентные белки предпочтительно должны излучать на различных длинах волн, что будет обеспечивать их соответствующую визуализацию.

[0102] В случае использования «гена-самоубийцы» в качестве функционального гена, количество Т-клеток согласно изобретению *in vivo* можно регулировать путем введения лекарственного средства, которое активирует функцию «гена-самоубийцы», в зависимости от курса лечения рака, например, на стадии, когда опухоль исчезла. Примеры «гена-самоубийцы» включают ген, кодирующий дифтерийный токсин А, тимидинкиназу вируса простого герпеса (HSV-TK), карбоксипептидазу G2 (CPG2), карбоксилэстеразу (CA), цитозиндезаминазу (CD), цитохром P450 (cyp-450), дезоксицитидинкиназу (dCK), нитроредуктазу (NR), пурин-нуклеозидфосфорилазу (PNP), тимидин-фосфорилазу (TP), тимидинкиназу вируса ветряной оспы (VZV-TK), ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазу (XducGPRT) или индуцируемую каспазу 9. При этом, может быть использован любой один из этих генов или два или более из них. Лекарственные средства, активирующие функцию каждого «гена-самоубийцы», известны, и их примеры включают ганцикловир для тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-TK) и AP1903, который представляет собой димер-индуцирующее соединение для индуцибельной каспазы 9.

[0103] Далее будет подробно описан способ получения CAR-T-клетки согласно изобретению. Способ получения CAR-T-клеток согласно изобретению включает стадию введения экспрессионного вектора согласно изобретению в Т-клетку, как описано выше (которая далее будет называться «стадией введения экспрессионного вектора»).

[0104] Способ введения экспрессионного вектора в Т-клетку может оказаться подходящим для варианта экспрессионного вектора. Так, например, экспрессионный вектор может быть введен в Т-клетку известными методами, такими как метод инфицирования вирусом, метод с использованием кальция-фосфорной кислоты, метод липофекции, метод микроинъекции и метод электропорации. Экспрессионный вектор согласно изобретению может быть получен в форме, подходящей для его использования в каждом методе с применением известных средств и с использованием коммерчески доступных наборов в зависимости от обстоятельств (в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к этому набору). На стадии введения экспрессионного вектора, Т-клетки

могут быть культивированы путем контактирования препарата с Т-клетками, обычно, в среде, в которой содержится препарат, включающий экспрессионный вектор.

[0105] В предпочтительном варианте осуществления изобретения, экспрессионный вектор согласно изобретению вводят в Т-клетки методом инфицирования вирусом. Так, например, может быть применен метод, в котором вектор согласно изобретению и упаковывающий вектор (плазмиду) каждого вируса трансфецируют в клетку-хозяина с использованием коммерчески доступного набора, соответствующего каждому вирусному вектору, такому как ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор и аденоассоциированный вирусный вектор с получением рекомбинантного вируса, после чего Т-клетки инфицируют полученным рекомбинантным вирусом. Примеры коммерчески доступного набора для вирусных векторов включают набор для упаковки ретровируса Eco (поставляемый от Takara Bio Inc). Примеры клетки-хозяина включают клетки GP2-293 (поставляемые от Takara Bio Inc.), клетки Plat-GP (поставляемые от Cosmo Bio Co., Ltd.), клетки PG13 (ATCC CRL-10686) и клетки PA317 (ATCC CRL-9078).

[0106] Способ получения CAR-Т-клеток согласно изобретению может дополнительно включать другие стадии, проводимые до и после стадии введения экспрессионного вектора. Примеры других стадий включают стадию культивирования Т-клеток и стадию, включающую инициацию функционирования функционального гена, содержащегося в экспрессионном векторе.

[0107] Т-клетки, в которые вводят экспрессионный вектор согласно изобретению, обычно предварительно культивируют *in vitro* известным способом. Так, например, Т-клетки могут быть выделены и очищены обычным способом из физиологических жидкостей, таких как кровь и жидкость костного мозга; тканей, таких как селезенка, тимус и лимфатические узлы; или раковых тканей, таких как первичные опухоли, метастазирующие опухоли и раковые асциты, которые берут у человека или животных, не являющихся человеком, а затем культивируют в соответствующей среде, и в эту среду может быть добавлен экспрессионный вектор (препарат, содержащий экспрессионный вектор) согласно изобретению. Альтернативно, Т-клетки (или их предшественники) могут быть получены предварительно из iPS-клеток, ES-клеток и других плюрипотентных стволовых клеток в соответствующей стадии индуцирования дифференцировки, и в эту среду может быть добавлен экспрессионный вектор (препарат, содержащий экспрессионный вектор) согласно изобретению.

[0108] Кроме того, в случае, если экспрессионный вектор согласно изобретению содержит ген резистентности к лекарственному средству в качестве функционального гена, то стадия культивирования Т-клеток с добавлением лекарственного средства, соответствующего используемому гену резистентности к лекарственному средству, в среду может быть осуществлена после стадии введения экспрессионного вектора для сортировки Т-клеток с введенным экспрессионным вектором. Специалисты в данной области могут соответствующим образом скорректировать условия для использования лекарственного средства, соответствующего гену резистентности к лекарственному

средству, такие как концентрация в среде и период культивирования.

[0109] В случае, если экспрессионный вектор согласно изобретению содержит ген, кодирующий флуоресцентный белок (репортерный ген) в качестве функционального гена, то стадия наблюдения Т-клеток с введенным экспрессионным вектором на флуоресцентном микроскопе, стадия сортировки Т-клеток с введенным экспрессионным вектором на клеточном сортере и т.п. могут быть осуществлены после стадии введения экспрессионного вектора. Специалисты в данной области могут соответствующим образом отрегулировать условия наблюдения под флуоресцентным микроскопом и отбора на клеточном сортере, такие как облучение светом на длине волны возбуждения и детектирование светового излучения на длине волны излучения, соответствующей флуоресцентному белку.

Примеры

[0110] В нижеследующих примерах, CAR представляет собой CAR, нацеленный на человеческий CD20, а в частности, CAR против человеческого CD20, состоящий из scFv против человеческого CD20, трансмембранного домена мышинового CD8 и внутриклеточного мышинового сигнального мотива CD28_4-1BB_CD3 ζ . Кроме того, в следующих примерах, цитокин представляет собой любой из цитокинов, таких как мышинный IL-15 («IL15_{LSP}», «sIL15_{RA}», «mbIL15_{RA}» или «sushiIL15»; мышинный IL-18; мышинный IL-21; или мышинный IL-27, содержащий одноцепочечный белок «scIL27» (p28 и EB13). В нижеследующих примерах, хемокин представляет собой мышинный CCL19. Полученные от мыши Т-клетки, экспрессирующие CAR, цитокин и хемокин, получали и тестировали следующим образом.

[0111] [Таблица 1]

Пример/Сравнительный пример	CAR	Цитокин	Хемокин
Пример 1-1	scFv против человеческого CD20	IL15 _{LSP} (мышинный)	CCL19 (мышинный)
Пример 1-2	scFv против человеческого CD20	sIL15 _{RA} (мышинный)	CCL19 (мышинный)
Пример 1-3	scFv против человеческого CD20	mbIL15 _{RA} (мышинный)	CCL19 (мышинный)
Пример 1-4	scFv против человеческого CD20	sushiIL15 (мышинный)	CCL19 (мышинный)

	CD20		
Пример 2	scFv против человеческого CD20	IL-18 (мышиный)	CCL19 (мышиный)
Пример 3	scFv против человеческого CD20	IL-21 (мышиный)	CCL19 (мышиный)
Пример 4	scFv против человеческого CD20	scIL27 (мышиный)	CCL19 (мышиный)
Сравнительный пример 1	-	-	-
Сравнительный пример 2	scFv против человеческого CD20	-	-

[0112] [Пример 1-1] IL15_{LSP} × CCL19-CAR-T-клетки

На стадии получения вектора, три типа фрагментов ДНК (фрагменты ДНК 1-3) сначала были искусственно синтезированы на стадии 1, а затем был получен один экспрессионный вектор, содержащий все гены, кодирующие предварительно определенные CAR, цитокин и хемокин, с использованием трех типов фрагментов ДНК на стадии 2. Затем на стадии получения CAR-T-клеток, сначала получали ретровирусный вектор с использованием экспрессионного вектора на стадии 1, а затем предварительно определенные гены трансдуцировали в мышинные Т-клетки с использованием препарата ретровирусного вектора на стадии 2.

[0113] [A: Стадия получения вектора] Получение экспрессионного вектора CAR IL15LSP_CCL19 против человеческого CD20

Стадия 1: Синтез фрагментов ДНК

Фрагмент ДНК #1: Фрагмент ДНК, содержащий CAR против человеческого CD20.

Фрагмент ДНК (фрагмент ДНК #1), содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR против человеческого CD20, состоящий из scFv против человеческого CD20, трансмембранного домена мышинного CD8 и внутриклеточного сигнального мотива мышинного CD28_4-1BB_CD3ζ, синтезировали искусственно. SEQ ID NO: 1 (фигура 7) представляет собой нуклеотидную последовательность всего фрагмента ДНК #1. В SEQ ID NO: 1, основания в положениях 3-785 образуют последовательность, кодирующую scFv против человеческого CD20, основания в положениях 795-1040 образуют последовательность, кодирующую трансмембранный домен мышинного CD8, основания в положениях 1041-1637 образуют

последовательность, кодирующую внутриклеточный сигнальный мотив мышинового CD28_4-1BB_CD3 ζ (среди них, основания в положениях 1041-1163 кодируют внутриклеточный домен мышинового CD28, основания в положениях 1164-1298 кодируют внутриклеточный домен мышинового 4-1BB, а основания в положениях 1299-1637 кодируют полипептид во внутриклеточном домене мышинового CD3 ζ). SEQ ID NO: 2 представляет собой аминокислотную последовательность слитого белка, экспрессируемого нуклеотидной последовательностью в положениях 3-1637 фрагмента ДНК #1.

[0114] Фрагмент ДНК #2: фрагмент ДНК, содержащий стоп-кодона и сайты множественного клонирования.

Фрагмент ДНК (фрагмент ДНК #2), содержащий нуклеотидную последовательность стоп-кодонов и нуклеотидную последовательность сайтов множественного клонирования (MCS), был синтезирован искусственно. SEQ ID NO: 3 (фигура 8) представляет собой нуклеотидную последовательность всего фрагмента ДНК #2.

[0115] Фрагмент ДНК #3: фрагмент ДНК для IL15_{LSP} и CCL19

Фрагмент ДНК (фрагмент ДНК #3), содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую пептид 2A (F2A), который представляет собой саморасщепляющийся пептид, сигнальный пептид мышинового IL-2 (IL-2SP), конструкцию мышинового IL-15 «IL15_{LSP}» (гибридный пептид состоящий из IL-15LSP и IL-15), F2A и мышинный CCL19, был синтезирован искусственно. SEQ ID NO: 4 (фигура 9) представляет собой нуклеотидную последовательность всего фрагмента ДНК #3. В SEQ ID NO: 4, основания в положениях 7-81 образуют последовательность, кодирующую первый F2A, основания в положениях 82-168 образуют последовательность, кодирующую мышинный IL-15_{LSP}, основания в положениях 169-567 образуют последовательность, кодирующую мышинный IL-15 (за исключением стоп-кодонов), основания в положениях 568-642 образуют последовательность, кодирующую второй F2A, а основания в положениях 646-969 образуют последовательность, кодирующую мышинный CCL19. SEQ ID NO: 5 представляет собой аминокислотную последовательность полноразмерного слитого белка, который экспрессируется нуклеотидной последовательностью в положениях 7-969 фрагмента ДНК #3, саморасщепляется в двух сайтах F2A и содержит IL15_{LSP}.

[0116] Стадия 2: Получение ретровирусного экспрессионного вектора

Фрагмент ДНК #1 и фрагмент ДНК #2 были связаны друг с другом с получением конструкции (CAR_MCS против человеческого CD20). Полученную конструкцию включали в ретровирусный экспрессионный вектор pMSGV (Tamada K. et al., Clin Cancer Res 18: 6436-6445 (2002)) путем обработки рестриктирующими ферментами (Nco I и Sal I) с получением ретровирусного экспрессионного вектора pMSGV, содержащего CAR_MCS против человеческого CD20.

[0117] Затем нуклеотидные последовательности в положениях 1337-1637 фрагмента ДНК #1 и фрагмента ДНК #3 были связаны с получением конструкции.

Полученную конструкцию включали в ретровирусный вектор pMSGV, содержащий CAR_MCS против человеческого CD20, путем обработки рестриктирующими ферментами (Sbf I и Sal I) с получением ретровирусного экспрессионного вектора pMSGV, содержащего CAR_F2A_IL15_{LSP}_F2A_CCL19 против человеческого CD20 (экспрессионного вектора CAR IL15_{LSP}_CCL19 против человеческого CD20).

[0118] [B: стадия получения CAR-T-клеток]. Получение CAR-T-клеток, содержащих CAR_IL15_{LSP}_CCL19 против человеческого CD20.

Стадия 1: Получение ретровируса

С использованием липофектамина 3000 (поставляемого от Thermo Fisher SCIENTIFIC КК), экспрессионный вектор CAR IL15_{LSP}_CCL19 против человеческого CD20, полученный на стадии получения вектора, переносили в линию упаковывающих клеток GP2-293 (Takara Bio Inc.) вместе с плазмидой pCL-Eco (Novus Biologicals, LLC). DMEM с добавлением 10% дезактивированной FBS и антибиотиков использовали в качестве культурального раствора для линии упаковывающих клеток GP2-293. Через 48 часов после трансфекции собирали супернатант культурального раствора линии упаковывающих клеток GP2-293 с получением препарата экспрессионного вектора CAR IL15_{LSP}_CCL19 против человеческого CD20.

[0119] Стадия 2: Трансдукция мышинных Т-клеток

3×10^6 мышинных Т-клеток, выделенных и очищенных из селезенки и лимфатических узлов мыши, активировали в течение 48 часов в присутствии иммобилизованного моноклонального антитела против мышинового CD3 (3 мкг/мл), моноклонального антитела против мышинового CD28 (1 мкг/мл) и IL-2. Затем препарат, содержащий экспрессионный вектор CAR IL15_{LSP}_CCL19 против человеческого CD20 (супернатант культуры клеток GP2-293), полученный на стадии 1, и мышинные Т-клетки, активированные, как описано выше, смешивали в лунках планшета, в котором было иммобилизовано 25 мкг/мл ретронектина (зарегистрированный торговый знак: Takara Bio Inc.) с последующим центрифугированием при 1500 об/мин в течение 2 часов, и смесь культивировали в течение 6 часов в присутствии IL-2. Для удаления ретровируса из культурального раствора, мышинные Т-клетки собирали, переносили в новую полную среду RPMI, содержащую IL-2, а затем культивировали в течение 42 часов, с получением мышинных Т-клеток (Т-клеток, содержащих CAR IL15_{LSP}_CCL19 против человеческого CD20 и далее называемых «IL15_{LSP} × CCL19-CAR-T-клетками»), содержащих введенный экспрессионный вектор CAR IL15_{LSP}_CCL19 против человеческого CD20, который экспрессирует CAR против человеческого CD20, IL15_{LSP} и CCL19.

[0120] «Полная среда RPMI», используемая для культивирования Т-клеток, представляет собой среду RPMI-1640, в которую были добавлены дезактивированная 10% FBS, антибиотики, 50 мМ 2-меркаптоэтанола и 25 мМ буфера HEPES. Полную среду RPMI, в которую при необходимости также добавляли отдельно описанные компоненты, использовали как описано ниже в качестве культурального раствора для Т-клеток.

