

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392914** (13) **A2**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2024.01.31**

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

(22) Дата подачи заявки  
**2019.11.18**

---

(54) **СУИЦИДНЫЙ ГЕН**

---

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

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

(33) **US**

(62) **202191414; 2019.11.18**

(71) Заявитель:

**БОРД ОФ РИДЖЕНТС, ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕХАС  
СИСТЕМ (US)**

(72) Изобретатель:

**Резвани Кэйти, Шполл Элизабет (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

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

**A2**

**202392914**

**202392914**

**A2**

## СУИЦИДНЫЙ ГЕН

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент США No. 62/769405, поданной 19 ноября 2018 г.; временной заявки на патент США No. 62/773372, поданной 30 ноября 2018 г.; и временной заявки на патент США No. 62/791464, поданной 11 января 2019 г., причем все эти заявки полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

### СПИСКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0001.1] Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был подан электронным способом в формате ASCII и полностью включен в настоящее описание путем ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 13 ноября 2019 г., имеет название UTF8\_P1151WO\_SL.txt и размер 108 байт.

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Варианты осуществления изобретения относятся по меньшей мере к области клеточной биологии, молекулярной биологии, иммунологии, клеточной терапии и медицины.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Адаптивная клеточная терапия с использованием Т-клеток, трансдуцированных сконструированными химерными антигенными (CAR) и Т-клеточными (TCR) рецепторами, сопровождается публикациями о тяжелых побочных эффектах, таких как синдром высвобождения цитокинов и нейротоксичность, а также внеопухолевая токсичность. Поскольку число пациентов, которые получают лечение адаптивной клеточной терапией, растет со временем, то внедрение механизма безопасности для обеспечения селективной делеции адаптивно инфузировавшихся клеток является полезным в отношении токсичности.

[0004] Настоящее раскрытие относится к решению давней потребности в механизмах безопасности для клеточной терапии.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к системам, способам и композициям, связанным с клеточной терапией, включая механизмы безопасности для управления клеточной терапией. В конкретных вариантах осуществления уникальный суицидный ген используют в сочетании с клеточной терапией любого типа для контроля ее применения и предоставления возможности контролируемого прекращения клеточной терапии при достижении желаемого результата и/или по истечении желательного времени. Суицидный ген применяют в трансдуцированных клетках для того, чтобы вызвать гибель трансдуцированных клеток при необходимости. В конкретных вариантах осуществления суицидный/истощающий ген представляет собой мутант фактора некроза опухоли (TNF)-альфа, который не расщепляется стандартными ферментами, которые расщепляют TNF в природе, такими как TNF-альфа-конвертирующий фермент (также называемый TACE). По существу, в

конкретных вариантах осуществления мутант TNF-альфа является мембраносвязанным, неактивным и несекретируемым. Мутант TNF-альфа по настоящему изобретению является мишенью одного или более агентов, которые связываются с мутантом, включая, по меньшей мере, антитело, так что после связывания агента (агентов) с мутантом TNF-альфа на поверхности клетки, клетка умирает. Варианты осуществления изобретения позволяют использовать мутант TNF-альфа в качестве маркера для клеток, которые экспрессируют его.

[0006] Варианты осуществления настоящего изобретения включают композиции, содержащие трансдуцированную клетку, содержащую нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или более сконструированных несекретируемых мутантных полипептидов фактора некроза опухоли (TNF)-альфа, и нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или более продуктов терапевтических генов. В конкретных вариантах осуществления мутантный полипептид TNF-альфа содержит делецию относительно SEQ ID NO: 8 следующих аминокислот: аминокислотного остатка 1 и аминокислотного остатка 12; аминокислотного остатка 1 и аминокислотного остатка 13; аминокислотных остатков 1-12; аминокислотных остатков 1-13; или аминокислотных остатков 1-14. Продукт терапевтического гена композиции может представлять собой или нет сконструированный рецептор, такой как Т-клеточный рецептор, химерный антигенный рецептор (CAR), цитокиновый рецептор, хоминговый рецептор или хемокиновый рецептор. Любой из сконструированных рецепторов может иметь своей мишенью или нет антиген, такой как раковый антиген. Когда сконструированным рецептором является CAR, CAR может содержать или не содержать один или более костимуляторных доменов, таких как CD28, DAP12 или оба эти домена.

[0007] В конкретных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, которая кодирует мутантный полипептид TNF-альфа, и нуклеиновая кислота, которая кодирует продукт терапевтического гена, являются одной и той же молекулой нуклеиновой кислоты, хотя нуклеиновая кислота, которая кодирует мутантный полипептид TNF-альфа, и нуклеиновая кислота, которая кодирует продукт терапевтического гена, могут являться различными молекулами нуклеиновых кислот. В любом случае молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой вектор, включая вирусный вектор (ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор или аденоассоциированный вирусный вектор) или невирусный вектор, такой как плаزمид, липид, транспозон или их комбинация.

[0008] Трансдуцированные клетки композиции по настоящему изобретению могут представлять собой, например, иммунную клетку или стволовую клетку. Примеры иммунных клеток включают Т-клетку, НК-клетку, НКТ-клетку, iNKT-клетку, В-клетку, регуляторную Т-клетку, моноцит, макрофаг, дендритную клетку или мезенхимальную стромальную клетку. Клетка может экспрессировать или нет один или более экзогенно предложенных цитокинов, таких как IL-15, IL-12, IL-18, IL-21 или их комбинация. Цитокин может кодироваться или нет тем же самым вектором, что и ген мутантного TNF-

альфа. В отдельных случаях цитокин экспрессируется в виде отдельной полипептидной молекулы в качестве мутанта TNF-альфа и в качестве сконструированного клеточного рецептора.

[0009] В конкретных вариантах осуществления изобретения, мутантный полипептид TNF-альфа содержит SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 39. Мутантный полипептид TNF-альфа может кодироваться последовательностью, которая содержит SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 38. В некоторых аспектах у мутантного полипептида TNF-альфа отсутствует одна или более дополнительных мутаций, которые предотвращают связывание мутантного полипептида TNF-альфа с рецептором TNF.

[0010] Варианты осуществления настоящего изобретения включают способы индукции гибели трансдуцированной клетки, экспрессирующей по меньшей мере сконструированный несекретируемый мутантный полипептид TNF-альфа и, необязательно, экспрессирующей терапевтический ген, такой как сконструированный рецептор, причем способы включают стадию получения эффективного количества по меньшей мере одного агента, который связывает мутант TNF-альфа в трансдуцированной клетке. Агентом, который связывает TNF-альфа, может являться, например, антитело, низкомолекулярное соединение, полипептид, нуклеиновая кислота или их комбинация. Когда агентом является антитело, оно может быть любого типа, включая по меньшей мере моноклональное антитело. В этих способах клетка может дополнительно экспрессировать сконструированный рецептор, включая T-клеточный рецептор, химерный антигенный рецептор (CAR), цитокиновый рецептор, хоминговый рецептор или хемокиновый рецептор. Любой из сконструированных рецепторов может связывать раковый или другой антиген. В конкретных случаях способ осуществляется *in vivo* у индивидуума, имеющего заболевание, и когда индивидуум получает курс терапии от заболевания, который включает в себя множество трансдуцированных клеток. Хотя заболевание может быть любого типа, в конкретных случаях заболевание представляет собой рак. Агент может вводиться индивидууму при начале одного или более побочных эффектов терапии, или когда ожидается побочный эффект. У индивидуума может наблюдаться один или более симптомов синдрома высвобождения цитокинов, нейротоксичности, анафилаксии/аллергии и/или внеопухолевой токсичности. В некоторых случаях индивидуум получал, получает и/или будет получать дополнительную терапию своего заболевания. В конкретных аспектах настоящего изобретения мутантный полипептид TNF-альфа не содержит или содержит одну или несколько дополнительных мутаций, предотвращающих связывание мутантного полипептида TNF-альфа с TNF-рецептором или предотвращающих обратную сигнализацию.

[0011] Варианты осуществления настоящего изобретения включают способы снижения эффектов синдрома высвобождения цитокинов у индивидуума, который получил и/или который получает клеточную терапию клетками, которые экспрессируют несекретируемый мутант TNF-альфа, включающие в себя стадию введения эффективного

количества одного или более агентов, которые связываются с мутантом, чтобы вызвать у индивидуума: (a) удаление по меньшей мере некоторых из клеток клеточной терапии; и (b) снижение уровня растворимого TNF-альфа.

[0012] Варианты осуществления настоящего изобретения включают способы снижения риска токсичности клеточной терапии для индивидуума, включающие в себя стадию модификации клеток клеточной терапии для экспрессии несекретируемого мутанта TNF-альфа. Клеточная терапия может быть направлена, например, на рак. Клеточная терапия может содержать сконструированный рецептор, мишенью которого является антиген.

[0013] Конкретные варианты включают векторы, содержащие последовательность, которая кодирует несекретируемый мутант TNF-альфа и которая кодирует сконструированный рецептор. Несекретируемый мутант TNF-альфа и сконструированный рецептор могут быть закодированы или нет в векторе в виде отдельных полипептидов. В отдельных случаях последовательность вектора, который кодирует несекретируемый мутант TNF-альфа, и последовательность вектора, который кодирует сконструированный рецептор, отделяют на векторе с помощью элемента 2A или элемента IRES. Этот вектор может дополнительно кодировать цитокин, такой как IL-15, IL-12, IL-18, IL-2, IL-7 или IL-21. Цитокин может экспрессироваться с вектора в виде отдельного полипептида в качестве мутанта TNF-альфа и сконструированного рецептора.

[0014] Варианты осуществления настоящего изобретения включают химические вещества, включающие последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16.

[0015] Специально предусмотрено, что любое ограничение, описанное в отношении одного варианта осуществления изобретения, может применяться к любому другому варианту осуществления изобретения. Кроме того, любая композиция изобретения может быть использована в любом способе изобретения, и любой способ изобретения может использоваться для получения или для использования любой композиции изобретения. Аспекты варианта осуществления, изложенные в Примерах, также являются вариантами осуществления, которые могут быть реализованы в контексте вариантов осуществления, описанных в другом месте в другом Примере или в другом месте заявки, например, в кратком описании, подробном описании, формуле изобретения и кратком описании чертежей.

[0016] Вышеизложенное довольно широко очерчивает признаки и технические преимущества настоящего изобретения для лучшего понимания подробного описания, следующего ниже. Далее будут описаны дополнительные признаки и преимущества, которые образуют предмет формулы изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что раскрытые концепция и конкретные варианты осуществления могут быть легко использованы в качестве основы для модификации или проектирования других структур для выполнения тех же целей, что и настоящие конструкции. Специалистам в данной области также должно быть понятно, что такие

эквивалентные конструкции не выходят за рамки сущности и объема, изложенных в прилагаемой формуле изобретения. Новые признаки, которые, как полагают, являются характерными для конструкций, раскрытых в настоящем изобретении, как в отношении организации, так и способа выполнения, вместе с другими целями и преимуществами, будут лучше понятны из последующего описания, рассматриваемого совместно с прилагаемыми чертежами. Однако следует четко понимать, что каждый из чертежей приведен только для целей иллюстрации и описания и не предназначен для определения пределов настоящего изобретения.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0017] Для более полного понимания настоящего изобретения далее дается ссылка на последующее описание вместе с прилагаемыми чертежами.

[0018] Фиг.1 представляет собой один пример экспериментального плана мутагенеза TNF-альфа для того, чтобы удалить мембранные сайты расщепления. Перес с сотр. (Perez *et al.* (1990)) опубликовали, что делеция валина в положении 1 и пролина в положении 12 внеклеточного участка TNF-альфа приводит к биологически активному, но нерасщепляемому TNF-альфа. Подчеркнутые нуклеотиды в левой панели показывают удаленные нуклеотиды во время мутагенеза, соответствующие положениям 229-279 нуклеотидной последовательности. Праймер дикого типа TCGAGAAGATGATCTGACTGCCTGGGCCAGAGG представляет собой SEQ ID NO:42, мутантный праймер, Del VAL1, TCG AGA AGA TGA TCT TGC CTG GGC CAG AGG-3 представляет собой SEQ ID NO: 43, и олигонуклеотид CP496 TGA TCT TGC CTG представляет собой SEQ ID NO: 44. Праймер дикого типа TAC AAC ATG GGC TACAGGCTTGTCACTCGGGGT представляет собой SEQ ID NO: 45, мутантный праймер Del PRO 12 TAC AAC ATG GGC TAC CTT GTC ACT CGG GGT представляет собой SEQ ID NO: 46, и олигонуклеотид CP498 GGC TAC CTT GTC представляет собой SEQ ID NO:47. Последовательность из Perez *et al.* (1990) CAGGCAGTCAGATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAGCCTGTAGCC представляет собой SEQ ID NO: 48, и последовательность QAVRSSSRTPSDKPVA представляет собой SEQ ID NO: 49.

[0019] Фиг.2А иллюстрирует один пример вектора, который отдельно кодирует мутант TNF-альфа (delVal1 и delPro12) и пример CD19-специфичного химерного антигена (CAR) (левая панель). Правая панель иллюстрирует пример конфигурации вектора, в которой мутантный TNF-альфа кодируется как отдельный полипептид как от молекулы CAR, так и от цитокина. Фиг.2В иллюстрирует один пример вектора, который отдельно кодирует мутант TNF-альфа (delVal13), пример CAR и цитокина. Фиг.2С иллюстрирует один пример вектора, который отдельно кодирует мутант TNF-альфа (delVal1 и delVal13) и пример CAR. Фиг.2D иллюстрирует один пример вектора, который отдельно кодирует мутант TNF-альфа (где удалены 13 ак от Val1 до Val13) и пример CAR. Фиг.2Е иллюстрирует один пример вектора, который отдельно кодирует мутант TNF-альфа (delAla-1-delVal13, где удалены 14 ак, от Ala-1 до Val13) и пример CAR.

[0020] На фиг.3 показано, что НК-клетки, трансдуцированные вектором, имеющим конструкцию, отдельно кодирующую как мутант TNF-альфа, так и CAR, экспрессируют как CAR, так и TNF-альфа на своей поверхности.

[0021] Фиг.4А иллюстрирует примеры ингибиторов TNF-альфа.

[0022] На фиг.4В показано, что НК-клетки, трансдуцированные вектором, имеющим конструкцию, отдельно кодирующую как мутант TNF-альфа, так и CAR, являются мишенью антагонистов TNF-альфа и элиминируются за счет комплементзависимой цитотоксичности (CDC). Более 70% НК-клеток, экспрессирующих мутантный TNF-альфа, элиминируются путем CDC в течение 90 минут после добавления инфликсимаба.