[0121] [Пример 1-2] sIL15_{RA} (секреторный слитый белок IL-15/IL-15RA) × CCL19-

CAR-T-клетки

[A: Стадия получения вектора] Получение экспрессионного вектора CAR_{sIL15RA_CCL19} против человеческого CD20

С использованием того же самого фрагмента ДНК #1 и фрагмента ДНК #2, которые использовали в стадии 1 Примера 1-1, и фрагмента ДНК #4, как описано ниже, вместо фрагмента ДНК #3, была получена конструкция таким же способом, как описано в стадии 2 Примера 1-1, для получения ретровирусного экспрессионного вектора рMSGV, содержащего CAR_F2A_{sIL15RA_F2A_CCL19} против человеческого CD20 (экспрессионного вектора CAR_{sIL15RA_CCL19} против человеческого CD20).

[0122] Фрагмент ДНК #4: фрагмент ДНК для sIL15RA и CCL19

Был синтезирован фрагмент ДНК (фрагмент ДНК #4), содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую F2A, мышинный IL-2SP, конструкцию мышинового IL-15 «sIL15RA» (гибридный пептид, состоящий из IL-15, линкера и внеклеточного домена IL-15R α), F2A и мышинный CCL19. SEQ ID NO: 6 (фиг. 10) представляет собой нуклеотидную последовательность полноразмерного фрагмента ДНК #4. В SEQ ID NO: 6, основания в положениях 7-81 образуют последовательность, кодирующую первый F2A, основания в положениях 82-141 образуют последовательность, кодирующую мышинный IL-2SP, основания в положениях 142-1137 образуют последовательность, кодирующую sIL15RA (среди них, основания в положениях 142-540 кодируют мышинный IL-15 (за исключением сигнальных последовательностей и стоп-кодонов), основания в положениях 541-618 служат в качестве линкера, основания в положениях 619-1137 кодируют внеклеточный домен мышинового IL-15R α , основания в положениях 1138-1212 образуют последовательность, кодирующую второй F2A, а основания в положениях 1216-1539 образуют последовательность, кодирующую мышинный CCL19. SEQ ID NO: 7 представляет собой аминокислотную последовательность полноразмерного слитого белка, который экспрессируется нуклеотидной последовательностью в положениях 7-1539 фрагмента ДНК #4, саморасщепляется в двух сайтах F2A и содержит sIL15RA.

[0123] [B: стадия продуцирования CAR-T-клеток] Получение Т-клеток, содержащих CAR_{sIL15RA_CCL19} против человеческого CD20

Препарат, содержащий ретровирус, получали в стадии 1 таким же способом, как и в стадии получения CAR-T-клеток в Примере 1-1, за исключением того, что экспрессионный вектор CAR_{sIL15RA_CCL19} против человеческого CD20, полученный в вышеупомянутой стадии получения вектора, использовали в качестве ретровирусного экспрессионного вектора вместо экспрессионного вектора CAR_{sIL15RA_CCL19} против человеческого CD20 с получением мышинных Т-клеток, экспрессирующих гены CAR против человеческого CD20, sIL15RA и CCL19, содержащиеся в ретровирусе (Т-клеток, содержащих CAR_{sIL15RA_CCL19} против человеческого CD20, далее называемых sIL15RA × CCL19-CAR-T-клетками) в стадии 2.

[0124] [Пример 1-3] mbIL15RA (мембраносвязанный слитый белок IL-15/IL-15RA) × CCL19-CAR-T-клетки

[А: Стадия получения вектора] Получение экспрессионного вектора CAR_{mbIL15RA_CCL19} против человеческого CD20

С использованием того же самого фрагмента ДНК #1 и фрагмента ДНК #2, которые использовали в стадии 1 Примера 1-1, и фрагмента ДНК #5, как описано ниже, вместо фрагмента ДНК #3, была получена конструкция таким же способом, как описано в стадии 2 Примера 1-1, для получения ретровирусного экспрессионного вектора рMSGV, содержащего CAR_{F2A_mbIL15RA_F2A_CCL19} против человеческого CD20 (экспрессионного вектора CAR_{mbIL15RA_CCL19} против человеческого CD20).

[0125] Фрагмент ДНК #5: фрагмент ДНК для _{mbIL15RA} и CCL19

Был синтезирован фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую F2A, мышинный IL-2SP, конструкцию мышинового IL-15 «_{mbIL15RA}» (гибридный пептид, состоящий из IL-15, линкера и полноразмерного IL-15R α), F2A и мышинный CCL19. SEQ ID NO: 8 (фигура 11) представляет собой нуклеотидную последовательность полноразмерного фрагмента ДНК #5. В SEQ ID NO: 8, основания в положениях 7-81 образуют последовательность, кодирующую первый F2A, основания в положениях 82-141 образуют последовательность, кодирующую мышинный IL-2SP, основания в положениях 142-1311 образуют последовательность, кодирующую _{mbIL15RA} (среди них, основания в положениях 142-540 кодируют мышинный IL-15 (за исключением сигнальных последовательностей и стоп-кодона), основания в положениях 541-618 служат в качестве линкера, основания в положениях 619-1311 кодируют мышинный IL-15R α (полноразмерный), основания в положениях 1312-1386 образуют последовательность, кодирующую второй F2A, а основания в положениях 1390-1713 образуют последовательность, кодирующую мышинный CCL19. SEQ ID NO: 9 представляет собой аминокислотную последовательность полноразмерного слитого белка, который экспрессируется нуклеотидной последовательностью в положениях 7-1713 фрагмента ДНК #5, саморасщепляется в двух сайтах F2A и содержит _{mbIL15RA}.

[0126] [В: стадия продуцирования CAR-T-клеток] Получение Т-клеток, содержащих CAR_{mbIL15RA_CCL19} против человеческого CD20

Препарат, содержащий ретровирус, получали в стадии 1 таким же способом, как и в стадии получения CAR-T-клеток в Примере 1-1, за исключением того, что экспрессионный вектор CAR_{mbIL15RA_CCL19} против человеческого CD20, полученный в вышеупомянутой стадии получения вектора, использовали в качестве ретровирусного экспрессионного вектора вместо экспрессионного вектора CAR_{IL15LSP_CCL19} против человеческого CD20 с получением мышинных Т-клеток, экспрессирующих гены CAR против человеческого CD20, _{mbIL15RA} и CCL19, содержащиеся в ретровирусе (Т-клеток, содержащих CAR_{mbIL15RA_CCL19} против человеческого CD20, далее называемых _{mbIL15RA} × CCL19-CAR-T-клетками) в стадии 2.

[0127] [Пример 1-4] _{sushi}IL15 (секреторный слитый белок IL-15RA/IL-15) × CCL19-CAR-T-клетки

[А: Стадия получения вектора] Получение экспрессионного вектора CAR

*sushi*IL15_CCL19 против человеческого CD20

С использованием того же самого фрагмента ДНК #1 и фрагмента ДНК #2, которые использовали в стадии 1 Примера 1-1, и фрагмента ДНК #6, как описано ниже, вместо фрагмента ДНК #3, была получена конструкция таким же способом, как описано в стадии 2 Примера 1-1, для получения ретровирусного экспрессионного вектора рMSGV, содержащего CAR_F2A_ *sushi*IL15_F2A_CCL19 против человеческого CD20 (экспрессионного вектора CAR_ *sushi*IL15_CCL19 против человеческого CD20).

[0128] Фрагмент ДНК #6: фрагмент ДНК для *sushi*IL15 и CCL19

Был синтезирован фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую F2A, конструкцию мышинового IL-15 «*sushi*IL15» (гибридный пептид, состоящий из домена IL-15Rα*sushi*, линкера и IL-15), F2A и мышинный CCL19. SEQ ID NO: 10 (фигура 12) представляет собой нуклеотидную последовательность полноразмерного фрагмента ДНК #6. В SEQ ID NO: 10, основания в положениях 7-81 образуют последовательность, кодирующую первый F2A, основания в положениях 82-777 образуют последовательность, кодирующую *sushi*IL15 (среди них, основания в положениях 82-375 кодируют SP и домен *sushi* мышинового IL-15Rα, основания в положениях 376-435 служат в качестве линкера, основания в положениях 436-777 кодируют мышинный IL-15 (за исключением сигнальных последовательностей и пропептидов), основания в положениях 778-852 образуют последовательность, кодирующую второй F2A, а основания в положениях 856-1179 образуют последовательность, кодирующую мышинный CCL19. SEQ ID NO: 11 представляет собой аминокислотную последовательность полноразмерного слитого белка, который экспрессируется нуклеотидной последовательностью в положениях 7-1179 фрагмента ДНК #6, саморасщепляется в двух сайтах F2A и содержит *sushi*IL15.

[0129] [B: стадия продуцирования CAR-T-клеток] Получение T-клеток, содержащих CAR_ *sushi*IL15_CCL19 против человеческого CD20

Препарат, содержащий ретровирус, получали в стадии 1 таким же способом, как и в стадии получения CAR-T-клеток в Примере 1-1, за исключением того, что экспрессионный вектор CAR_ *sushi*IL15_CCL19 против человеческого CD20, полученный в вышеупомянутой стадии получения вектора, использовали в качестве ретровирусного экспрессионного вектора вместо экспрессионного вектора CAR IL-15_{LSP}_CCL19 против человеческого CD20 с получением мышинных T-клеток, экспрессирующих гены CAR против человеческого CD20, *sushi*IL15 и CCL19, содержащиеся в ретровирусе (T-клеток, содержащих CAR_ *sushi*IL15_CCL19 против человеческого CD20, далее называемых *sushi*IL15 × CCL19-CAR-T-клетками) в стадии 2.

[0130] [Пример 2] IL-18 × CCL19-CAR-T-клетки

[A: Стадия получения вектора] Получение экспрессионного вектора CAR IL-18_CCL19 против человеческого CD20

С использованием того же самого фрагмента ДНК #1 и фрагмента ДНК #2, которые использовали в стадии 1 Примера 1-1, и фрагмента ДНК #7, как описано ниже, вместо

фрагмента ДНК #3, была получена конструкция таким же способом, как описано в стадии 2 Примера 1-1, для получения ретровирусного экспрессионного вектора рMSGV, содержащего CAR_F2A_IL-18_F2A_CCL19 против человеческого CD20 (экспрессионного вектора CAR_IL-18_CCL19 против человеческого CD20).

[0131] Фрагмент ДНК #7: фрагмент ДНК для IL-18 и CCL19

Был искусственно синтезирован фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую первый F2A, мышинный IL-18, второй F2A и мышинный CCL19. SEQ ID NO: 12 (фигура 13) представляет собой нуклеотидную последовательность полноразмерного фрагмента ДНК #7. В SEQ ID NO: 12, основания в положениях 7-81 образуют последовательность, кодирующую первый F2A, основания в положениях 82-657 образуют последовательность, кодирующую мышинный IL-18, основания в положениях 657-732 образуют последовательность, кодирующую второй F2A, а основания в положениях 736-1059 образуют последовательность, кодирующую мышинный CCL19. SEQ ID NO: 13 представляет собой аминокислотную последовательность полноразмерного слитого белка, который экспрессируется нуклеотидной последовательностью в положениях 7-1059 фрагмента ДНК #7, и саморасщепляется в двух сайтах F2A.

[0132] [В: стадия продуцирования CAR-T-клеток] Получение Т-клеток, содержащих CAR_IL-18_CCL19 против человеческого CD20

Препарат, содержащий ретровирус, получали в стадии 1 таким же способом, как и в стадии получения CAR-T-клеток в Примере 1-1, за исключением того, что экспрессионный вектор CAR_IL18_CCL19 против человеческого CD20, полученный в вышеупомянутой стадии получения вектора, использовали в качестве ретровирусного экспрессионного вектора вместо экспрессионного вектора CAR_IL15_{LSP}_CCL19 против человеческого CD20 с получением мышинных Т-клеток, экспрессирующих гены CAR против человеческого CD20, IL-18 и CCL19, содержащиеся в ретровирусе (Т-клеток, содержащих CAR_IL-18_CCL19 против человеческого CD20, далее называемых «IL-18 × CCL19-CAR-T-клетками») в стадии 2.

[0133] [Пример 3] IL-21 × CCL19-CAR-T-клетки

[А: Стадия получения вектора] Получение экспрессионного вектора CAR_IL-21_CCL19 против человеческого CD20

С использованием того же самого фрагмента ДНК #1 и фрагмента ДНК #2, которые использовали в стадии 1 Примера 1-1, и фрагмента ДНК #8, как описано ниже, вместо фрагмента ДНК #3, была получена конструкция таким же способом, как описано в стадии 2 Примера 1-1, для получения ретровирусного экспрессионного вектора рMSGV, содержащего CAR_F2A_IL-21_F2A_CCL19 против человеческого CD20 (экспрессионного вектора CAR_IL-21_CCL19 против человеческого CD20).

[0134] Фрагмент ДНК #8: фрагмент ДНК для IL-21 и CCL19

Был искусственно синтезирован фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую первый F2A, мышинный IL-21, второй F2A и мышинный CCL19. SEQ ID NO: 14 (фигура 14) представляет собой нуклеотидную последовательность

полноразмерного фрагмента ДНК #8. В SEQ ID NO: 14, основания в положениях 7-81 образуют последовательность, кодирующую первый F2A, основания в положениях 82-567 образуют последовательность, кодирующую мышинный IL-21, основания в положениях 658-642 образуют последовательность, кодирующую второй F2A, а основания в положениях 646-969 образуют последовательность, кодирующую мышинный CCL19. SEQ ID NO: 15 представляет собой аминокислотную последовательность полноразмерного слитого белка, который экспрессируется нуклеотидной последовательностью в положениях 7-969 фрагмента ДНК #8, и саморасщепляется в двух сайтах F2A.

[0135] [B: стадия продуцирования CAR-T-клеток] Получение T-клеток, содержащих CAR IL21_CCL19 против человеческого CD20

Препарат, содержащий ретровирус, получали в стадии 1 таким же способом, как и в стадии получения CAR-T-клеток в Примере 1-1, за исключением того, что экспрессионный вектор CAR IL-21_CCL19 против человеческого CD20, полученный в вышеупомянутой стадии получения вектора, использовали в качестве ретровирусного экспрессионного вектора вместо экспрессионного вектора CAR IL15_{LSP}_CCL19 против человеческого CD20 с получением мышинных T-клеток, экспрессирующих гены CAR против человеческого CD20, IL-21 и CCL19, содержащиеся в ретровирусе (T-клеток, содержащих CAR IL21_CCL19 против человеческого CD20, далее называемых «IL-21 × CCL19-CAR-T-клетками») в стадии 2.

[0136] [Пример 4] _{sc}IL27 × CCL19-CAR-T-клетки

[A: Стадия получения вектора] Получение экспрессионного вектора CAR _{sc}IL27_CCL19 против человеческого CD20

С использованием того же самого фрагмента ДНК #1 и фрагмента ДНК #2, которые использовали в стадии 1 Примера 1-1, и фрагмента ДНК #9, как описано ниже, вместо фрагмента ДНК #3, была получена конструкция таким же способом, как описано в стадии 2 Примера 1-1, для получения ретровирусного экспрессионного вектора pMSGV, содержащего CAR_F2A__{sc}IL-27_F2A_CCL19 против человеческого CD20 (экспрессионного вектора CAR__{sc}IL27_CCL19 против человеческого CD20).

[0137] Фрагмент ДНК #9: фрагмент ДНК для _{sc}IL27 и CCL19

Был искусственно синтезирован фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую первый F2A, конструкцию мышинового IL-27 «_{sc}IL27» (гибридный пептид, состоящий из p28, линкера и EB13), второй F2A и CCL19. SEQ ID NO: 16 (фигура 15) представляет собой нуклеотидную последовательность полноразмерного фрагмента ДНК #9. В SEQ ID NO: 16, основания в положениях 7-81 образуют последовательность, кодирующую первый F2A, основания в положениях 82-1437 образуют последовательность, кодирующую _{sc}IL27 (среди них, основания в положениях 82-765 кодируют EB13, основания в положениях 766-819 служат в качестве линкера, основания в положениях 820-1437 кодируют мышинный p28), основания в положениях 1438-1512 образуют последовательность, кодирующую второй F2A, а основания в положениях 1516-1839 образуют последовательность, кодирующую мышинный CCL19.