[0023] На фиг.5А показано, что НК-клетки, трансдуцированные вектором, имеющим конструкцию, отдельно кодирующую как мутант TNF-альфа, так и CAR, продуцируют больше эффекторных цитокинов и дегранулируются более эффективно, чем клетки CAR19-НК в ответ на мишени Raji. На фиг.5В показано, что НК-клетки, трансдуцированные вектором, имеющим конструкцию, отдельно кодирующую как мутант TNF-альфа, так и конструкцию CAR, эффективно убивают клетки-мишени, Raji.

[0024] На фиг.6 показано, что НК-клетки, трансдуцированные вектором, который отдельно экспрессирует CD19-специфичный CAR и мутант TNF-альфа, не проявляют неспецифичной активности.

[0025] На фиг.7 показано, что НК-клетки, трансдуцированные вектором, который отдельно экспрессирует CD19-специфичный CAR и мутант TNF-альфа, не проявляют неспецифичной активности и не секретируют TNF-альфа неспецифично.

[0026] На фиг.8 показано, что рецепторные сайты связывания TNF-альфа для TNF-рецепторов 1 и 2 относительно антител к TNF-альфа, инфликсимаба и адалимумаба, отличаются. Последовательность на фигуре представляет собой SEQ ID NO: 50.

[0027] На фиг.9 представлена структура TNF-альфа с указанными доменами. Последовательности на фигуре представляют собой SEQ ID NO 17, 54-59, 51, 18 и 18-21, соответственно, в порядке появления.

[0028] Фиг.10 иллюстрирует мутацию TNF-альфа, которая объединяет мутацию в консенсусной последовательности казеинкиназы I (CKI) в цитоплазматическом домене (подчеркнуто) с делецией Ala -3 и Gln -2 (в дополнение к делеции от Ala-1 до Val13 включительно, которая не показана) в дополнение к шести примерам дополнительных мутаций, которые препятствуют связыванию с TNF-рецептором 1 и TNF-рецептором 2 (такие мутированные последовательности подчеркнуты двойной чертой). Нуклеотидная последовательность на фигуре представляет собой SEQ ID NO: 52, а полипептидная последовательность на фигуре представляет собой SEQ ID NO: 53.

[0029] На фиг.11А-11В показано, что противоопухолевая активность НК-клеток, трансдуцированных конструкцией TNF-alpha mutant-CAR19-IL15, превосходит активность конструкции iC9-CAR19-IL15. На фиг.11А, мыши NSG с опухолью Raji получали  $3 \times 10^6$  CAR-НК-клеток пуповинной крови, трансдуцированных конструкцией

TNF-alpha mut-CAR19-IL15 или конструкцией iC9-CAR19-IL-15. На фиг.11В показана выживаемость в процентах во времени.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0030] Настоящее описание включает путем ссылки временную заявку на патент США № 60/769414, поданную 19 ноября 2018 г.; временную заявку на патент США № 62/773394, поданную 30 ноября 2018 г.; и временную заявку на патент США № 62/791491, поданную 11 января 2019 г.

[0031] В настоящем описании единственное число может означать один или более. В пункте (пунктах) формулы изобретения при использовании совместно со словом «содержащий», слова в единственном числе могут означать один или более. При использовании в настоящем изобретении «другой» может означать по меньшей мере второй или более. В конкретных вариантах осуществления, аспекты изобретения могут, например, «состоять, по существу, из» или «состоять из» одной или более последовательностей по настоящему изобретению. Некоторые варианты осуществления изобретения могут состоять из или состоять по существу из одного или более элементов, стадий способа и/или способов по изобретению. Предполагается, что любой способ или композиция, описанные в настоящем изобретении, могут быть реализованы в отношении любого другого способа или композиции, описанных в настоящем изобретении. Объем настоящей заявки не ограничивается конкретными вариантами осуществления процесса, механизма, изготовления, химического вещества, средств, способов и стадий, описанных в спецификации изобретения. Используемые в настоящем изобретении термины «или» и «и/или» используются для описания нескольких компонентов объединенных или исключаящих друг друга. Например, «x, y и/или z» может относиться к только одному «x», только одному «y» и только одному «z» по отдельности, «x, y и z», «(x и y) или z», «x или (y и z)», или «x или y или z». В частности, предполагается, что x, y или z могут быть специально исключены из варианта осуществления.

[0032] В настоящей заявке термин «примерно» используется в соответствии с его простым и обычным значением в области клеточной и молекулярной биологии, чтобы указать, что значение включает в себя стандартное отклонение ошибки для устройства или способа, используемого для определения значения.

[0033] Термин «сконструированный», используемый в настоящем изобретении, относится к объекту, который создается человеком, включая клетку, нуклеиновую кислоту, полипептид, вектор и т.п. По меньшей мере в некоторых случаях сконструированный объект является синтетическим и содержит элементы, которые не присутствуют в природе или сконфигурированы способом, в котором он используется в описании.

[0034] В этом описании ссылка на «один вариант осуществления», на «вариант осуществления», «конкретный вариант осуществления», «родственный вариант осуществления», «некоторый вариант осуществления», «дополнительный вариант осуществления» и «еще один вариант осуществления», или их комбинации означают, что

конкретный признак, структура или характеристика, описанная в связи с вариантом осуществления, включена в по меньшей мере один вариант осуществления настоящего изобретения. Таким образом, появление вышеуказанных фраз в различных местах в этом описании не обязательно относится к одному и тому же варианту осуществления изобретения. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть скомбинированы любым подходящим способом в одном или нескольких вариантах осуществления.

#### [0035] **I. Общие варианты осуществления**

[0036] Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам и композициям, которые обеспечивают возможность прекращения клеточной терапии. Настоящее изобретение относится как к маркерному элементу, так и к суицидному/истощающему элементу для клеточной терапии на основе нерасщепляемых мутантов 26 кД TNF-альфа. Мутанты TNF-альфа являются нерасщепляемыми, что оставляет их мембраносвязанными и несекретируемыми. Клетки, экспрессирующие нерасщепляемые мутанты TNF-альфа, могут являться мишенями для селективного уничтожения, включая, например, применение одобренных FDA в настоящее время для клинического применения антител к TNF- $\alpha$ , таких как этанерсепт, инфликсимаб или адалилумаб. Мутированный полипептид TNF-альфа может быть совместно экспрессирован с одним или несколькими терапевтическими трансгенами, такими как ген, кодирующий TCR или CAR. Кроме того, экспрессирующие TNF-альфа клетки обладают превосходной активностью против опухолевой мишени, опосредованной биологической активностью связанного с мембраной белка TNF-альфа.

#### [0037] **II. Мутанты TNF-альфа**

[0038] Настоящее изобретение относится к мутантам TNF-альфа, экспрессия которых в конкретных клетках позволяет мутантному TNF быть мишенью агента, который связывается с мутантом, вызывая тем самым гибель конкретных клеток, несущих TNF-альфа. В конкретных вариантах осуществления мутантные полипептиды TNF-альфа являются нерасщепляемыми и несекретируемыми из-за одной или более мутаций, и такие нерасщепляемые и несекретируемые полипептиды представляют собой мутантный TNF-альфа, который должен быть мембраносвязанным. Связывание связанного с мембраной TNF-альфа в клетке позволяет убить клетку, когда связанный с мембраной TNF-альфа является мишенью агента, который связывает его прямо или непрямо, включая ингибитор. В вариантах осуществления, в которых ингибитор TNF-альфа представляет собой антитело, клетка может погибать в результате комплементзависимой цитотоксичности, и в вариантах осуществления, в которых ингибитор TNF-альфа не является антителом, клетка может погибать в результате другого механизма, такого как апоптоз.

[0039] Поэтому в конкретных вариантах мутанта участок (участки) расщепления на мембране удаляется, тем самым сохраняя экспрессию на поверхности клетки и наделяя клетку способностью становиться мишенью разрушения. Таким образом, данное описание предусматривает мутантный мембраносвязанный TNF-альфа в качестве суицидного гена

для селективного уничтожения трансдуцированных клеток

[0040] TNF-альфа имеет трансмембранную форму 26 кД и секретируемый компонент 17 кД. На фиг.1 (правая панель из Perez *et al.* (1990)) показаны некоторые мутанты, охваченные изобретением. В конкретных вариантах осуществления примеры мутантов TNF-альфа по настоящему изобретению включают по меньшей мере следующее по отношению к TNF-альфа 17 кД: (1) делецию Val1 и делецию Pro12; (2) делецию Val13; (3) делецию Val1 и делецию Val13; (4) делецию от Val1 до Pro12 включительно и также делецию Val13 (удаление 13 ак); (5) делецию от Ala -3 до Val13 включительно (удаление 16 ак); (6) делецию от Ala -1 до Val13 включительно (удаление 14 ак). В конкретных вариантах осуществления мутант TNF-альфа включает делецию соответствующей аминокислоты в положении -3, -2, -1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или их комбинации. Конкретные комбинации включают делеции в положениях от -3 до 13 включительно; от -3 до 12 включительно; от -3 до 11 включительно; от -3 до 10 включительно; от -3 до 9 включительно; от -3 до 8 включительно; от -3 до 7 включительно; от -3 до 6 включительно; от -3 до 5 включительно; от -3 до 4 включительно; от -3 до 9 включительн3; от -3 до 2 включительно; от -3 до 1 включительно; от -3 до -1 включительно; от -3 до -2 включительно; от -2 до 13 включительно; от -2 до 12 включительно; от -2 до 11 включительно; от -2 до 10 включительно; от -2 до 9 включительно; от -2 до 8 включительно; от -2 до 7 включительно; от -2 до 6 включительно; от -2 до 5 включительно; от -2 до 4 включительно; от -2 до 3 включительно; от -2 до 2 включительно; от -2 до 1 включительно; от -2 до -1 включительно; от -1 до 13 включительно; от -1 до 12 включительно; от -1 до 11 включительно; от -1 до 10 включительно; от -1 до 9 включительно; от -1 до 8 включительно; от -1 до 7 включительно; от -1 до 6 включительно; от -1 до 5 включительно; от -1 до 4 включительно; от -1 до 3 включительно; от -1 до 2 включительно; от -1 до 1 включительно; от 1 до 13 включительно; от 1 до 12 включительно; от 1 до 11 включительно; от 1 до 10 включительно; от 1 до 9 включительно; от 1 до 8 включительно; от 1 до 7 включительно; от 1 до 6 включительно; от 1 до 5 включительно; от 1 до 4 включительно; от 1 до 3 включительно; от 1 до 2 включительно; и так далее.

[0041] Мутанты TNF-альфа могут быть получены любым подходящим способом, но в конкретных вариантах осуществления они генерируются сайт-направленным мутагенезом. В некоторых случаях мутанты TNF-альфа могут иметь мутации, отличные от мутаций, которые делают белок нерасщепляемым. В отдельных случаях мутанты TNF-альфа могут иметь 1, 2, 3 или большее число мутаций, отличных от делеций в Val1, Pro12 и/или в Val13, или в области между ними. Мутации, отличающиеся от мутаций, которые делают мутанты несекретируемыми, могут представлять собой одну или несколько из аминокислотной замены, делеции, добавления, инверсии и т.п. В случаях, когда дополнительная мутация представляет собой аминокислотную замену, замена может представлять собой или нет замену, например, консервативной аминокислотой. В

некоторых случаях 1, 2, 3, 4, 5 или большее число дополнительных аминокислот могут присутствовать на N- и/или C-конце белка. В некоторых случаях мутант TNF-альфа имеет (1) одну или несколько мутаций, которые делают мутанта несекретируемым; (2) одну или несколько мутаций, которые предотвращают прохождение сигнала извне внутрь клетки для мутанта; и/или (3) одну или несколько мутаций, которые препятствуют связыванию мутанта с TNF-рецептором 1 и/или TNF-рецептором 2 и делают их неактивными.

[0042] Аминокислотная последовательность мутанта TNF-альфа delVal1 delPro12

[0043]

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVI  
GPQREEFPRDLSLISPLAQAARSSRTPSDKVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGV  
ELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQ  
RETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL (SEQ  
ID NO:1)

[0044] Нуклеотидная последовательность мутанта TNF-альфа delVal1 delPro12

[0045]

atgagcactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgtccccaagaagacaggggggcccagggtc  
caggcggtgctgttctcagcctcttctcctctgatcgtggcaggcggccaccagcctctctgctgctgactttggagtgatcgcccc  
cagaggggaagagttcccaggacctctctctaatcagccctctggcccaggcaagatcatctctcgaaccccgagtgacaaggtagccc  
atgttagcaaacctcaagctgaggggacgtccagtggtgaaccgcccggccaatgccctcctggccaatggcgtggagctgaga  
gataaccagctggtggtccatcagagggcctgtacctctactcccaggctcctctcaaggccaaggctgccccccaccatgtgct  
ctcaccacaccatcagccgatcggctctcctaccagaccaaggtaacctcctctctgcatcaagacccctgccagagggagac  
cccagagggggctgaggccaagccctggtatgagcccatctatctgggaggggtctccagctggagaagggtgaccgactcagcgtg  
agatcaatcgccccgactatctcgactttgccgagctctggcaggtctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO: 2)

[0046] Аминокислотная последовательность мутанта TNFa delVal1-Val13 (удаление 13 аминокислот)

[0047]

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVI  
GPQREEFPRDLSLISPLAQAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVP  
SEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAK  
PWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL (SEQ ID NO: 3)

[0048] Нуклеотидная последовательность мутанта TNFa delVal1-Pro12-delVal13 (удаление 13 аминокислот)

[0049]

atgagcactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgtccccaagaagacaggggggcccagggtc  
caggcggtgctgttctcagcctcttctcctctgatcgtggcaggcggccaccagcctctctgctgctgactttggagtgatcgcccc  
cagaggggaagagttcccaggacctctctctaatcagccctctggcccaggcagccatgtttagcaaacctcaagctgaggggag  
ctccagtggtgaaccgcccggccaatgccctcctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgcatcagagggcct  
gtacctctactcccaggctcctctcaaggccaaggctgccccccaccatgtgctcctcaccacaccatcagccgatcggctctc  
ctaccagaccaaggtaacctcctctctgcatcaagagccccctgccagagggagaccccagagggggctgaggccaagccctggtatg  
agcccatctatctgggaggggtctccagctggagaagggtgaccgactcagcgtgagatcaatcgccccgactatctcgactttgccga

gtctgggcaggctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO: 4)

[0050] Аминокислотная последовательность TNF-альфа delVal1-delVal13

[0051]

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSLIVAGATTLFCLLHFGVI  
GPQREEFPRDLSLISPLAQARSSSRTPSDKPAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGV  
ELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQ  
RETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIHAL (SEQ  
ID NO: 5)