SEQ ID NO: 17 представляет собой аминокислотную последовательность полноразмерного слитого белка, который экспрессируется нуклеотидной последовательностью в положениях 7-1839 фрагмента ДНК #9, саморасщепляется в двух сайтах F2A и содержит scIL27.

[0138] [B: стадия продуцирования CAR-T-клеток] Получение T-клеток, содержащих CAR_{scIL27_CCL19} против человеческого CD20

Препарат, содержащий ретровирус, получали в стадии 1 таким же способом, как и в стадии получения CAR-T-клеток в Примере 1-1, за исключением того, что экспрессионный вектор CAR_{scIL27_CCL19} против человеческого CD20, полученный в вышеупомянутой стадии получения вектора, использовали в качестве ретровирусного экспрессионного вектора вместо экспрессионного вектора CAR_{IL-15_{LSP}_CCL19} против человеческого CD20 с получением мышинных T-клеток, экспрессирующих гены CAR против человеческого CD20, scIL27 и CCL19, содержащиеся в ретровирусе (T-клеток, содержащих CAR_{scIL27_CCL19} против человеческого CD20, далее называемых scIL27 × CCL19-CAR-T-клетками) в стадии 2.

[0139] [Сравнительный пример 1] T-клетки без трансдукции(-)

Мышиные T-клетки, которые были только активированы (далее именуемые «нетрансдуцированными (-) T-клетками»), были получены тем же самым способом, за исключением того, что продуцирование ретровирусного вектора и трансфекцию в T-клетки с использованием ретровирусного вектора не проводили, и вместо получения препарата экспрессионного вектора CAR_{IL15_{LSP}_CCL19} против человеческого CD20 на стадии 2 стадии B Примера 1-1 добавляли эквивалентное количество среды DMEM, используемой для культивирования клеток GP2-293.

[0140] [Сравнительный пример 2] Преобразованные CAR-T-клетки

[A: Стадия получения вектора] Получение экспрессионного вектора CAR против человеческого CD20

Ретровирусный экспрессионный вектор rMSGV, содержащий CAR_{MCS} против человеческого CD20, получали с использованием фрагмента ДНК 1, фрагмента ДНК 2 и ретровирусного вектора rMSGV в соответствии с процедурой, описанной в середине стадии 2 стадии A Примера 1-1. Этот вектор использовали в качестве контрольного ретровирусного экспрессионного вектора (экспрессионного вектора CAR против человеческого CD20), который не экспрессирует цитокины и хемокины.

[0141] [B: Стадия продуцирования CAR-T-клеток] Получение T-клеток, содержащих CAR против человеческого CD20.

Препарат, содержащий ретровирус, был получен на стадии 1 таким же способом, как и на стадии продуцирования CAR-T-клеток в Примере 1-1, за исключением того, что экспрессионный вектор CAR против человеческого CD20 был использован в качестве ретровирусного экспрессионного вектора вместо экспрессионного вектора CAR_{IL-15_{LSP}_CCL19} против человеческого CD20 с получением мышинных T-клеток, экспрессирующих только CAR против человеческого CD20, содержащийся в ретровирусе

(не экспрессирующем цитокины и хемокины) (Т-клеток, содержащих CAR против человеческого CD20, далее называемых «преобразованными CAR-Т-клетками») на стадии 2.

[0142] [Экспериментальный пример 1] Подтверждение уровня экспрессии введенных CAR, цитокина и хемокина.

[А: Оценка уровня экспрессии CAR методом проточной цитометрии]

С использованием Т-клеток, полученных в вышеприведенных примерах и в сравнительных примерах, уровень экспрессии CAR против человеческого CD20 на поверхности клеток анализировали с помощью проточной цитометрии, как описано ниже.

[0143] Для проточной цитометрии использовали проточный цитометр «BD FACSCanto™ II» (BD Biosciences), а для анализа данных использовали компьютерную программу FlowJo (BD Biosciences).

[0144] Т-клетки обрабатывали с использованием меченого биотином белка L (который специфически связывается с легкой цепью к scFv против человеческого CD20) и стрептавидина, связанного с бриллиантовым фиолетовым™ 421 (BV421), для обнаружения экспрессии CAR. Одновременно с этим оценивали число CD8-позитивных клеток в каждой популяции Т-клеток с использованием моноклонального антитела против мышинового CD8, связанного с аллофикоцианином (APC) (BioLegend). Поскольку обычно считается, что CD8-позитивные Т-клетки обладают прямой цитотоксической активностью, то присутствие (положительный показатель) CD8-позитивных Т-клеток может подтверждать их активность.

[0145] На фигуре 1 показаны результаты. Было подтверждено, что 60% или более клеточной популяции CAR-Т-клеток во всех примерах (и в Сравнительном примере 2) экспрессировали CAR против человеческого CD20 (то есть, были позитивными по этому CAR).

[0146] [В: Оценка количества секретируемых цитокинов и хемокинов]

Супернатанты культуры Т-клеток собирали через 42 часа после трансдукции, а затем определяли концентрации IL-15, IL-18, IL-21, IL-27 и CCL19 с использованием коммерчески доступного набора для ELISA (поставляемого от MBL только для IL-18 и R&D Systems для других).

[0147] На фигуре 2 показаны результаты. В случае IL-15 (фигура 2A), IL-15 был обнаружен в концентрации 250 пг/мл в супернатанте культуры CAR-Т-клеток Примера 1-1 (15LSP × 19 CAR-T). Между тем, концентрации IL-15 в супернатантах культур CAR-Т-клеток Примера 1-2 (s15RA × 19 CAR-T), Примера 1-3 (mb15RA × 19 CAR-T) и Примера 1-4 (sushi15 × 19 CAR-T) были аналогичны концентрациям для нетрансдуцированных активированных Т-клеток (без трансдукции (-): Сравнительный пример 1) и Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого CD20 (преобразованные CAR-Т: Сравнительный пример 2) и используемых в качестве контроля, при этом, никакой секреции IL-15 не наблюдалось с помощью набора для ELISA, используемого в Экспериментальном примере 1. Однако, поскольку Пример 1-2, Пример 1-3 и Пример 1-4

продемонстрировали превосходный эффект пролиферации клеток в Экспериментальном примере 2, который будет описан ниже, то следует отметить, что IL-15 экспрессировался и секретировался в этих Примерах, а также в Примере 1-1.

[0148] В случае IL-18 (фигура 2B), IL-18 был обнаружен в концентрации 150 пг/мл или более в супернатанте культуры CAR-T-клеток Примера 2 (18 × 19 CAR-T). Между тем, количество, секретируемое из Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого CD20 (преобразованные CAR-T: Сравнительный пример 2) и используемых в качестве контроля в супернатанте культуры, было таким же небольшим, как и в случае нетрансдуцированных активированных Т-клеток (без трансдукции (-): Сравнительный пример 1).

[0149] В случае IL-21 (фигура 2C), IL-21 был обнаружен в концентрации 400 пг/мл или более в супернатанте культуры CAR-T-клеток Примера 3 (21 × 19 CAR-T). Между тем, количество, секретируемое из Т-клеток, экспрессирующих CAR против человеческого CD20 (преобразованные CAR-T: Сравнительный пример 2) и используемых в качестве контроля, было ниже предела детектирования (не детектировалось), как и в случае нетрансдуцированных активированных Т-клеток (без трансдукции(-): Сравнительный пример 1).

[0150] В случае IL-27 (фигура 2D), p28, который является субъединицей IL-27, был обнаружен при концентрации 250 пг/мл или более из супернатанта культуры CAR-T-клеток Примера 4 (sc27 × 19 CAR-T). Между тем, количество, секретируемое из Т-клеток, содержащих CAR против человеческого CD20 (преобразованные CAR-T: Сравнительный пример 2) и используемых в качестве контроля, было таким же, как количество, секретируемое из нетрансдуцированных активированных Т-клеток (без трансдукции (-): Сравнительный пример 1) (при концентрации приблизительно 50 пг/мл в супернатанте культуры).

[0151] В случае CCL19 (фиг. 2E), хотя концентрации в супернатантах культуры Т-клеток, содержащих CAR против человеческого CD20 (преобразованные CAR-T: Сравнительный пример 2) и используемых в качестве контроля, и нетрансдуцированных активированных Т-клеток (без трансдукции (-): Сравнительный пример 1) были ниже предела детектирования, однако, концентрации в супернатанте культуры CAR-T-клеток этих примеров составляли от 150 до 500 пг/мл.

[0152] [Экспериментальный пример 2] Оценка пролиферативной способности CAR-T клеток *in vitro*

С использованием Т-клеток, полученных как описано выше в Примерах и Сравнительных примерах, был проведен анализ для того, чтобы определить, обладает ли каждый цитокин, продуцируемый Т-клетками (IL-15, IL-18, IL-21 и IL-27), биологическими функциями и иммуноиндуцирующими эффектами, путем измерения количества и пролиферативной способности CAR-T-клеток, как указано ниже.

[0153] Т-клетки окрашивали красителем CytoTell™ UltraGreen (ААТ Bioquest), а затем совместно культивировали в той же лунке, в которой культивировали мастоцитому

P815 (hCD20/P815), обрабатывали митомицином С и генетически трансформировали для экспрессии человеческого CD20 с последующей стимуляцией. После культивирования в течение 3 дней, 5 дней или 7 дней после начала стимуляции, клетки собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии. Клетки окрашивали APC-связанным моноклональным антителом против Thy1.2 (eBioscience), и количество Thy1.2-позитивных клеток в популяции Т-клеток (лимфоцитов) подсчитывали как число выживших Т-клеток.

[0154] На фигуре 3 представлены результаты. Нетрансдуцированные (-) Т-клетки (Сравнительный пример 1) не подвергались стимуляции для активации даже при совместном культивировании с клетками hCD20/P815, и количество живых клеток составляло 1/10 или менее на 3-й день культивирования. Между тем, на 3-й день культивирования было подтверждено, что уровень пролиферации живых клеток был эквивалентен или превышал уровень преобразованных CAR-Т-клеток (Сравнительный пример 2), используемых в качестве контроля, и поддерживался в Т-клетках, содержащих CAR IL15_{LSP} × CCL19 (Пример 1-1), в Т-клетках, содержащих CAR_sIL15_{RA} × CCL19 (Пример 1-2), в Т-клетках, содержащих CAR_{mb}IL15_{RA} × CCL19 (Пример 1-3), в Т-клетках, содержащих CAR_{sushi}IL15 × CCL19 (Пример 1-4), в Т-клетках, содержащих CAR IL-18 × CCL19 (Пример 2), в Т-клетках, содержащих CAR IL-21 × CCL19 (Пример 3), и в Т-клетках, содержащих CAR_{sc}IL27 × CCL19 (Пример 4), которые были совместно культивированы с клетками hCD20/P815. Кроме того, если культивирование продолжалось до 7 дня, то Т-клетки, содержащие CAR_sIL15_{RA} × CCL19 (Пример 1-2), Т-клетки, содержащие CAR_{mb}IL15_{RA} × CCL19 (Пример 1-3), и Т-клетки, содержащие CAR_{sushi}IL15 × CCL19 (Пример 1-4), в целом сохраняли высокий уровень пролиферации. Т-клетки, содержащие CAR IL-15_{LSP} × CCL19 (Пример 1-1), Т-клетки, содержащие CAR IL-18 × CCL19 (Пример 2), Т-клетки, содержащие CAR IL-21 × CCL19 (Пример 3), и Т-клетки, содержащие CAR_{sc}IL27 × CCL19 (Пример 4) сохраняли число клеток, эквивалентное числу преобразованных CAR-Т-клеток (Сравнительный пример 2), используемых в качестве контроля, на дни культивирования 3-7.

[0155] Кроме того, были построены гистограммы по данным анализа на интенсивность окрашивания реагентом CytoTell в популяции Thy1.2-позитивных клеток. На фигуре 4 показаны результаты для каждой популяции клеток через 5 дней после начала стимуляции. В Т-клетках, содержащих CAR IL15_{LSP} × CCL19 (Пример 1-1), в Т-клетках, содержащих CAR_sIL15_{RA} × CCL19 (Пример 1-2), в Т-клетках, содержащих CAR_{mb}IL15_{RA} × CCL19 (Пример 1-3), в Т-клетках, содержащих CAR_{sushi}IL15 × CCL19 (Пример 1-4), в Т-клетках, содержащих CAR IL-18 × CCL19 (Пример 2), в Т-клетках, содержащих CAR IL-21 × CCL19 (Пример 3), число популяций клеток второго поколения (после одного деления) значительно уменьшалось, а число популяций клеток после пятого поколения (после четырех и более делений) увеличилось по сравнению с преобразованными CAR-Т-клетками (Сравнительный пример 2), используемыми в качестве контроля.

[0156] Исходя из результатов, представленных на фигуре 3 и фигуре 4, было выявлено, что комбинации слитого белка IL-15/IL-15_{RA} и CCL19, продуцируемых в Т-

клетках, содержащих CAR $_{sIL15_{RA}} \times CCL19$ (Пример 1-2), в Т-клетках, содержащих CAR $_{mbIL15_{RA}} \times CCL19$ (Пример 1-3), и в Т-клетках, содержащих CAR $_{sushiIL15} \times CCL19$ (Пример 1-4), являются особенно предпочтительными для стимуляции выживания и пролиферации CAR-Т клеток и осуществления биологических функций.

[0157] [Экспериментальный пример 3] Оценка противоопухолевой цитотоксической активности CAR-Т-клеток

С использованием Т-клеток, полученных как описано выше в Примерах и в Сравнительных примерах, оценивали противоопухолевую цитотоксическую активность, специфичную к антигену-мишени.

[0158] [А: Оценка противоопухолевой цитотоксической активности с помощью проточной цитометрии]

Мастоцитомы P815 (hCD20/P815), генетически трансформированные для экспрессии человеческого CD20, использовали в качестве опухолевых клеток-мишеней, а мастоцитомы P815 (P815), которые не были генетически трансформированы, как указано выше, использовали в качестве контрольных опухолевых клеток.

[0159] После сбора опухолевых клеток-мишеней или контрольных опухолевых клеток и их посева на культуральный планшет, CAR-Т-клетки Примеров (Т-клетки, содержащие CAR $_{IL15_{LSP}} \times CCL19$ (Пример 1-1), Т-клетки, содержащие CAR $_{sIL15_{RA}} \times CCL19$ (Пример 1-2), Т-клетки, содержащие CAR $_{mbIL15_{RA}} \times CCL19$ (Пример 1-3), Т-клетки, содержащие CAR $_{sushiIL15} \times CCL19$ (Пример 1-4), Т-клетки, содержащие CAR $_{IL-18} \times CCL19$ (Пример 2), Т-клетки, содержащие CAR $_{IL-21} \times CCL19$ (Пример 3), и Т-клетки, содержащие CAR $_{scIL27} \times CCL19$ (Пример 4)), или CAR-Т-клетки Сравнительного примера 2 (преобразованные CAR-Т-клетки) добавляли в качестве эффекторных Т-клеток, и эти клетки совместно культивировали в течение 72 часов. Эффекторные Т-клетки добавляли так, чтобы число CAR-позитивных клеток составляло 1/3 от опухолевых клеток-мишеней (в отношении E:T=1:3), и общие количества засеянных Т-клеток были выбраны так, чтобы они были одинаковыми в каждой группе, путем добавления, в соответствии с количеством Т-клеток, засеянных с самым низким уровнем экспрессии CAR, нетрансдуцированных Т-клеток, к другим группам Т-клеток. После совместного культивирования в течение 72 часов, все клетки собирали, анализировали с помощью проточной цитометрии и определяли число живых клеток. Клетки окрашивали APC-связанным моноклональным антителом против Thy1.2 (eBioscience) и с использованием набора для оценки жизнеспособности клеток посредством фиксированного зеленого Zombie Green Fixable Viability Kit (BioLegend), и число Т-клеток и опухолевых клеток в популяции живых клеток вычисляли по числу Thy1.2-позитивных клеток. Количество живых клеток определяли с помощью NucleoCounter NC-200 (Chemometec).