[0052] Нуклеотидная последовательность TNF-альфа delVal1 delVal13

[0053]

atgagcactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccaggaggcgtccccaagaagacagggggcccagggtc  
caggcggctgttctctcagcctcttctctctctgatcgtggcaggcgcaccacgctcttctgctgctgcactttggagtgcgcccc  
cagaggggaaggtccccaggacctctctctaatcagccctctggcccaggcaagatcatctctcgaacccccagtgacaagcctgcc  
atgttagcaaacctcaagctgaggggacgtccagtggctgaaccggggccaatgccctcctggccaatggcgtggagctgaga  
gataaccagctgggtgcatcagaggcctgtacctatctactcccaggtcctctcaaggccaaggtgccctccacccatgtct  
ctcaccacaccatcagccgcatcggctctctaccagaccaaggtcaacctctctctgcatcaagagccccctgccagaggagac  
cccagaggggctgaggccaagcctggtatgagccatctatctgggaggggtctccagctggagaaggggtgaccgactcagcgtg  
agatcaatcgccccgactatctcgactttgccgagtctggcaggctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO: 6)

[0054] Нуклеотидная последовательность TNF-альфа delAla -3 - Val13

[0055]

TCGAGTCGAGATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCTGGCCGA  
GGAGGCGCTCCCCAAGAAGACAGGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTTCC  
TCAGCCTCTTCTCCTTCTGATCGTGGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTGCCTGCTGCA  
CTTTGGAGTGATCGGCCCCCAGAGGGAAGAGTTCCCAGGGACCTCTCTCTAATCAG  
CCCTCTGCAGGCAGCCCATGTTGTAGCAAACCCTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGT  
GGCTGAACCGCCGGGCAATGCCCTCCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAAC  
CAGCTGGTGGTGCCATCAGAGGGCCTGTACCTCATCTACTCCCAGGTCCTCTTCAAG  
GGCCAAGGCTGCCCCTCCACCCATGTGCTCCTCACCCACACCATCAGCCGCATCGCC  
GTCTCCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTGCCATCAAGAGCCCCTGCCAGAGG  
GAGACCCAGAGGGGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGAGG  
GGTCTTCCAGCTGGAGAAGGGTGACCGACTCAGCGCTGAGATCAATCGGCCCGACT  
ATCTCgACTTTGCCGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTGTCGTGCG  
(SEQ ID NO: 38)

[0056] Аминокислотная последовательность TNF-альфа delAla -3 и делеция от Val1 до Val13 включительно (удаление ак в положении -3 и удаление ак в положениях 1-13 (с сохранением ак в положениях -2 и -1)):

[0057]

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSLIVAGATTLFCLLHFGVI  
GPQREEFPRDLSLISPLQAAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVP  
SEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKP

WYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL (SEQ ID NO: 39)

[0058] Нуклеотидная последовательность мутанта TNF-альфа delAla -3 - Val13 в дополнение к примеру мутации СИК-мотива, которая предотвращает передачу сигналов извне внутрь клетки, и другие мутации, которые препятствуют связыванию мутанта с TNF-рецептором 1 и/или TNF-рецептором 2 (см. фиг. 10)

[0059]

ATGAGCACTGAAATGCATCCCGGAAGGGGGTCCTGGCACGAGGAGGCGCTC  
 CCCAAGAAGACAGGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTTCCCTCAGCCTCTTC  
 TCCTTCCTGATCGTGGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTTCCTGCTGCACTTTGGAGTGA  
 TCGGCCCCCAGAGGGAAGAGTTCCCCAGGGACCTCTCTCTAATCAGCCCTCTGGCCC  
 ATGTTGTAGCAAACCCTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGGGCC  
 AATGCCCTCCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGCTGGTGGTGCCATC  
 AGAGGGCCTGTACCTCATCTACTCCCAGGTCCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCTC  
 CACCCATGTGCTCCTCACCCACACCATCAGCCGCATCGCCGTCTCCCACCAGACCAA  
 GGTCAACCTCCTCTTCGCCATCAAGAGCCCCTGCCAGAGGGAGACCCCAGAGGGGG  
 CTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTGGAG  
 AAGGGTGACCGACTCATCGCTGAGATCAATCGGCCCGACTATCTCTACTTTGCCGAG  
 TATGGGCAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTGTCG (SEQ ID NO: 40)

[0060] Мутант TNF-альфа с аминокислотной последовательностью del Ala-3 - Val13, кодируемой SEQ ID NO: 40

[0061]

MSTEMHPGRGSWHEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFLLHFGV  
 IGQREEFPRDLSLISPLAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEG  
 LYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVSHQTKVNLLFAIKSPCQRETPEGAEAKPW  
 YEPIYLGGVFQLEKGDRLIAEINRPDYLYFAEYGVYFGIIALS (SEQ ID NO: 41)

[0062] В конкретных вариантах осуществления мутант TNF-альфа может содержать делецию от Ala -3 до Val13, но не содержит мутацию СИК-мотива и мутацию, которая препятствует связыванию с TNF-рецептором 1 и/или TNF-рецептором 2.

[0063] Для справки приведена аминокислотная последовательность TNF дикого типа, версия 26 кД

[0064]

MSTEMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVI  
 GPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPVANVVANPQAEGQLQWLNRRANALLAN  
 GVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSP  
 CQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL  
 (SEQ ID NO: 7)

[0065] Для справки приведена аминокислотная последовательность TNF дикого типа, версия 17 кД

[0066]

VRSSSRTPSDKPVANVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSE

GLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKP  
WYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL (SEQ ID NO: 8)

[0067] Мутанты TNF-альфа, лишенные способности к индукции внутриклеточного сигнала или способности связывания TNF-рецептора

[0068] Эти мутанты имеют мутации в цитоплазматическом сигнальном домене и/или в областях связывания с TNF-рецептором и, следовательно, не проявляют никакой биологической активности, поскольку они не обладают способностью к обратной сигнализации и/или способностью связывать TNF-рецепторы, соответственно. Это позволяет TNF-альфа в конструкции быть мишенью для ингибиторов TNF, в то же время не проявляя биологической активности.

[0069] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутанты TNF-альфа лишены части или всего внутрицитоплазматического домена TNF-альфа, так что мутантный TNF-альфа неспособен осуществлять внутриклеточную передачу сигнала (обратную сигнализацию). Несекретируемые мутанты TNF-альфа также могут или нет подвергаться мутагенезу для удаления части или всего внутрицитоплазматического домена.

[0070] На фиг.9 представлена структура TNF-альфа. Как показано на фиг.9, внутрицитоплазматический домен содержит MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFL (SEQ ID NO: 17). Сайт киназы I (CKI) представляет собой STES (SEQ ID NO: 18). Трансмембранный домен представляет собой FSFLIVAGATTLFCLLHFGVI (SEQ ID NO: 19). Сайт расщепления SPPL2b представляет собой SL/LI. Линкер содержит GPQREEFPRDLSLISPLAQA (SEQ ID NO: 20). Сайт расщепления TACE представляет собой VRSSSRTPSDKPV (SEQ ID NO: 21). P01375 относится к номеру белка в базе данных UniProt. Последовательность на фиг.9 относится только к части белка TNF.