[0160] На фигуре 5 представлены результаты. Как показано на Фигуре 5А, количество опухолевых клеток hCD20/P815 после совместного культивирования в течение 72 часов было вычислено исходя из уровня Thy1.2-негативных клеток в живых клетках. В результате, количество опухолевых клеток hCD20/P815, совместно культивируемых с Т-

клетками, содержащими CAR IL15_{LSP} × CCL19 (Пример 1-1), Т-клетками, содержащими CAR_sIL15_{RA} × CCL19 (Пример 1-2), Т-клетками, содержащими CAR_{mb}IL15_{RA} × CCL19 (Пример 1-3), Т-клетками, содержащими CAR_{sushi}IL15 × CCL19 (Пример 1-4), Т-клетками, содержащими CAR IL-18 × CCL19 (Пример 2), Т-клетками, содержащими CAR IL-21 × CCL19 (Пример 3), и Т-клетками, содержащими CAR_{sc}IL27 × CCL19 (Пример 4), значительно снижалось по сравнению с нетрансдуцированными (-) Т-клетками (Сравнительный пример 1), а также снижалось по сравнению с преобразованными CAR-Т-клетками (Сравнительный пример 2), и выживаемость опухолевых клеток составляла 1% или менее. Между тем, ни в одной группе не наблюдалось никакого снижения числа опухолевых клеток, клеток P815, не экспрессирующих человеческий CD20, как показано на фигуре 5В, и не было подтверждено отсутствие цитотоксичности, которая не является специфичной к опухолевым клеткам, не экспрессирующим человеческий CD20.

[0161] [В: Оценка продуцирования IFN γ с помощью анализа ELISA]

В качестве индекса активации цитотоксичности, специфичной к антигену-мишени, был определен уровень продуцирования интерферона γ (IFN γ) CAR-Т клетками с помощью коммерчески доступного набора для анализа ELISA (R&D). CAR-Т-клетки Примеров (Т-клетки, содержащие CAR IL15_{LSP} × CCL19 (Пример 1-1), Т-клетки, содержащие CAR_sIL15_{RA} × CCL19 (Пример 1-2), Т-клетки, содержащие CAR_{mb}IL15_{RA} × CCL19 (Пример 1-3), Т-клетки, содержащие CAR_{sushi}IL15 × CCL19 (Пример 1-4), Т-клетки, содержащие CAR IL-18 × CCL19 (Пример 2), Т-клетки, содержащие CAR IL-21 × CCL19 (Пример 3), и Т-клетки, содержащие CAR_{sc}IL27 × CCL19 (Пример 4)), или CAR-Т-клетки Сравнительного примера 2 (преобразованные CAR-Т-клетки) совместно культивировали с клетками P815 (контрольными опухолевыми клетками) или клетками hCD20-P815 (опухолевыми клеткам-мишенями) для определения количества IFN γ в супернатанте культуры через 4 дня после совместного культивирования.

[0162] На фигуре 6 показаны результаты. Как показано на фигуре 6А, уровень IFN γ был выше, чем в преобразованных CAR-Т-клетках (Сравнительный пример 2), и приблизительно 15 нг/мл или более IFN γ детектировали в супернатанте культуры Т-клеток, содержащих CAR IL15_{LSP} × CCL19 (Пример 1-1), Т-клеток, содержащих CAR_sIL15_{RA} × CCL19 (Пример 1-2), Т-клеток, содержащих CAR_{mb}IL15_{RA} × CCL19 (Пример 1-3), Т-клеток, содержащих CAR_{sushi}IL15 × CCL19 (Пример 1-4), Т-клеток, содержащих CAR IL-18 × CCL19 (Пример 2), Т-клеток, содержащих CAR IL-21 × CCL19 (Пример 3), и Т-клеток, содержащих CAR_{sc}IL27 × CCL19 (Пример 4), которые совместно культивировали с клетками hCD20-P815. Уровень IFN γ , продуцируемого в группах, совместно культивированных с нетрансдуцированными (-) Т-клетками (Сравнительный пример 1), был ниже предела детектирования. Между тем, концентрация IFN γ в супернатанте культуры CAR-экспрессирующих клеток, совместно культивированных с клетками P815, составляла 10 пг/мл или менее, как показано на Фигуре 6В.

[0163] Исходя из приведенных выше результатов экспериментального примера 3 (фигура 5 и фигура 6) было подтверждено, что все Т-клетки Примеров и Сравнительного

примера 2 представляли собой клетки, экспрессирующие человеческий CD20, то есть, обладали цитотоксической активностью, специфичной к антигену-мишени.

[0164] [Экспериментальный пример 4] Терапевтический эффект на модели мышных опухолей

Терапевтический эффект Т-клеток, полученных как описано в Примере 1-3, в Примере 1-4 и в Сравнительном примере 2, на модели трансплантата опухоли мышинной меланомы или на модели мышинной раковой опухоли прямой и ободочной кишки оценивали с использованием описанных ниже мышей с раковой опухолью.

[0165] (Терапевтический эффект на модели трансплантата мышинной меланомы)

5×10^5 клеток B16F10 мышинной меланомы, генетически трансформированных для экспрессии человеческого CD20 (B16F10-hCD20), подкожно инокулировали мышам C57BL/6N. Противораковое средство, циклофосфамид (CPA, 50 мг/кг), вводили внутривенно на 7 день после инокуляции, и 1×10^6 CAR-T-клеток Примера 1-3 (Т-клеток, содержащих CAR_{mbIL15RA}×CCL19), CAR-T клеток Примера 1-4 (Т-клеток, содержащих CAR_{sushiIL15}×CCL19) или клеток Сравнительного примера 2 (преобразованных CAR-T-клеток) вводили внутривенно на 10-й день. В качестве контрольных групп была отобрана группа, которая не была обработана CAR-T, и которой вводили только CPA, и группа, которую инокулировали мышинной меланомой B16F10-hCD20, и которая впоследствии не подвергалась лечению. Объем опухоли у мышей измеряли два раза в неделю.

[0166] На Фигуре 16 показаны результаты определения объема опухоли на модели опухолевого трансплантата мышинной меланомы. На горизонтальной оси показано число дней после инокуляции, где день, когда мышам подкожно инокулировали B16F10-hCD20, был принят за день 0, а на вертикальной оси показан объем опухоли (большой диаметр опухоли) × (малый диаметр опухоли)²/2 (мм³). Стандартное отклонение вычисляли для каждой экспериментальной группы. Термин «без лечения» означает группу, не получавшую лечения, термин «CPA» означает группу, которой вводили только CPA, термин «CPA+Conv». означает группу, которой вводили CPA, а затем вводили клетки Сравнительного примера 2 (преобразованные CAR-T-клетки), термин «CPA+_{mbIL15RA} × 19» означает группу, которой вводили CPA, а затем вводили CAR-T-клетки Примера 1-3 (Т-клетки, содержащие CAR_{mbIL15RA}×CCL19), а термин «CPA+_{sushiIL15}×19» означает группу, которой вводили CPA, а затем вводили CAR-T-клетки Примера 1-4 (Т-клетки, содержащие CAR_{sushiIL15}×CCL19).

[0167] Как показано на Фигуре 16, эффект уменьшения объема опухоли был подтвержден в группах, которым вводили CAR-T-клетки примера 1-3 (Т-клетки, содержащие CAR_{mbIL15RA}×CCL19) и CAR-T-клетки Примера 1-4 (Т-клетки, содержащие CAR_{sushiIL15}×CCL19) по сравнению с группами, которым вводили клетки Сравнительного примера 2 (преобразованные CAR-T-клетки), с необработанными группами (без лечения) и с группами, которым вводили только CPA. Соответственно, было обнаружено, что CAR-T-клетки Примера 1-3 (Т-клетки, содержащие CAR

mbIL15_{RA}×CCL19) и CAR-T-клетки Примера 1-4 (Т-клетки, содержащие CAR_{sushi}IL15×CCL19) обладали превосходной противоопухолевой активностью у мышей с моделью меланомы.

[0168] (Терапевтический эффект на модели трансплантата мышшиной раковой опухоли прямой и ободочной кишки)

5×10^5 клеток MC38 (MC38-hCD20) мышшиной раковой опухоли прямой и ободочной кишки, генетически трансформированных для экспрессии человеческого CD20, подкожно инокулировали мышам C57BL/6N. Противораковое средство, циклофосамид (CPA, 50 мг/кг), вводили внутривенно на 7-й день после инокуляции, и 1×10^6 CAR-T-клеток Примера 1-3 (Т-клеток, содержащих CAR_{mb}IL15_{RA}×CCL19), CAR-T клеток Примера 1-4 (Т-клеток, содержащих CAR_{sushi}IL15×CCL19) или клеток Сравнительного примера 2 (преобразованных CAR-T-клеток) вводили внутривенно на 10-й день. В качестве контрольных групп была отобрана группа, которая не была обработана CAR-T, и которой вводили только CPA, и группа, которую инокулировали мышшиной раковой опухолью прямой и ободочной кишки MC38-hCD20, и которая впоследствии не подвергалась лечению. Объем опухоли у мышей измеряли два раза в неделю.

[0169] На Фигуре 17 показаны результаты определения объема опухоли на мышшиной модели трансплантата раковой опухоли прямой и ободочной кишки. На горизонтальной оси показано число дней после инокуляции, где день, когда мышам подкожно инокулировали MC38-hCD20, был принят за день 0, а на вертикальной оси показан объем опухоли (большой диаметр опухоли) × (малый диаметр опухоли)²/2 (мм³). Стандартное отклонение вычисляли для каждой экспериментальной группы. Термин «без лечения» означает группу, не получавшую лечения, термин «CPA» означает группу, которой вводили только CPA, термин «CPA+Conv». означает группу, которой вводили CPA, а затем вводили клетки Сравнительного примера 2 (преобразованные CAR-T-клетки), термин «CPA+_{mb}IL15_{RA} × 19» означает группу, которой вводили CPA, а затем вводили CAR-T-клетки Примера 1-3 (Т-клетки, содержащие CAR_{mb}IL15_{RA}×CCL19), а термин «CPA+_{sushi}IL15×19» означает группу, которой вводили CPA, а затем вводили CAR-T-клетки Примера 1-4 (Т-клетки, содержащие CAR_{sushi}IL15×CCL19).

[0170] Как показано на Фигуре 17, эффект уменьшения объема опухоли был подтвержден в группах, которым вводили CAR-T-клетки примера 1-3 (Т-клетки, содержащие CAR_{mb}IL15_{RA}×CCL19) и CAR-T-клетки Примера 1-4 (Т-клетки, содержащие CAR_{sushi}IL15×CCL19) по сравнению с группами, которым вводили клетки Сравнительного примера 2 (преобразованные CAR-T-клетки), с необработанными группами (без лечения) и с группами, которым вводили только CPA. В соответствии с этим, было обнаружено, что CAR-T-клетки Примера 1-3 (Т-клетки, содержащие CAR_{mb}IL15_{RA}×CCL19) и CAR-T-клетки Примера 1-4 (Т-клетки, содержащие CAR_{sushi}IL15×CCL19) обладали превосходной противоопухолевой активностью у мышей с моделью раковой опухоли прямой и ободочной кишки.

[0171] В приведенных выше примерах и экспериментальных примерах

использовали мышинные Т-клетки, цитокин (слитый белок с IL-15, связанным с IL-15R α или т.п.) и хемокин (CCL19), каждый из которых содержит природную мышиную аминокислотную последовательность, и проводили тесты *in vivo* на мышах. Однако, специалистам в данной области очевидно, что в вариантах изобретения, также относящихся к млекопитающим, кроме мышей, а предпочтительно к человеку, то есть, в случае использования человеческих Т-клеток, цитокина (слитого белка с IL-15, связанного с IL-15R α или т.п.) или хемокина (CCL19), каждый из которых содержит человеческую природную аминокислотную последовательность или при проведении тестов *in vivo* с участием человека, настоящее изобретение может быть осуществлено таким же способом в целях выявления действия и эффекта согласно изобретению.

[0172] Так, например, слитый белок, содержащий IL-15_{LSP}, который был получен (продуцирован и применен) с использованием природной мышинной аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 5, может быть получен с использованием аминокислотных последовательностей в положениях 1-29 (часть сигнального пептида) и 49-162 (часть IL-15) в природной человеческой аминокислотной последовательности для IL-15, как показано в SEQ ID NO: 18, или с использованием нуклеиновых кислот, имеющих нуклеотидную последовательность, кодирующую такие аминокислотные последовательности.

[0173] Слитый белок, содержащий sIL15_{RA}, который был получен с использованием природной мышинной аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 7, может быть получен с использованием аминокислотной последовательности в положениях 49-162 (часть IL-15) в природной человеческой аминокислотной последовательности для IL-15, как показано в SEQ ID NO: 18, и с использованием аминокислотной последовательности в положениях 31-205 (внеклеточный домен IL-15R α) в природной человеческой аминокислотной последовательности для IL-15R α , как показано в SEQ ID NO: 19, или с использованием нуклеиновых кислот, имеющих нуклеотидную последовательность, кодирующую такие аминокислотные последовательности.

[0174] Слитый белок, содержащий mbIL15_{RA}, который был получен с использованием природной мышинной аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 7, может быть получен с использованием аминокислотной последовательности в положениях 49-162 (часть IL-15) в природной человеческой аминокислотной последовательности для IL-15, как показано в SEQ ID NO: 18, и с использованием аминокислотной последовательности в положениях 1-267 (полноразмерный IL-15R α) в природной человеческой аминокислотной последовательности для IL-15R α , как показано в SEQ ID NO: 19, или с использованием нуклеиновых кислот, имеющих нуклеотидную последовательность, кодирующую такие аминокислотные последовательности.

[0175] Слитый белок, содержащий sushIL15, который был получен с использованием природной мышинной аминокислотной последовательности, показанной в

SEQ ID NO: 11, может быть получен с использованием аминокислотной последовательности в положениях 49-162 (часть IL-15) в природной человеческой аминокислотной последовательности для IL-15, как показано в SEQ ID NO: 18, и с использованием аминокислотной последовательности в положениях 31-95 (домен sushi) в природной человеческой аминокислотной последовательности для IL-15 α , как показано в SEQ ID NO: 19, или с использованием нуклеиновых кислот, имеющих нуклеотидную последовательность, кодирующую такие аминокислотные последовательности.

Промышленное применение

[0176] CAR-T-клетки согласно изобретению, которые обладают превосходной персистенцией и пролиферацией, являются подходящими для приготовления лекарственного средства для лечения рака или т.п. Кроме того, экспрессионный вектор согласно изобретению является подходящим для продуцирования CAR-T-клеток.

Список последовательностей в свободном формате

[0177] SEQ ID NO: 1: Нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК, содержащего CAR против человеческого CD20 (фрагмента ДНК #1).

SEQ ID NO: 2: Аминокислотная последовательность слитого белка, экспрессируемая нуклеотидной последовательностью в положениях 3-1637 фрагмента ДНК #1.

SEQ ID NO: 3: Нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК MCS, кодирующего стоп-кодона и сайты рестриктирующих ферментов (фрагмента ДНК #2).

SEQ ID NO: 4: Нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК IL15_{LSP}_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #3).

SEQ ID NO: 5: Аминокислотная последовательность полноразмерного слитого белка, которая экспрессируется нуклеотидной последовательностью в положениях 7-969 фрагмента ДНК #3, саморасщепляется в двух сайтах F2A и содержит IL15_{LSP}.