[0071] Конкретные примеры мутанта TNF-альфа для мотива CKI (мутантная последовательность подчеркнута) для нуклеотидной и аминокислотной последовательностей, соответственно, являются следующими:

[0072]

atgagcactgaaaTGCATCCCGGAAGGGGGTCCTGGCACgaggaggcgctccccaagaagacagg  
gggccccagggtccaggcggctgtgtcctcagcctctctcctctgatcgtggcaggcgccaccacgctctctgctgctgcacttt  
ggagtgatcgccccagaggaagagttccccaggacctctctctaatcagccctctggcccaggcagcccatgttagcaaacct  
caagctgaggggagctccagtggtgaaccgcccgaatgccctctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctgggtg  
tgccatcagaggcctgtactctactcccaggctctctcaaggccaaggctgccctccacccatgtgctcctcaccacaccatc  
agccgcatcgccgtctctaccagaccaaggtcaacctctctctgcatcaagagcccctgccagagggagacccagagggggctga  
ggccaagccctggtatgagccatctatctgggaggggtctccagctggagaagggtgaccgactcagcgctgagatcaatcgccccga  
ctatctcgactttgccgagtctggcaggtctactttgggatcattgccctgcg (SEQ ID NO: 22)

[0073]

MSTEMMHPGRGSWHEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGV  
IGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLA

NGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIK  
 SPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL  
 (SEQ ID NO: 23)

[0074] Одним примером мутанта TNF-альфа, имеющего мутацию M-71K во внутрицитоплазматической последовательности и другую мутацию Y87H (мутированные последовательности подчеркнуты) для нуклеотидной и аминокислотной последовательностей, соответственно, является следующий:

[0075]

atgagcactgaaagcaAgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgctccccaagaagacagggggccccagggct  
 ccaggcggtgctgttctcagcctcttctctctgatcgtggcaggcgccaccacgctcttctgctgctgcactttggagtgatcgccc  
 ccagaggggaagagttccccagggacctctctctaatcagccctctggcccaggcagcccatgtttagcaaacctcaagctgaggggca  
 gctccagtggctgaaccgcccggccaatgccctctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgccatcagagggcc  
 tgtacctatctactcccaggtcctctcaagggccaaggctgccctccaccatgtgctctcaccacaccatcagccgcatcgccgtct  
 ccCaccagaccaaggtcaacctctctctgccatcaagagcccctgccagagggagaccccagagggggctgaggccaagccctggtat  
 tgagcccatctatctgggaggggtctccagctggagaagggtgaccgactcagcgtgagatcaatcgcccgactatctcgactttgcc  
 gactctgggcaggctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO: 24)

[0076]

MSTESKIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTFLCLLHFGVI  
 GPQREEFPRDLSLISPLAQA AHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVP  
 SEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVSHQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAK  
 PWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL (SEQ ID NO: 25)

[0077] Одним примером мутанта TNF-альфа, имеющего мутацию в S95F и C-28F (мутированные последовательности подчеркнуты) для нуклеотидной и аминокислотной последовательностей, соответственно, является следующий:

[0078]

atgagcactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgctccccaagaagacagggggccccagggctc  
 caggcggtgctgttctcagcctcttctctctgatcgtggcaggcgccaccacgctcttctTctgctgcactttggagtgatcgcccc  
 cagaggggaagagttccccagggacctctctctaatcagccctctggcccaggcagcccatgtttagcaaacctcaagctgaggggag  
 ctccagtggctgaaccgcccggccaatgccctctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgccatcagagggcct  
 gtacctatctactcccaggtcctctcaagggccaaggctgccctccaccatgtgctctcaccacaccatcagccgcatcgccgtctc  
 ctaccagaccaaggtcaacctctctTCgcatcaagagcccctgccagagggagaccccagagggggctgaggccaagccctggtat  
 gagcccatctatctgggaggggtctccagctggagaagggtgaccgactcagcgtgagatcaatcgcccgactatctcgactttgccg  
 agtctgggcaggctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO: 26)

[0079]

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTFLFLLHFGVI  
 GPQREEFPRDLSLISPLAQA AHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVP  
 SEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLFAIKSPCQRETPEGAEAK  
 PWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL (SEQ ID NO: 27)

[0080] Одним примером мутанта TNF-альфа, имеющего мутацию в S133I и S147Y (мутированные последовательности подчеркнуты) для нуклеотидной и аминокислотной

последовательностей, соответственно, является следующий:

[0081]

Atgagcactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgctccccaagaagacaggggggccccagggct  
ccaggcggtgctgttctcagcctcttctcctctgatcgtggcaggcgccaccacgctcttctgctgctgcactttggagtgatcgccc  
ccagagggaagagttccccagggacctctctctaatcagccctctggcccaggcagcccatggttagcaaacctcaagctgaggggca  
gctccagtggctgaaccgcccgggccaatgccctcctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgccatcagagggcc  
tgtacctatctactcccaggtcctcttcaaggccaaggctgcccctccaccatgtgctcctcaccacacacatcagccgatcgccgtct  
ctaccagaccaaggtcaacctcctctctgcatcaagagccccctgccagagggagaccccagagggggctgaggccaagccctggtat  
gagccccatctatctgggaggggtcttccagctggagaagggtgaccgactcaTcgctgagatcaatcgccccgactatctcgactttgccg  
agtAtgggcaggtctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO: 28)

[0082]

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSLIVAGATTFLCLLHFGVI  
GPQREEFPRDLSLISPLAQA AHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVP  
SEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAK  
PWYEPIYLGGVFQLEKGDRLIAEINRPDYLDFAEYGQVYFGIIAL (SEQ ID NO: 29)

[0083] Одним примером мутанта TNF-альфа, имеющего мутацию в Asp143Tyr и делецию Ala в положении -1 (мутированная последовательность подчеркнута, а удаленная последовательность показана зачеркнутой) для нуклеотидной и аминокислотной последовательностей, соответственно, является следующий:

[0084]

atgagcactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgctccccaagaagacaggggggccccagggctc  
caggcggtgctgttctcagcctcttctcctctgatcgtggcaggcgccaccacgctcttctgctgctgcactttggagtgatcgcccc  
cagaggggaagagttccccagggacctctctctaatcagccctctggcccaggcagcccatggttagcaaacctcaagctgaggggag  
ctccagtggctgaaccgcccgggccaatgccctcctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgccatcagagggcct  
gtacctatctactcccaggtcctcttcaaggccaaggctgcccctccaccatgtgctcctcaccacacacatcagccgatcgccgtctc  
ctaccagaccaaggtcaacctcctctctgcatcaagagccccctgccagagggagaccccagagggggctgaggccaagccctggtatg  
agccccatctatctgggaggggtcttccagctggagaagggtgaccgactcagcgtgagatcaatcgccccgactatctcTactttgccga  
gtctgggcaggtctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO: 30)

[0085]

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSLIVAGATTFLCLLHFGVI  
GPQREEFPRDLSLISPLAQA AHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVP  
SEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAK  
PWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLYFAESGQVYFGIIAL (SEQ ID NO: 31)

[0086] Версии SEQ ID NO:30 and SEQ ID NO:31, в которых отсутствуют удаленные последовательности, приведены ниже, соответственно (мутированные последовательности подчеркнуты).