SEQ ID NO: 6: Аминокислотная последовательность фрагмента ДНК sIL15_{RA}_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #4).

SEQ ID NO: 7: Аминокислотная последовательность полноразмерного слитого белка, которая экспрессируется нуклеотидной последовательностью в положениях 7-1539 фрагмента ДНК #4, саморасщепляется в двух сайтах F2A и содержит sIL15_{RA}.

SEQ ID NO: 8: Нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК mbIL15_{RA}_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #5).

SEQ ID NO: 9: Аминокислотная последовательность полноразмерного слитого белка, которая экспрессируется нуклеотидной последовательностью в положениях 7-1713 фрагмента ДНК #5, саморасщепляется в двух сайтах F2A и содержит mbIL15_{RA}.

SEQ ID NO: 10: Нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК sushiIL15_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #6).

SEQ ID NO: 11: Аминокислотная последовательность полноразмерного слитого белка, которая экспрессируется нуклеотидной последовательностью в положениях 7-1179 фрагмента ДНК #6, саморасщепляется в двух сайтах F2A и содержит sushiIL15.

SEQ ID NO: 12: Нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК IL-18_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #7).

SEQ ID NO: 13: Аминокислотная последовательность полноразмерного слитого белка, которая экспрессируется нуклеотидной последовательностью в положениях 7-1059 фрагмента ДНК #7, и саморасщепляется в двух сайтах F2A.

SEQ ID NO: 14: Нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК IL-21_F2A_CCL19 (фрагмента ДНК #8).

SEQ ID NO: 15: Аминокислотная последовательность полноразмерного слитого белка, которая экспрессируется нуклеотидной последовательностью в положениях 7-969 фрагмента ДНК #8, и саморасщепляется в двух сайтах F2A.

SEQ ID NO: 16: Фрагмент ДНК $scIL27_F2A_CCL19$ (фрагмент ДНК #9).

SEQ ID NO: 17: Аминокислотная последовательность полноразмерного слитого белка, которая экспрессируется нуклеотидной последовательностью в положениях 7-1839 фрагмента ДНК #9, саморасщепляется в двух сайтах F2A и содержит $scIL27$.

SEQ ID NO: 18: Аминокислотная последовательность природного человеческого IL-15 (полноразмерного, включая части сигнального пептида и пропептида), зарегистрированная как UniProtKB-P40933.

SEQ ID NO: 19: Аминокислотная последовательность природного человеческого IL-15R α (полноразмерного, включая сигнальный пептид, домен sushi, внеклеточный домен и т.п.), зарегистрированная как UniProtKB-Q13261.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Т-клетка, экспрессирующая:

(1) химерный антигенный рецептор (CAR);

(2) по меньшей мере один цитокин, выбранный из группы, состоящей из интерлейкина-18 (IL-18), интерлейкина-21 (IL-21) и интерлейкина-27 (IL-27); и

(3) лиганд хемокина CC 19 (CCL19).

2. Фармацевтическая композиция, содержащая Т-клетку по п.1.

3. Фармацевтическая композиция по п.2 для применения в лечении рака.

4. Фармацевтическая композиция для применения по п.3, где рак представляет собой меланому, рак клеток Меркеля, рак прямой и ободочной кишки, рак почек, рак молочной железы, рак яичника, рак фаллопиевых труб, рак шейки матки, рак печени, рак легких, немелкоклеточный рак легких, рак головы и шеи, рак тонкой кишки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак прямой кишки, рак поджелудочной железы, саркому Юинга, рабдомиосаркому, рак носоглотки, рак пищевода, рак желчных путей, нейробластому, остеосаркому, острый миелоидный лейкоз, множественную миелому, лимфому или лейкоз.

5. Экспрессионный вектор, содержащий:

(1) нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR;

(2) нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере один цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-18, IL-21 и IL-27; и

(3) нуклеиновую кислоту, кодирующую CCL19.

6. Способ получения CAR-Т-клетки, включающий стадию введения экспрессионного вектора по п.5 в Т-клетку.

7. Способ лечения рака, включающий стадию введения Т-клетки по п.1 индивидууму, нуждающемуся в лечении рака.

8. Способ лечения по п.7, где рак представляет собой меланому, рак клеток Меркеля, рак прямой и ободочной кишки, рак почек, рак молочной железы, рак яичника, рак фаллопиевых труб, рак шейки матки, рак печени, рак легких, немелкоклеточный рак легких, рак головы и шеи, рак тонкой кишки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак прямой кишки, рак поджелудочной железы, саркому Юинга, рабдомиосаркому, рак носоглотки, рак пищевода, рак желчных путей, нейробластому, остеосаркому, острый миелоидный лейкоз, множественную миелому, лимфому или лейкоз.

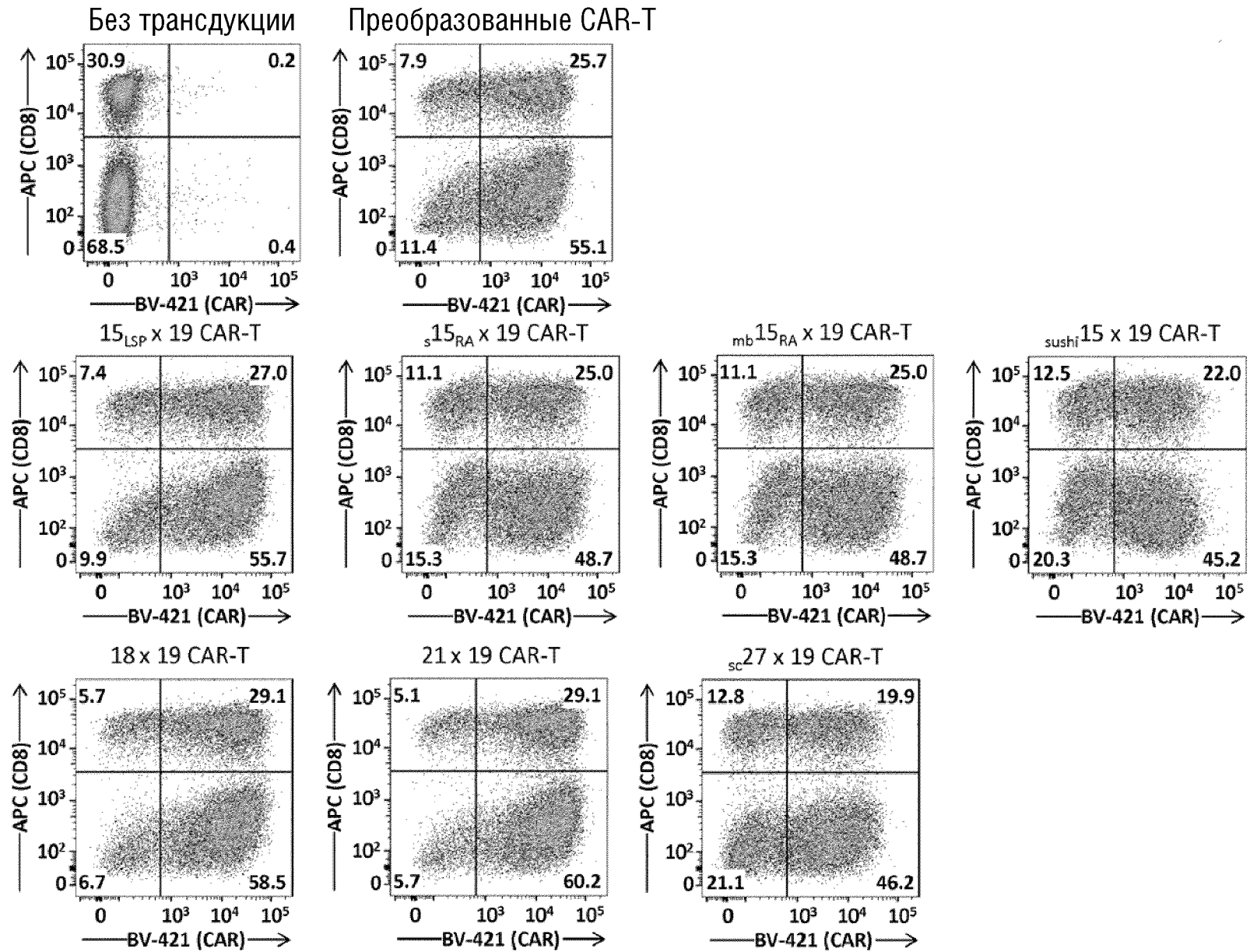
9. Применение Т-клетки по п.1 для получения фармацевтической композиции для лечения рака.

10. Применение по п.9, где рак представляет собой меланому, рак клеток Меркеля,

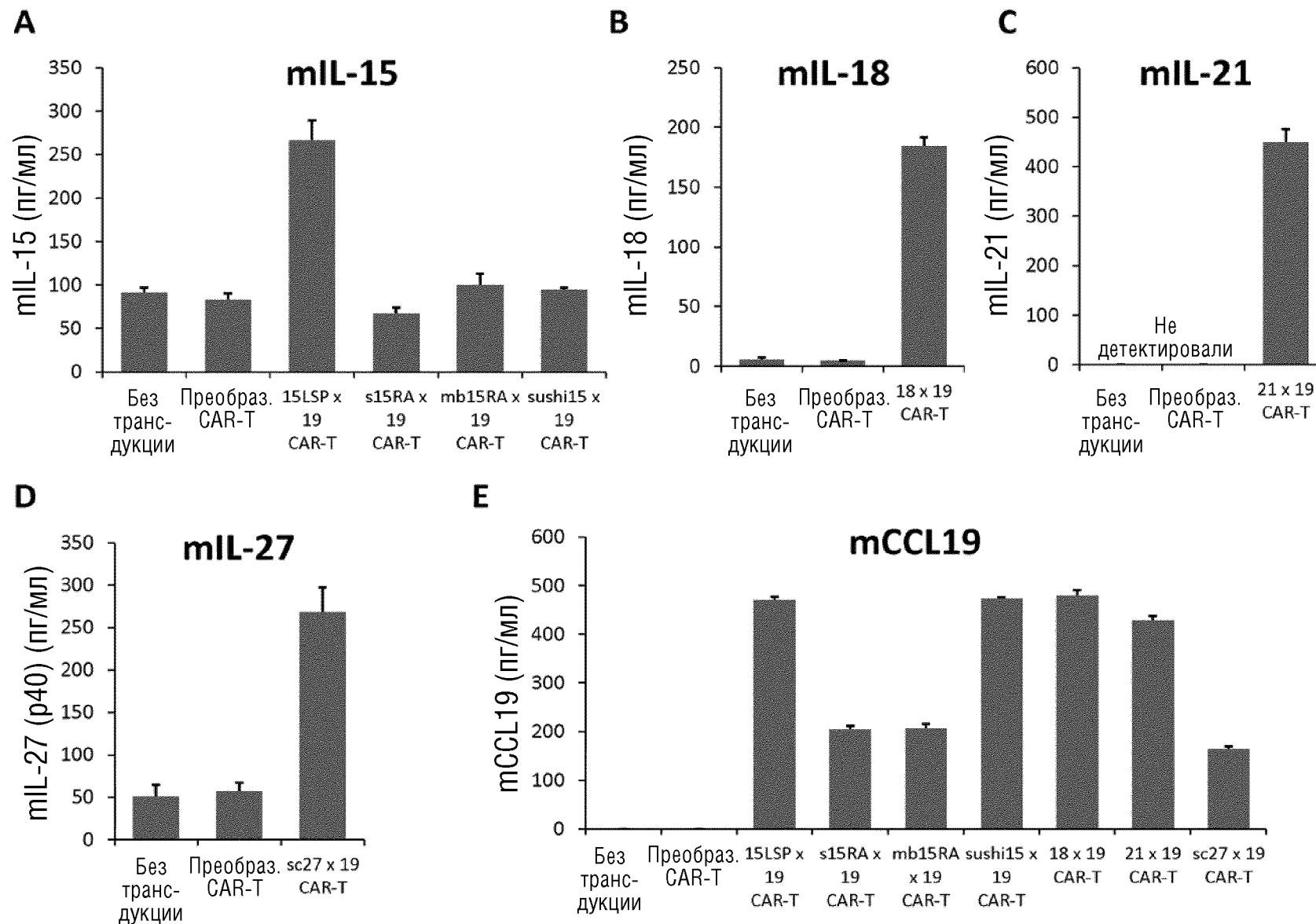
рак прямой и ободочной кишки, рак почек, рак молочной железы, рак яичника, рак фаллопиевых труб, рак шейки матки, рак печени, рак легких, немелкоклеточный рак легких, рак головы и шеи, рак тонкой кишки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак прямой кишки, рак поджелудочной железы, саркому Юинга, рабдомиосаркому, рак носоглотки, рак пищевода, рак желчных путей, нейробластому, остеосаркому, острый миелоидный лейкоз, множественную миелому, лимфому или лейкоз.

По доверенности

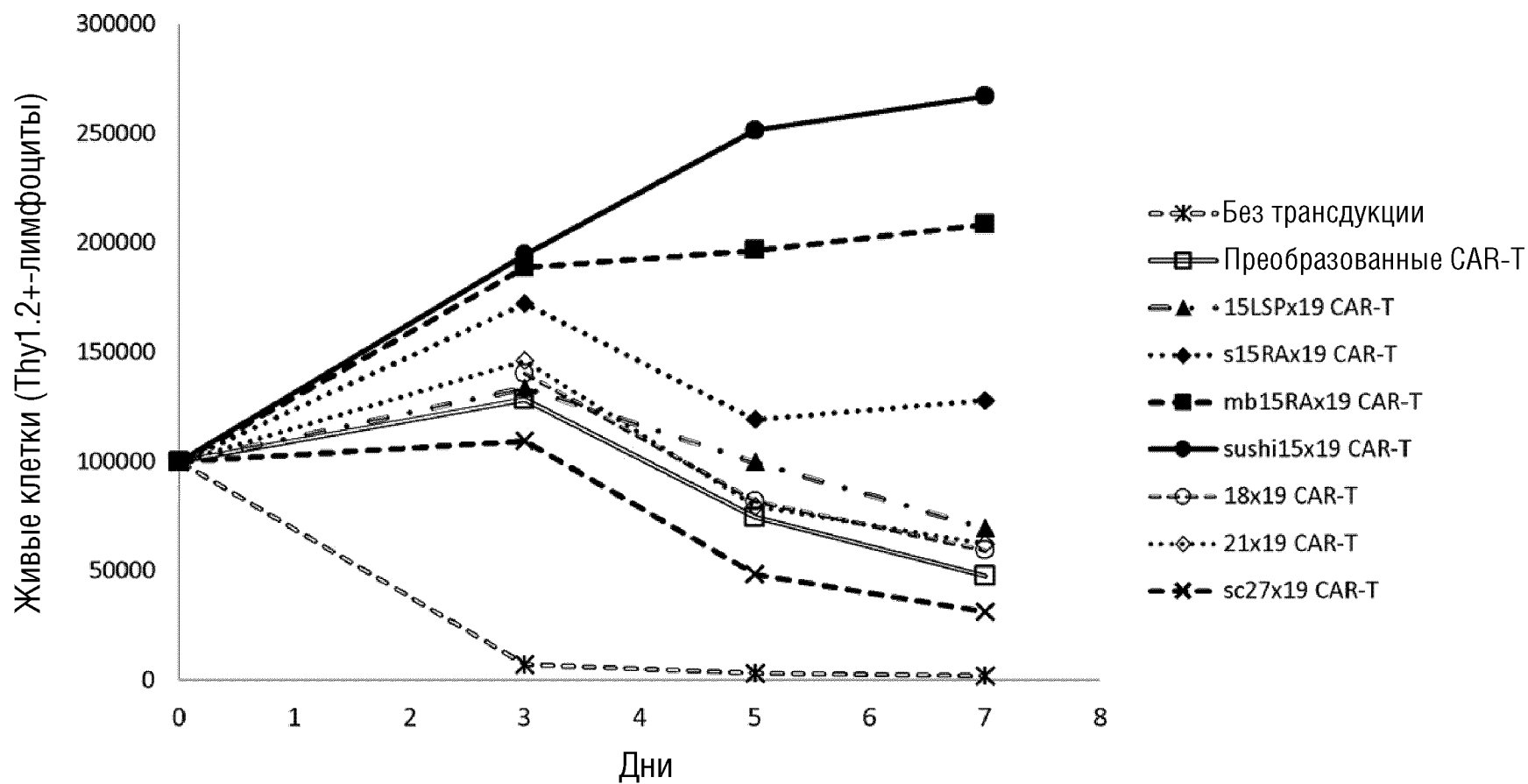
ФИГ.1



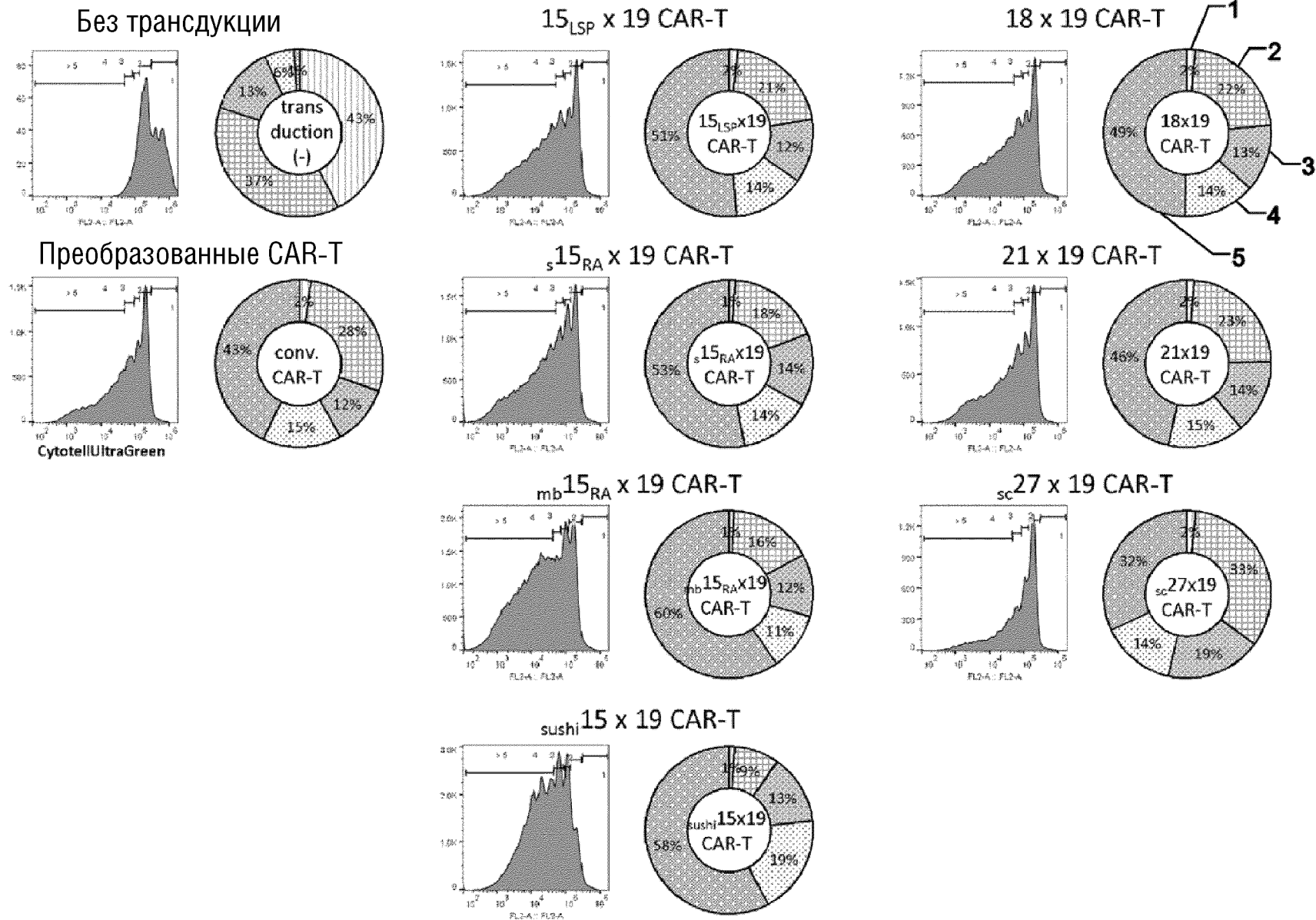
ФИГ.2



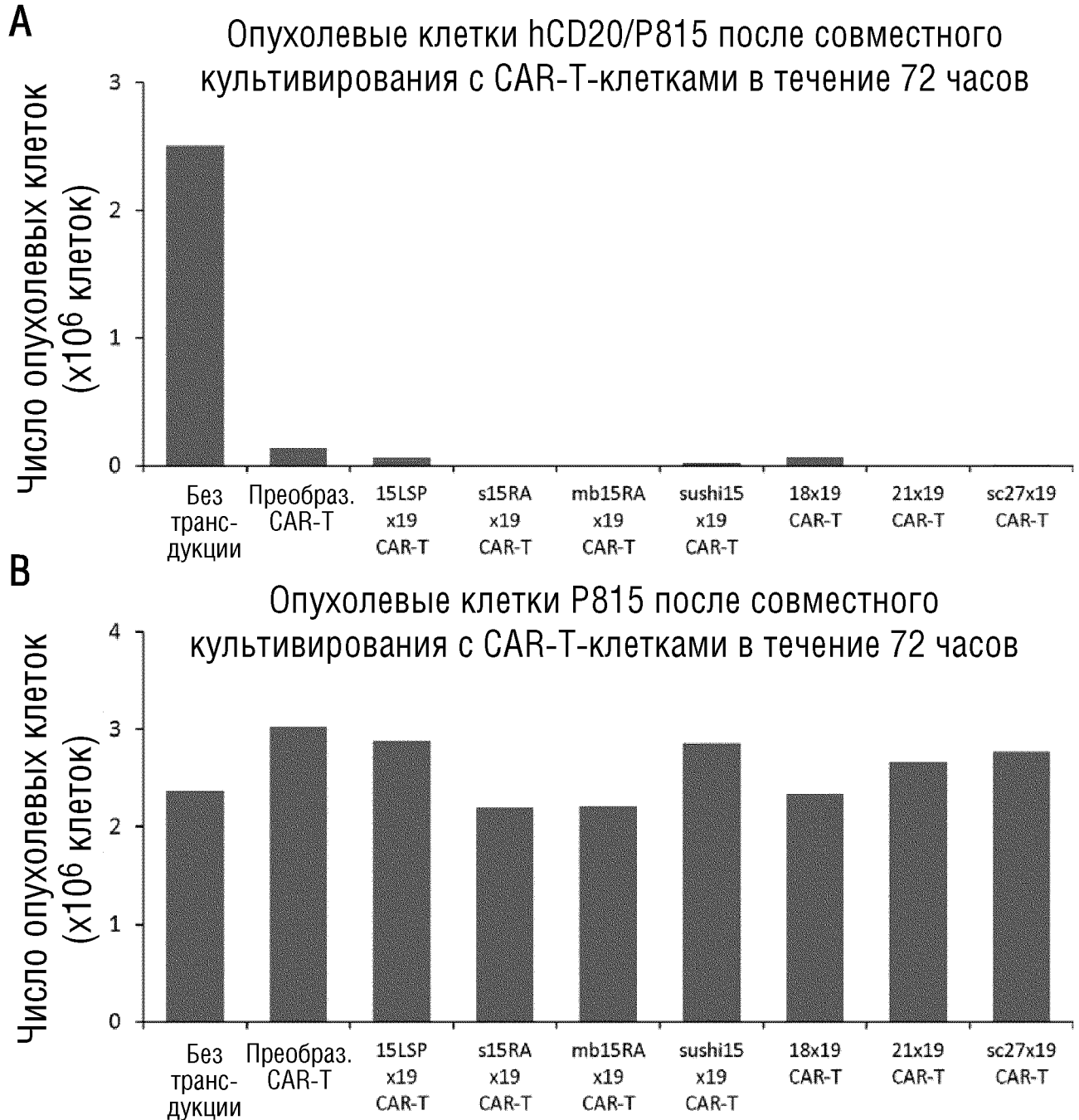
ФИГ.3



ФИГ.4



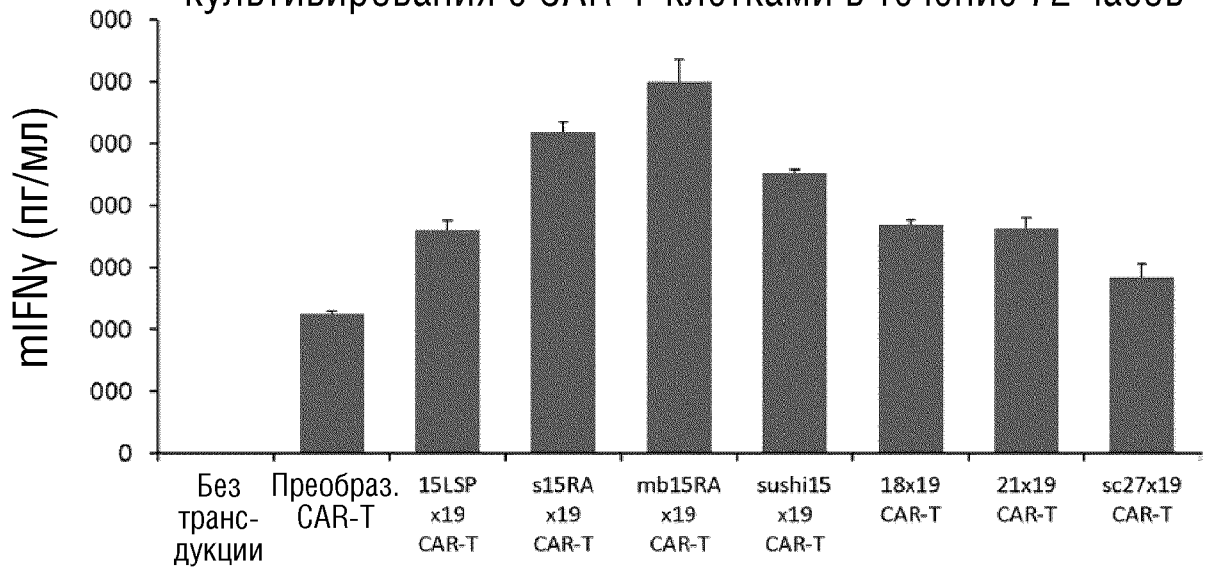
ФИГ.5



ФИГ.6

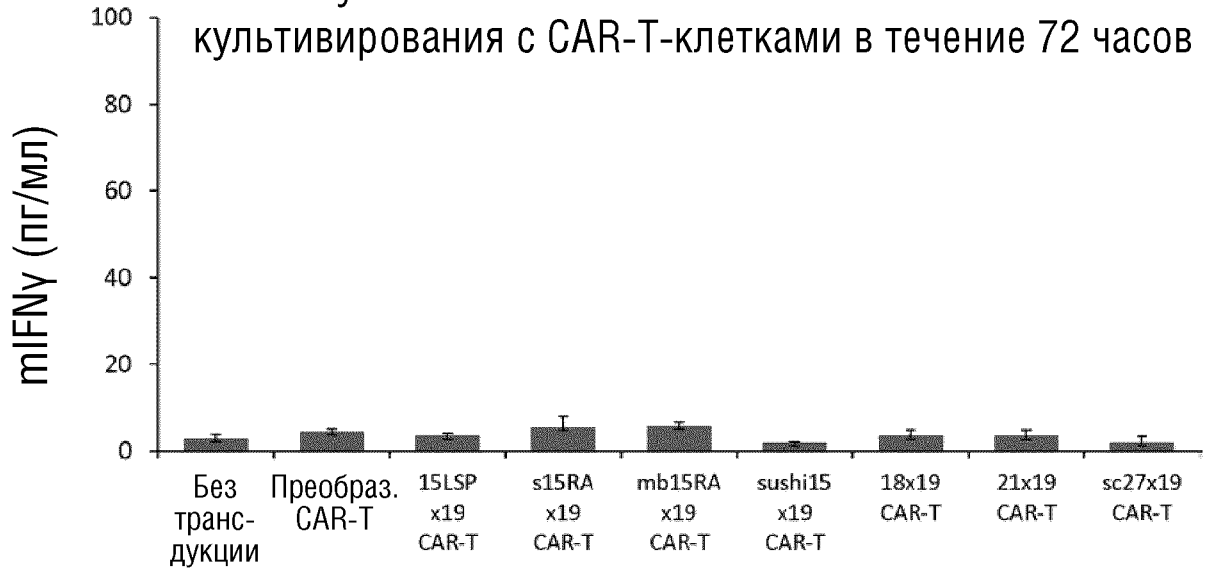
А

Опухолевые клетки hCD20/P815 после совместного культивирования с CAR-T-клетками в течение 72 часов



В

Опухолевые клетки P815 после совместного культивирования с CAR-T-клетками в течение 72 часов



ФИГ.7

SEQ ID NO: 1: фрагмент ДНК CAR против человеческого CD20
(фрагмент ДНК #1)

scFv против человеческого CD20

CCATGGACTGGACCTGGCGGATCCTGTTCCTGGTGGCTGCTGCTACAGGCGCCACAGCC
 Nco I
 AGATCGTGTCTCTCAGTCTCCCGCCATCCTGTCTGCTAGCCCTGGCGAGAAAGTGACCA
 TGACCTGCAGAGCCAGCAGCAGCGTGTCTTACATCCACTGGTTCAGCAGAAGCCCGGCA
 GCAGCCCCAAGCCTTGGATCTACGCCACAAGCAACCTEGCCTCTGGCGTGCCAGTGCGGT
 TTAGCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGCTACAGCCTGACCATCAGCAGAGTGGAAGCCGAGG
 ACGCCGCCACCTACTACTGTCAGCAGTGGACCAGCAACCCCCCACATTCGGCGGAGGCA
 CCAAGCTGGAAATCAAGGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTGGGGGAGGCGGCT
 CTCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCTGAGCTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGA
 TGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACAAGCTACAACATGCACTGGGTCAAGCAGA
 CCCCTGGCAGAGGCCTGGAATGGATCGGCGCTATCTACCCCGCAACGGCGACACCTCCT
 ACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGAGCAGCAGCACAGCCT
 ACATGCAGCTGTCCCTCCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGATCTA
 CCTACTACGGCGGCGACTGGTACTTCAACGTGTGGGGCGCTGGCACCACCCTGACCGTGT
 3-й домен TM (CD8)
 CTGCTGCGGCCGCAGTCTGTCAGTCTCCTTCAGAAAGTGAACCTACTACTACCAAGCCAG
 TGCTGCGAACTCCCTCACCTGTGCACCCTACCGGGACATCTCAGCCCCAGAGACCAGAAG
 ATTGTCGGCCCCGTGGCTCAGTGAAGGGGACCGGATTEGACTTCGCCTGTGATATTTACA
 TCTGGGCACCCTTGGCCGGAATCTGCGTGGCCCCCTCTGCTGTCCCTTGATCATCACTCTCA
 TCTGCTACCACAGGAGCCGAAATAGTAGAAGGAACAGACTCCTTCAAAGTGACTACATGA
 домен CP (CD28_4-1BB_CD3z)
 ACATGACTCCCCGGAGGCCTGGGCTCACTCGAAAGCCTTACCAGCCCTACGCCCTGCCA
 GAGACTTTGCAGCGTACCGCCCCAAATGGATCAGGAAAAAATTCCCCCACATATTC AAGC
 AACCATTTAAGAAGACCACTGGAGCAGCTCAAGAGGAAGATGCTTGTAGCTGCCGATGTC
 CACAGGAAGAAGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGCIATGAGCTGAGAGCAAAATTCAGCAGGAGTG
 CAGAGACTGCTGCCAACCTGCAGGACCCCAACCAGCTCTACAATGAGCTCAATCTAGGGC
 Sbf I
 GAAGAGAGGAATATGACGTCTTGGAGAAGAAGCGGGCTCGGGATCCAGAGATGGGAGGCA
 AACAGCAGAGGAGGAGGAACCCCCAGGAAGGCGTATACAATGCACTGCAGAAAGACAAGA
 TGGCAGAAGCCTACAGTGAGATCGGCACAAAAGGCGAGAGGCCGAGAGGCAAGGGGCACG
 ATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGCACTGCCACCAAGGACACCTATGATGCCCTGCATATGC
 AGACCCTGGCCCCCTCGC