[0087]

atgagcactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgctccccaagaagacaggggggccccagggctc  
caggcggtgctgttctcagcctcttctcctctgatcgtggcaggcgccaccacgctcttctgctgctgcactttggagtgatcgcccc  
cagaggggaagagttccccagggacctctctctaatcagccctctgcaggcagcccatggttagcaaacctcaagctgaggggagctc

cagtggctgaaccgccggccaatgccctcctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgccatcagagggcctgta  
 cctcatctactcccaggtcctcttcaagggccaaggctgccctccaccatgtgctcctcaccacacccatcagccgcatcgccgtctcta  
 ccagaccaaggtcaacctcctctctgccatcaagagccccctgccagagggagacccagagggggtgagggccaagccctggtatgag  
 cccatctatctgggaggggtctccagctggagaagggtgaccgactcagcgtgagatcaatcgccccgactatctcTactttgccgag  
 ctggcgaggtctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO: 32)

[0088]

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVI  
 GPQREEFPRDLSLISPLAQAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVPS  
 EGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKP  
 WYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLYFAESGQVYFGIIAL (SEQ ID NO: 33)

[0089] Одним примером мутанта TNF-альфа, имеющего комбинацию мутации СИК-мотива и вышеуказанных мутаций, является следующий, при этом мутации подчеркнуты:

[0090]

ATGCTCGAGtcgagatgagcactgaaaTGCATCCCGGAAGGGGGTCTGGCACgaggaggc  
 gctcccaagaagacagggggggccccagggctccagggcgtgctgttctcagcctcttctcctctgatcgtggcagggccaccac  
 gctctctTcctgctgcactttggagtgatcgccccagaggggaagagttccccagggacctctctaatcagccctctggcagccccatg  
 tttagcaaacctcaagctgaggggcagctccagtggtgaaccgccggccaatgccctcctggccaatggcgtggagctgagagat  
 aaccagctggtggtgccatcagagggcctgtacctcatctactcccaggtcctcttcaagggccaaggctgccctccaccatgtgctct  
 caccacacccatcagccgcatcgccgtctccCaccagaccaaggtcaacctcctctTCgccatcaagagccccctgccagagggagacc  
 ccagagggggtgagggccaagccctggtatgagccatctatctgggaggggtctccagctggagaagggtgaccgactcaTcgctg  
 agatcaatcgccccgactatctcTactttgccgagTatgggcaggtctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO: 34)

[0091]

MSTEMHPGRGSWHEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFELLHFGV  
 IGQREEFPRDLSLISPLAQAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVPS  
 EGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIVSHQTKVNLLFAIKSPCQRETPEGAEAKP  
 WYEPIYLGGVFQLEKGDRLIAEINRPDYLYFAEYGGQVYFGIIAL (SEQ ID NO: 35)

[0092] **III. Терапевтический ген (гены)**

[0093] В некоторых случаях клетки, экспрессирующие мутантный TNF-альфа (мутанты), могут также экспрессировать один или более терапевтических генов. В тех случаях, когда используется более одного терапевтического гена, терапевтические гены могут являться или нет одним и тем же типом молекулы. Например, в дополнение к мутанту TNF-альфа одна клетка может также экспрессировать сконструированный рецептор, цитокин, цитокиновый рецептор, хоминговый рецептор, хемокиновый рецептор или их комбинацию. В настоящую спецификацию включены нуклеотидные последовательности терапевтических генов; продукты терапевтических генов, включая полипептиды; векторы, содержащие нуклеотидную последовательность терапевтического гена; и клетки, содержащие любое из вышеперечисленного.

[0094] В конкретных вариантах осуществления изобретения мутант совместно экспрессируется по меньшей мере с одним терапевтическим геном, включая терапевтический трансген. Терапевтический трансген может быть любого типа, но в

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

[0095] В тех случаях, когда продукт терапевтического гена является сконструированным рецептором, рецептор содержит антигенсвязывающий домен, мишенью которого может быть любой антиген, такой как опухолевый антиген. Антигенсвязывающий домен может, например, содержать scFv. Молекулы антигенов могут относиться, например, к инфекционным агентам, аутоантигенам, антигенам, связанным с опухолью/раком, или опухолевым неоантигенам. Примеры антигенов, которые могут быть мишенями, включают, но не ограничиваются ими, антигены, экспрессирующиеся в В-клетках; антигены, экспрессирующиеся на карциномах, саркомах, лимфомах, лейкозах, опухолях зародышевых клеток и бластомах; антигены, экспрессирующиеся на различных иммунных клетках; и антигены, экспрессирующиеся на клетках, ассоциированных с различными гематологическими заболеваниями, аутоиммунными заболеваниями и/или воспалительными заболеваниями. Примеры специфических антигенов в качестве мишеней включают CD19, CD5, CD99, CD33, CLL1, CD123, 4-1BB, 5T4, антиген аденокарциномы, альфа-фетопротеин, BAFF, клетки В-лимфомы, C242 антиген, CA-125, карбоангидразу 9 (CA-IX), C-MET, CCR4, CD152, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23 (рецептор IgE), CD28, CD30 (TNFRSF8), CD33, CD4, CD40, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CEA, CNTO888, CTLA-4, DRS, EGFR, EpCAM, CD3, FAP, экстрадомен В фибронектина, фолатный рецептор 1, ганглиозиды GD2, GD3, гликопротеин 75, GPNB, HER2/neu, HGF, человеческий рецептор фактора рассеяния, рецептор IGF-1, IGF-1, IgG1, L1-CAM, IL-13, IL-6, инсулиноподобный фактор роста I, integrin- $\alpha$ 5 $\beta$ 1, integrin $\alpha$ v $\beta$ 3, MORAb-009, MS4A1, MUC1, муцин CanAg, N-гликолилнейраминная кислота, NPC-1 С, PDGF-R альфа, PDL192, фосфатидилсерин, клетки карциномы предстательной железы, RANKL, RON, ROR1, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, TAG-72, тенасцин С, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ , TRAIL-R1, TRAIL-R2, опухолевый антиген STA16.88, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR2, виментин и их комбинации. Любой рецептор антигена, который может быть использован в способах и композициях по настоящему изобретению, может иметь своей мишенью любой из указанных выше антигенов, или один или более других, и такой рецептор антигена может представлять собой CAR или TCR. В конкретных вариантах осуществления в одном и тех же клетках для терапии могут использоваться как CAR, так и TCR.

[0096] В тех случаях, когда терапевтический ген кодирует CAR, CAR, например,

может представлять собой первое поколение, второе поколение или третье или последующее поколение. CAR может являться или нет биспецифичным по отношению к двум или нескольким различным антигенам. CAR может содержать один или более костимуляторных доменов. Каждый костимуляторный домен может содержать костимуляторный домен любого одного или более из, например, представителей суперсемейства CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), Dap10, DAP12, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40 или их комбинаций. В конкретных вариантах осуществления изобретения CAR содержит CD3-зета. В некоторых вариантах осуществления CAR не имеет одного или более специфических костимуляторных доменов, например, CAR может не иметь 4-1BB.