ФИГ.8

Фрагмент ДНК MCS, кодирующий стоп-кодоны и сайты рестриктирующих ферментов (фрагмент ДНК #2)

TGAAAGCTTAAACCAGTTAACTGGAAAACGCGTAAAGTCGAC
 Стоп-кодон Sal I

ФИГ.9

SEQ ID NO:4: Фрагмент ДНК IL15_{LSP}_F2A_CCL19 (фрагмент ДНК #3)

F2A

GAATTCGGCAGCGGCGTGAAGCAGACCCTGAACTTCGACCTGCTGAAGCTGGCCGGAGAC
 Длинный сигнальный пептид мышиноного IL-15

GTGGAGAGCAACCCTGGCCCTATGAAGATCCTGAAGCCCTACATGAGGAAACACCAGCATC
 Мышиный IL-15

TCCTGTTACCTCTGTTTCCTGCTGAACAGCCACTTCCTGACCGAGGCCGGCATCCACGTG
 TTCATCCTGGGCTGCGTGTCCGTGGGCCTGCCTAAGACCGAGGCCAACTGGATCGACGTG
 AGATACGACCTGGAGAAGATCGAGAGCCTGATCCAGAGCATCCACATCGACACCACACTG
 TACACCGACAGCGACTTCCACCCAGCTGCAAGGTGACCGCCATGAACTGCTTTCTGCTG
 GAGCTGCAGGTGATCCTGCACGAGTACAGCAACATGACCCTGAACGAGACCGTGAGAAAC
 GTGCTGTACCTGGCCAACTCCACCCTGAGCAGCAACAAGAACGTGGCCGAGAGCGGCTGC
 AAGGAGTGCCAGGAGCTCGAGGAGAAAACCTTCACCGAGTTCCCTGCAGAGCTTCATCAGG
 F2A

ATCGTCCAGATGTTTCATCAACACCAGCGGCAGCGGCGTGAAGCAGACCCTGAACTTCGAC
 Мышиный CCL19

CTGCTGAAGCTGGCCGGAGACGTGGAGAGCAACCCTGGCCCATGCATGGCCCCCAGGGTG
 ACCCCTCTGCTGGCCTTCAGCCTGCTGGTGTGTGGACCTTCCCTGCCCTACCCTGGGA
 GGAGCCAATGACGCCGAGGACTGCTGCCTGAGCGTGACCCAGAGACCCATCCCCGGCAAC
 ATCGTGAAGGCCTTCAGGTACCTGCTGAACGAGGACGCTGCAGAGTGCCTGCCGTGGTG
 TTCACCACCCTGAGGGGCTACCAGCTGTGTGCTCCCCCTGACCAGCCTTGGGTGGACAGG
 ATCATCAGGAGGCTGAAGAAGAGCAGCGCCAAGAACAAGGGCAACAGCACCAGGAGGAGC
 CCCGTGAGCTGAAAGCTTAAACCAGTTAACTGGAAAACGCGTAAAGTCGAC
 Стоп-кодон Sal I

ФИГ.10

SEQ ID NO: 6: фрагмент ДНК $sIL15_{RA_F2A_CCL19}$ (фрагмент ДНК #4)

F2A
 GAATTTCGGCAGCGGGCGTGAAGCAGACCCTGAACTTTCGACCTGCTGAAGCTGGCCGGAGAC
 GTGGAGAGCAACCCTGGCCCTATGATTCATTCAGCTGGCCAGCTGTGTGACCCTGACA
 Сигнальный пептид мышиноного IL-2
 Мышиный IL-15
 CTGGTGCTGCTGCTGAACAGCCGCATCCACGTGTTTCATTCCTGGGATGCGTCTCCGTGGCC
 CTCCCCAAGACCGAGGCTAACTGGATCGACGTCAGGTACGACCTGGAGAAGATCGAAAGC
 CTGATCCAGTCCATCCACATCGATACAACCCTGTACACAGATTCCGACTTCCACCCCTCC
 TGTAAGGTCACCGCCATGAACTGCTTCCTCCTGGAACTCCAGGTCATCCTGCACGAGTAC
 TCCAACATGACCCTGAACGAAACCCTGAGGAATGTGCTGTACCTCGCCAACCTCCACACTG
 AGCTCCAATAAGAACGTGGCTGAGAGCGGCTGCAAGGAGTGTGAGGAGCTGGAAGAGAAG
 ACCTTCACCGAGTTCCTGCAGAGCTTCATCAGGATCGTGCAGATGTTTCATCAACACAAGC
 Линкер из 26 а.к.
 TCCGGCGGAGGATCCGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGCGGCGGCTCCGGAGGCGGAGGAAGC
 Внеклеточный домен мышиноного IL-15RA
 GGAGGAGGAAGCCTGCAAGGAACCACCTGTCCCCCTCCCGTGTCCATCGAGCACGCCGAC
 ATCAGGGTGAAGAАCTACTCCGTCAACAGCAGGGAAAGGTACGTGTGCAACTCCGGCTTT
 AAGAGGAAGGCCGGCACCAGCACCCCTCATCGAGTGCCTGATCAACAAGAACACAACCTG
 GCCCACTGGACCACCCCCAGCCTGAAGTGTATTAGAGACCCCAGCCTGGCTCATTACAGC
 CCCGTGCCACAGTGGTGACACCCCAAGGTGACAAGCCAGCCTGAGAGCCCTAGCCCTAGC
 GCCAAAGAGCCCGAGGCCTTTTCCCCCAAGTCCGACACCCGCATGACCACCGAGACAGCC
 ATCATGCCTGGCAGCAGACTGACCCCTAGCCAGACCACATCCGCTGGCACACAGGCACC
 GGCTCCACAAGAGCTCCAGAGCCCCTAGCCTGGCTGCCACAATGACACTGGAACCTACC
 GCCTCCACCAGCCTCAGAATCACAGAGATCTCCCCCAAGCAGCAAGATGACCAAGGGC
 F2A
 AGCGGCGTGAAGCAGACCCTGAACTTCGACCTGCTGAAGCTGGCCGGAGACGTGGAGAGC
 Мышиный CCL19
 AACCTGGCCCATGCATGGCCCCCAGGGTGACCCCTCTGCTGGCCTTCAGCCTGCTGGTG
 CTGTGGACCTTCCTGCCCCTACCCTGGGAGGAGCCAATGACGCCGAGGACTGCTGCCTG
 AGCGTGACCCAGAGACCCATCCCCGGCAACATCGTGAAGGCCTTCAGGTACCTGCTGAAC
 GAGGACGGCTGCAGAGTGCCTGCCGTGGTGTTCACCACCCCTGAGGGGCTACCAGCTGTGT
 GCTCCCCCTGACCAGCCTTGGGTGGACAGGATCATCAGGAGGCTGAAGAAGAGCAGCGCC
 AAGAACAAGGGCAACAGCACCCAGGAGGAGCCCCGTGAGCTGAAAGCTTAAACCAGTTAAC
 TGGAACAACGCGTAAAGTCGAC

Стоп-кодон

ФИГ.11

SEQ ID NO: 8: фрагмент ДНК _{mb}IL15_{RA}_F2A_CCL19 (фрагмент ДНК #5)

F2A
 GAATTCGGCAGCGGCGTGAAGCAGACCCTGAACCTCGACCTGCTGAAGCTGGCCGGAGAC
 Сигнальный лептид мышиноного IL-2
 GTGGAGAGCAACCCTGGCCCTATGTAATCCATGCAGCTGGCCAGCTGTGTGACCCTGACA
 Мышиный IL-15
 CTGGTGCTGCTGGTGAACAGCGGCATCCACGTGTTTCATTCCTGGGATGCGTCTCCGTGGGC
 CTCCCCAAGACCGAGGCTAACTGGATCGACGTCAGGTACGACCTGGAGAAGATCGAAAGC
 CTGATCCAGTCCATCCACATCGATAACAACCCTGTACACAGATTCCGACTTCCACCCCTCC
 TGTAAGGTCACCGCCATGAACTGCTTCCTCCTGGAACCTCCAGGTCATCCTGCACGAGTAC
 TCCAACATGACCCTGAACGAAACCGTGAGGAATGTGCTGTACCTCGCCAACTCCACACTG
 AGCTCCAATAAGAACGTGGCTGAGAGCGGCTGCAAGGAGTGTGAGGAGCTGGAAGAGAAG
 ACCTTCACCGAGTTCCTGCAGAGCTTCATCAGGATCGTGCAGATGTTTCATCAACACAAGC
 Линкер из 26 а.к.
 TCCGGCGGAGGATCCGGAGGAGGGAAGCGGAGGCGGCGGCTCCGGAGGCGGAGGAAGC
 Мышиный IL-15RA
 GGAGGAGGAAGCCTGCAAGGAACCACCTGTCCCCCTCCCGTGTCCATCGAGCACGCCGAC
 ATCAGGGTGAAGAАСТACTCCGTCAACAGCAGGGAAAGGTACGTGTGCAACTCCGGCTTT
 AAGAGGAAGGCCGGCACCAGCACCCCTCATCGAGTGCGTGATCAACAAGAACACAACCGTG
 GCCCACTGGACCACCCCCAGCCTGAAGTGTAATTAGAGACCCAGCCTGGCTCATTACAGC
 CCCGTGCCACASTGGTGACACCCCAAGGTGACAAGCCAGCCTGAGAGCCCTAGCCCTAGC
 GCCAAAGAGCCCGAGGCCTTTTCCCCCAAGTCCGACACCGCCATGACCACCGAGACAGCC
 ATCATGCCTGGCAGCAGACTGACCCCTAGCCAGACCACATCCGCTGGCACCAACAGGCACC
 GGCTCCACACAAGAGCTCCAGAGCCCTAGCCTGGCTGCCACAATGACACTGGAACCTACC
 GCCTCCACCAGCCTCAGAATCACAAGAGATCTCCCCCACAGCAGCAAGATGACCAAGGTG
 GCCATCTCCACCTCCGTGCTGCTGGTGGGAGCCGGCGTGGTCATGGCCTTTCTGGCCTGG
 TACATCAAGTCCAGGCAGCCTAGCCAACCTTGCAGGGTGGAGGTGGAAACTATGGAAACC
 GTGCCCATGACCGTGAGGGCCAGCTCCAAGGAGGATGAAGACACCGGCGCCGGCAGCGGC
 F2A
 GTGAAGCAGACCCTGAACCTTCGACCTGCTGAAGCTGGCCGGAGACGTGGAGAGCAACCCT
 Мышиный CCL19
 GGCCCATGCATGGCCCCCAGGGTGACCCCTCTGCTGGCCTTCAGCCTGCTGGTGCTGTGG
 ACCTTCCCTGCCCTTACCCTGGGAGGAGCCAATGACGCCGAGGACTGCTGCCTGAGCGTG
 ACCCAGAGACCCATCCCCGGCAACATCGTGAAGGCCTTCAGGTACCTGCTGAACGAGGAC
 GGCTGCAGAGTGCCCTGCCGTGGTGTTCACCACCCTGAGGGGCTACCAGCTGTGTGCTCCC
 CCTGACCAGCCTTGGGTGGACAGGATCATCAGGAGGCTGAAGAAGAGCAGCGCCAAGAAC
 AAGGGCAACAGCACCCAGGAGGAGCCCCGTGAGCTGAAAGCTTAAACCAGTTAACTGGAAA
 АСГCGTAAAGTCGAC
 Стоп-кодон

ФИГ.13

SEQ ID NO: 12: фрагмент ДНК IL-18_F2A_CCL19 (фрагмент ДНК #7)

F2A
 GAATTCGGCAGCGGCCTGAAGCAGACCCTGAACTTCGACCTGCTGAAGCTGGCCGGAGAC
 GTGGAGAGCAACCCTGGCCCTATGGAGAGGACCCTGGTGTGCCTGGTGGTGATTTTCCTG
 GGCACCGTCGCCATAAGAGCAGCCCCACGGACCCGACAGACTGCTGATCAGGCTGAGG
 CACCTGATCGACATCGTGGAGCAGCTGAAGATCTACGAGAACGACCTGGACCCCGAGCTG
 CTGAGCGCTCCTCAGGACGTGAAGGGACACTGCGAGCACGCCGCCTTCGCCTGTTTCCAG
 AAGGCCAAGCTGAAGCCTTCCAACCCCGGCAACAACAAGACCTTCATCATCGACCTGGTG
 GCCCAGCTGAGGAGAAGGCTGCCTGCCAGGAGGGGGCGGAAAGAAGCAGAAGCACATCGCC
 AAGTGCCCCAGCTGCGACTCCTACGAGAAGAGGACCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGCTG
 AAGTGGCTGCTGCAGAAGGTGTGCACACTGAACGCCTTCCCTGAGCCTGCCTTGTTGCGTG
 AGGGTGCCTCCCGTGCCTTCCGACAGCGGCAGCGGCCTGAAGCAGACCCTGAACTTCGAC
 CTGCTGAAGCTGGCCGGAGACGTGGAGAGCAACCCTGGCCCATGCATGGCCCCCAGGGTG
 ACCCCTCTGCTGGCCTTCAGCCTGCTGGTGCTGTGGACCTTCCCTGCCCTACCCTGGGA
 GGAGCCAATGACGCCGAGGACTGCTGCCTGAGCGTGACCCAGAGACCCATCCCCGGCAAC
 ATCGTGAAGGCCTTCAGGTACCTGCTGAACGAGGACGGCTGCAGAGTGCTGCCGTGGTG
 TTCACCACCCTGAGGGGCTACCAGCTGTGTGCTCCCCCTGACCAGCCTTGGGTGGACAGG
 ATCATCAGGAGGCTGAAGAAGAGCAGCGCCAAGAACAAGGGCAACAGCACCCAGGAGGAGC
 CCCGTGAGCTGAAAGCTTAAACCAGTТААСТGGAAAACGCGTAAAGTCGAC
 Стоп-кодон Sal I

ФИГ.14

SEQ ID NO: 14: фрагмент ДНК IL-21_F2A_CCL19 (фрагмент ДНК #8)

F2A
 GAATTCGGCAGCGGCGTGAAGCAGACCCTGAACTTCGACCTGCTGAAGCTGGCCGGAGAC
 GTGGAGAGCAACCCTGGCCCTATGGAGAGGACCCTGGTGTGCCTGGTGGTGATTTTCCTG
 Мышиный IL-21
 GGCACCGTCGCCATAAGAGCAGCCCCAGGGACCCGACAGACTGCTGATCAGGCTGAGG
 CACCTGATCGACATCGTGGAGCAGCTGAAGATCTACGAGAACGACCTGGACCCCGAGCTG
 CTGAGCGCTCCTCAGGACGTGAAGGGACACTGCGAGCACGCCGCCTTCGCCTGTTTCCAG
 AAGGCCAAGCTGAAGCCTTCCAACCCCGGCAACAACAAGACCTTCATCATCGACCTGGTG
 GCCCAGCTGAGGAGAAGGCTGCCTGCCAGGAGGGGCGGAAGAAGCAGAAGCACATCGCC
 AAGTGCCCCAGCTGCGACTCCTACGAGAAGAGGACCCCAAGGAGTTTCCTGGAGAGGCTG
 AAGTGGCTGCTGCAGAAGGTGTGCACACTGAACGCCTTCCTGAGCCTGCCTTGTTGCGTG
 F2A
 AGGGTGCCTCCCGTGCCTTCCGACAGCGGCAGCGGCGTGAAGCAGACCCTGAACTTCGAC
 Мышиный CCL19
 CTGCTGAAGCTGGCCGGAGACGTGGAGAGCAACCCTGGCCCATGCATGGCCCCCAGGGTG
 ACCCCTCTGCTGGCCTTCAGCCTGCTGGTGTGTGGACCTTCCTGCCCCTACCCTGGGA
 GGAGCCAATGACGCCGAGGACTGCTGCCTGAGCGTGACCCAGAGACCCATCCCCGGCAAC
 ATCGTGAAGGCCTTCAGGTACCTGCTGAACGAGGACGGCTGCAGAGTGCCTGCCGTGGTG
 TTCACCACCCTGAGGGGCTACCAGCTGTGTGCTCCCCCTGACCAGCCTTGGGTGGACAGG
 ATCATCAGGAGGCTGAAGAAGAGCAGCGCCAAGAACAAGGGCAACAGCACCAGGAGGAGC
 CCCGTGAGCTGAAAGCTTAAACCAGTTAACTGGAAAACGCGTAAAGTCGAC
 Стоп-кодон Sal I

ФИГ.15

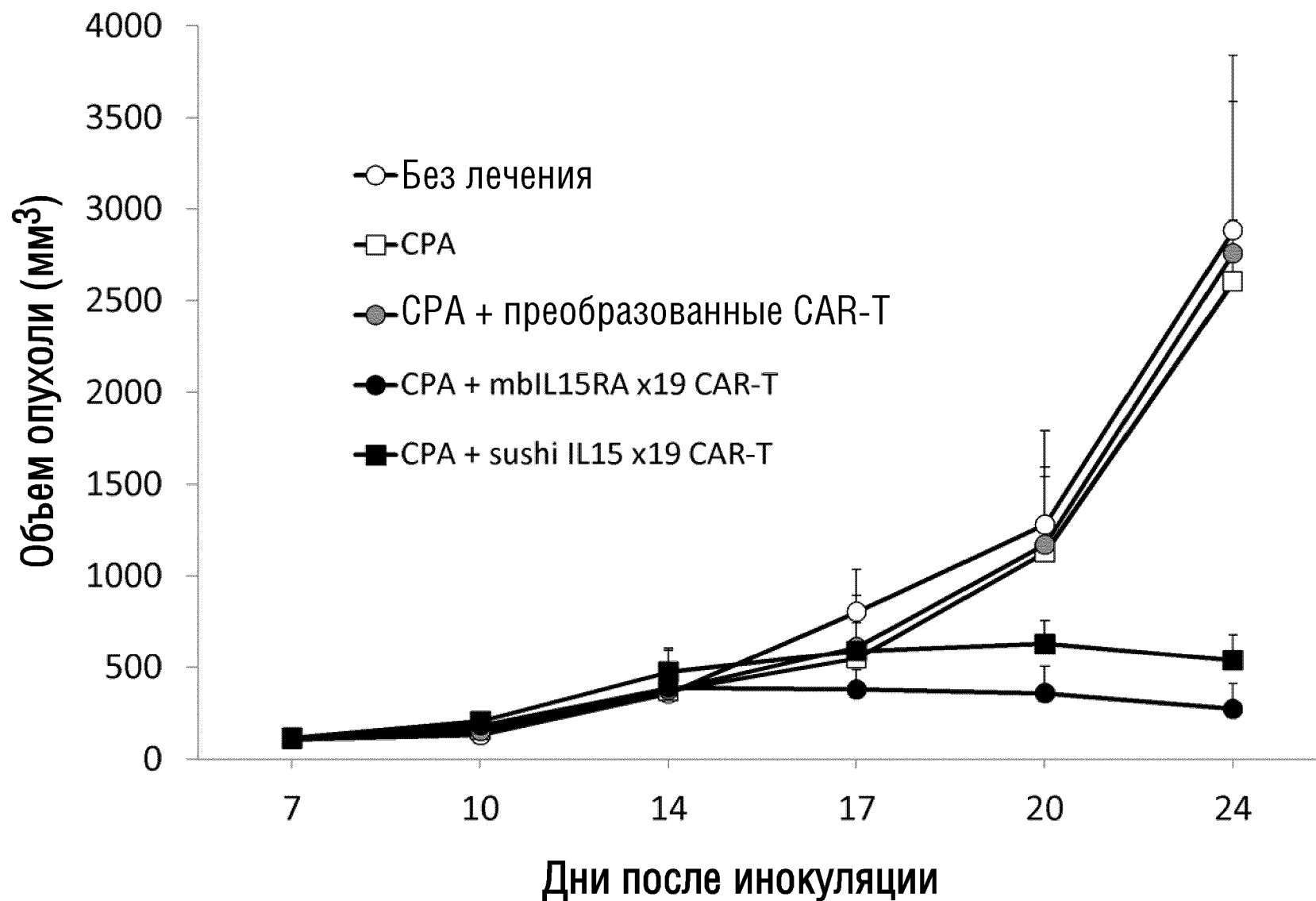
SEQ ID NO: 16: фрагмент ДНК scIL27_F2A_CCL19 (фрагмент ДНК #9)

^{F2A}
 GAATTCGSCAGCGGCGTGAAGCAGACCCCTGAACTTCGACCTGCTGAAGCTGGCCGGAGAC
 GTGGAGAGCAACCCTGGCCCTATGAGCAAGCTCCCTCTTTCTGTCCCTGGCCCTGTGGGCG
 Мышиный EB13
 AGCAGATCCCTGGCTACACAGAAACAGCCCTGGTGGCCCTGTCCCAACCCAGAGTGCAG
 TGTCAAGCTTCCAGGTACCCCGTGGCTGTGGACTGCAGCTGGACCCCTCTGCAAGCCCT
 AATAGCACCAGGAGCACCTCCCTTCATCGCCACCTACAGACTGGGAGTGGCCACCCAGCAG
 CAGAGCCAGCCTTGCCCTGCAGAGGTCCCTCAGGCCCTCCAGATGCACAATCCCTGATGTG
 CACCTGTTTAGCACCGTGCCCTACATGCTGAACGTGACAGCCGTGCACCCTGGAGGAGCC
 AGCAGCTCCCTCCCTGGCCCTTCGTGCGCGAGAGAATCATCAAGCCTGACCCCCCTGAGGGC
 GTGAGACTGAGAACAGCTGGCCAGAGACTGCAGGIGCTGTGGCACCCCTCCCGCCCTCTGG
 CCTTTCCCGGATATCTTCTCCCTGAAGTACAGACTGAGGTACAGGAGAAGAGGGCGTAGC
 CACTTCAGACAGGTGGGCCCCATTGAGGCTACCACTTTACCCTCAGGAATAGCAAGCC
 CATGCTAAGTACTGTATCCAGGTGTCCGCCCAGGATCTGACAGACTACGGCAGGCCCTCC
 GACTGGAGCCTGCCTGGACAAGTGGAAAGCGCTCCCCACAAGCCTGGAAGCACATCCGGA
 Линкер из 18 а.к.
 AGCGGCAAACCCGGCAGCGGAGAGGGATCCACCAAAGGCT^{p28}TCCCTACCGACCCCTGTCT
 TTACAAGAAGTGAAGAAGGGAGTTCACCGTGTGAGCCTGTATCTGGCCAGGAAGCTCCTCAGC
 GAGGTGCAGGGCTATGTGCACAGCTTCGCCGAAAGCAGGCTGCCCGGCGTGAACCTGGAT
 CTGCTGCCCTGGGCTACCACCTGCCTAACGTGTCCCTGACCTTCCAGGCTTGGCATCAC
 CTGTCCGACTCCGAGAGGCTCTGCTTTCTGGCCACCACCCTGAGGCCCTTCCCTGCCATG
 CTGGGAGGACTGGGCACCCAGGGAACCTGGACCAGCAGCGAGAGGGAACAGCTGTGGGCC
 ATGAGACTGGACCTGAGGGATCTGCACAGACACCTGAGGTCCAGGTGCTGGCCGCCGGC
 TTCAAGTGTAGCAAAGAGGAGGAGGACAAAGAAGAAGAAGAAGAGGAAGAAGAGGAAGAG
 AAGAAACTCCCCCTGGGAGCCCTGGGAGGCCCTAATCAGGTGTCTCCAGGTGTCTGG
 CCTCAGCTGCTGTATACTACCAGCTGCTGCACAGCCTGGAGCTGGTGTGTCCAGGGCT
 GTGAGGGACCTGCTCCCTGCTGAGCCTGCCTAGAAGCCTGGCAGCGCTTGGGACTCCGGC^{F2A}
 AGCGGCGTGAAGCAGACCCCTGAACTTCGACCTGCTGAAGCTGGCCGGAGACGTGGAGAGC
 Мышиный CCL19
 AACCCCTGGCCCATGCATGGCCCCCAGGGTGAACCCCTCTGCTGGCCCTCAGCCTGCTGGT
 CTGTGGACCTTCCCTGCCCTACCCTGGGAGGAGCCAATGACGCCGAGGACTGCTGCCTG
 AGCGTGACCCAGAGACCCATCCCGGCAACATCGTGAAGGCCCTCAGGTACCTGCTGAAC
 GAGGACGGCTGCAGAGTGCCTGCCGTGGTGTTCACCACCCTGAGGGGCTACCAGCTGTGT
 GCTCCCCCTGACCAGCCTTGGGTGGACAGGATCATCAGGAGGCTGAAGAAGAGCAGCGCC
 AAGAACAAGGGCAACAGCACCAGGAGGAGCCCCGTGAGCTGAAAGCTTAAACCAGTTAAC
 TGGA AACGCGTAAAGTCGAC

Стоп-кодон

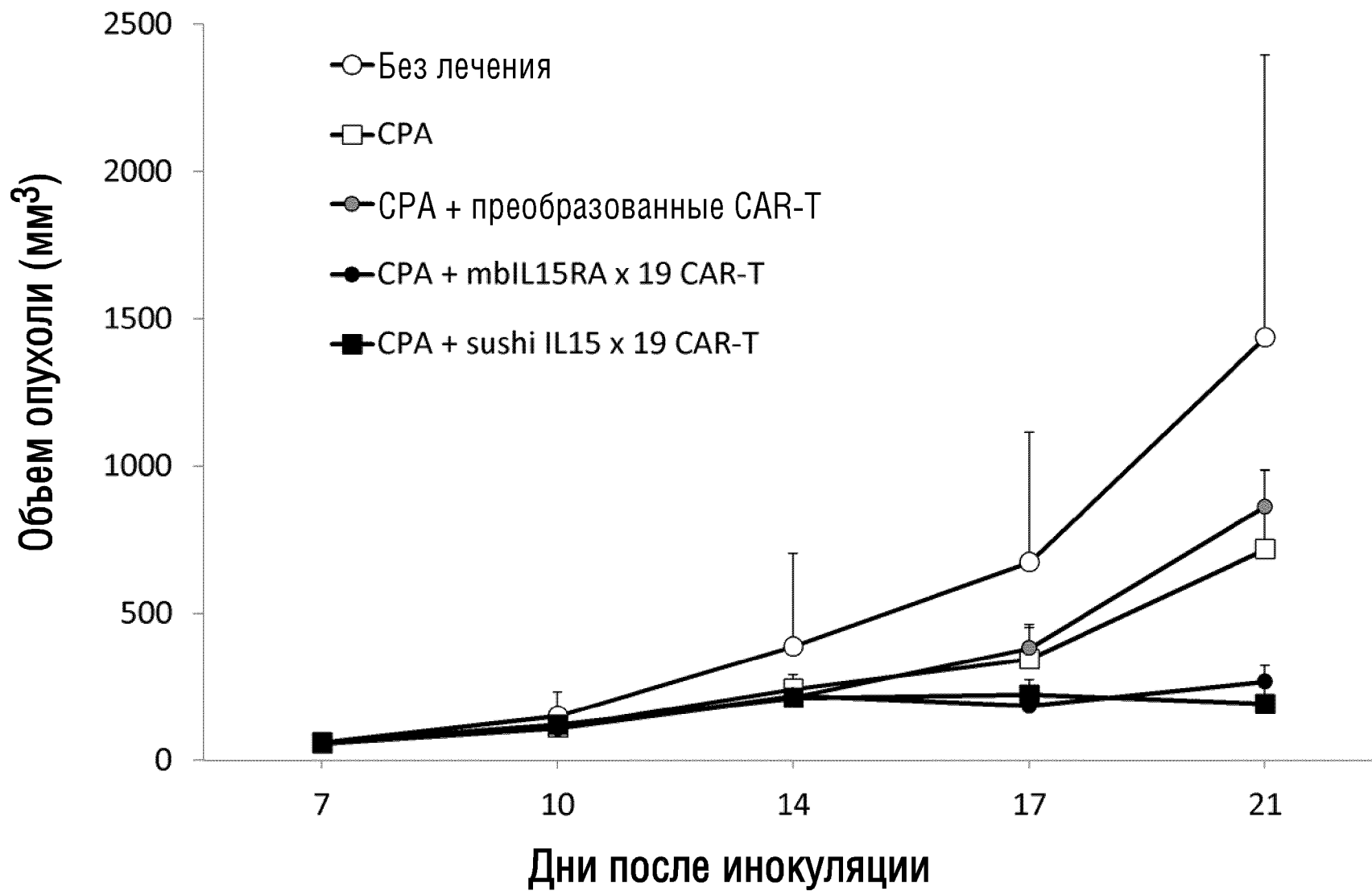
ФИГ.16

B16F10-hCD20



ФИГ.17

MC38-hCD20



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/034055

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12N15/63 (2006.01) i, A61K35/17 (2015.01) i, A61P35/00 (2006.01) i,
A61P35/02 (2006.01) i, C12N5/10 (2006.01) i, C12N15/867 (2006.01) i,
C12N5/0783 (2010.01) n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C12N15/63, A61K35/17, A61P35/00, A61P35/02, C12N5/10,
C12N15/867, C12N5/0783

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
WPIDS/WPIX (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	CN 109055430 A (HANGZHOU RONGZE BIOLOGICAL TEC CO., LTD.) 21 December 2018, entire text (Family: none)	1, 6-9, 14-18

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“I” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 November 2019 (12.11.2019)

Date of mailing of the international search report
19 November 2019 (19.11.2019)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/034055

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2016/056228 A1 (YAMAGUCHI UNIVERSITY) 14 April 2016, claims, paragraphs [0009], [0046], [0059], [0060], [0081], [0086] & US 2017/0291953 A1, claims, paragraphs [0014], [0084], [0097], [0098], [0119], [0124] & EP 3205720 A1	1, 6-8, 17, 18 1-18
Y	WO 2017/222593 A1 (ICELL GENE THERAPEUTICS LLC) 28 December 2017, claims, pp. 52-64, examples, fig. 14, 78 & JP 2019-522973 A & US 2018/0162939 A1 & EP 3474867 A1	1-18
Y	WO 2018/027155 A1 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER) 08 February 2018, claims, pp. 12, 13, examples & US 2019/0151363 A1 & EP 3493827 A1	1, 6-9, 14-18
Y	WO 2018/073393 A2 (CELLECTIS) 26 April 2018, pp. 82, 83 & JP 2019-531742 A & EP 3529265 A2	1, 6-9, 14-18
Y	WO 2018/014038 A1 (POSEIDA THERAPEUTICS, INC.) 18 January 2018, paragraph [0229] & JP 2019-524721 A & US 2019/0177421 A1 & EP 3484914 A1	1, 6-9, 14-18