[0097] В конкретном варианте осуществления CAR содержит по меньшей мере DAP12 в качестве костимуляторного домена, и в некоторых аспектах полипептид CAR содержит конкретную аминокислотную последовательность DAP12 или кодируется определенной последовательностью нуклеиновой кислоты DAP12. Примеры приведены ниже:

[0098] Аминокислотная последовательность DAP12

[0099]

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLT  
VLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK  
(SEQ ID NO: 9)

[0100] Нуклеотидная последовательность DAP12

[0101]

ATGGGGGGGACTTGAACCCTGCAGCAGGCTCCTGCTCCTGCCTCTCCTGCTGGC  
TGTAAGTGGTCTCCGTCCTGTCCAGGCCAGGCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTAC  
GGTGAGCCCGGGCGTGCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTGC  
TCATTGCCCTGGCCGTGTACTTCCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTG  
CGGAGGCAGCGACCCGGAAACAGCGTATCACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAG  
CTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGCCGTATTA  
CAAATGA (SEQ ID NO: 10)

[0102] В конкретном варианте осуществления CAR содержит по меньшей мере CD28 в качестве костимуляторного домена, и в некоторых аспектах полипептид CAR содержит конкретную аминокислотную последовательность CD28 или кодируется определенной нуклеотидной последовательностью н CD28. Примерами являются следующие:

[0103] Аминокислотная последовательность CD28

[0104]

KFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKH  
YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP  
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT  
YDALHMQALPPRG (SEQ ID NO:11)

[0105] Нуклеотидная последовательность CD28

[0106]

ATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAG  
 TAACAGTGGCSTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACA  
 GTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAG  
 CCSTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCACGCG (SEQ ID NO: 12)

[0107] В конкретных вариантах осуществления полипептид CAR содержит внеклеточный спейсерный домен, который связывает антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен. Внеклеточные спейсерные домены могут включать, но не ограничиваются ими, Fc-фрагменты антител или их фрагменты или их производные, шарнирные области антител или их фрагменты или производные, CH2-области антител, CH3-области антител, искусственные спейсерные последовательности или их комбинации. Примеры внеклеточных спейсерных доменов включают, но не ограничиваются ими, шарнир CD8-альфа, искусственные спейсеры из полипептидов, таких как Gly3, или CH1-, CH3-домены IgG (таких как IgG1 или IgG4 человека). В конкретных случаях внеклеточный спейсерный домен может содержать (i) шарнирную, CH2- и CH3-области IgG4, (ii) шарнирную область IgG4, (iii) шарнир и CH2 из IgG4, (iv) шарнирную область CD8-альфа, (v) шарнир, CH2- и CH3-области IgG1, (vi) шарнирную область IgG1 или (vi) шарнир и CH2 из IgG1, или их комбинацию.

[0108] В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения шарнир принадлежит IgG1, и в некоторых аспектах полипептид CAR содержит конкретную аминокислотную последовательность с шарнирной аминокислотной последовательностью IgG1 или кодируется конкретной нуклеотидной последовательностью шарнира из IgG1. Примерами являются следующие:

[0109] Аминокислотная последовательность шарнира IgG1

[0110]

SYVTVSSQDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC  
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
 EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
 AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN  
 NYTQKLSLSLSPGKDKPK (SEQ ID NO: 13)

[0111] Нуклеотидная последовательность шарнира IgG1

[0112]

GTACGTCACGTCTCTTACAGGATCCCGCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAA  
 ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC  
 CTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA  
 TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT  
 GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC  
 AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC  
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAAC

CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT  
 CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC  
 TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAATA  
 CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCT  
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC  
 ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA  
 AAAGATC (SEQ ID NO: 14)

[0113] **IV. Векторы**

[0114] Мутант (мутанты) TNF-альфа может быть доставлен в клетку-реципиента с помощью любого подходящего вектора, включая вирусный вектор или невирусный вектор. Примеры вирусных векторов включают по меньшей мере ретровирусные, лентивирусные, аденовирусные или аденоассоциированные вирусные векторы. Примеры невирусных векторов включают по меньшей мере плазмиды, транспозоны, липиды, наночастицы и т.п.

[0115] В тех случаях, когда клетка трансдуцируется вектором, кодирующим мутантный ген TNF-альфа, а также требует трансдукции другого гена в клетку, такого как продукт терапевтического гена, мутантный ген TNF-альфа и терапевтический ген могут быть включены или нет в один вектор. В некоторых случаях мутантный ген TNF-альфа и терапевтический ген экспрессируются с одной векторной молекулы, такой как одна молекула вирусного вектора. В таких случаях экспрессия мутантного гена TNF-альфа и терапевтического гена может регулироваться одним регуляторным элементом (элементами). Когда мутантный ген TNF-альфа и терапевтический ген находятся в одном векторе, они могут экспрессироваться в виде отдельных полипептидов. В тех случаях, когда они экспрессируются в виде отдельных полипептидов, они могут быть разделены в векторе, например, с помощью элемента 2A или элемента IRES. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутант TNF-альфа и продукт терапевтического гена продуцируются в виде слитого белка.

[0116] В конкретных вариантах осуществления мутантный ген TNF-альфа экспрессируется с мультицистронного вектора. Мультицистронный вектор может кодировать по меньшей мере один терапевтический ген в дополнение к гену мутанта TNF-альфа. В конкретных вариантах осуществления мультицистронный вектор кодирует мутант TNF-альфа и по меньшей мере один сконструированный рецептор, такой как T-клеточный рецептор и/или CAR. В некоторых случаях мультицистронный вектор кодирует по меньшей мере один мутант TNF-альфа, по меньшей мере один сконструированный рецептор, и по меньшей мере один цитокин. Цитокин может относиться к конкретному типу цитокина, например, принадлежать человеку или мыши, или любому биологическому виду. В специфических случаях цитокином является интерлейкин (IL)15, IL12, IL2, IL18 и/или IL21.

[0117] Одним примером нуклеотидной последовательности для вектора, который кодирует мутант TNF-альфа delVal1 delPro12, и который отдельно кодирует CD19-

специфичный CAR с шарниром IgG1, CD28 и CD3-зета, и который отдельно кодирует IL15, является следующий:

[0118]

AATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTT  
 TGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGG  
 AACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCT  
 GCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGAT  
 ATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGA  
 TCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCA  
 AGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCT  
 TCTGTTTCGCGCGCTTATGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTC  
 GGGGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACC  
 CTCTTGCAAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCCCTGGGAGGGTCTCCTCTGAG  
 TGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCATTTGGGGGCTCGTCCGGGATCGGGAG  
 ACCCTGCCAGGGACCACCGACCCACCACCGGGAGGTAAGCTGGCCAGCAACTTA  
 TCTGTGTCTGTCCGATTGTCTAGTGTCTATGACTGATTTTATGCGCCTGCGTCGGTAC  
 TAGTTAGCTAACTAGCTCTGTATCTGGCGGACCCGTGGTGGAAGTACGAGTTCGGA  
 ACACCCGGCCGCAACCCTGGGAGACGTCCAGGGACTTCGGGGGCCGTTTTTGTGG  
 CCCGACCTGAGTCCTAAAATCCCGATCGTTTAGGACTCTTTGGTGCACCCCCCTTAG  
 AGGAGGGATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGAGAACCTAAAACAGTTCCCGCCTCCG  
 TCTGAATTTTTGCTTTCGGTTTGGGACCGAAGCCGCGCCGCGCGTCTTGTCTGCTGCA  
 GCATCGTTCTGTGTTGTCTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTATTTGTCTGAAAATATGGG  
 CCCGGGCTAGCCTGTTACCACTCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCACTGGAAAGATGT  
 CGAGCGGATCGCTCACAACCAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTACCT  
 TCTGCTCTGCAGAATGGCCAACCTTTAACGTCGGATGGCCGCGAGACGGCACCTTTA  
 ACCGAGACCTCATCACCCAGGTTAAGATCAAGGTCTTTTCACCTGGCCCCGCATGGAC  
 ACCCAGACCAGGTGGGGTACATCGTGACCTGGGAAGCCTTGGCTTTTGACCCCCCTC  
 CCTGGGTCAAGCCCTTTGTACACCCTAAGCCTCCGCCTCCTCTTCCATCCGCCCC  
 GTCTCTCCCCCTTGAACCTCCTCGTTCGACCCCGCCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCC  
 CTCACTCCTTCTCTAGGCGCCCCATATGGCCATATGAGATCTTATATGGGGCACCC  
 CCGCCCCTTGTAACCTCCCTGACCCTGACATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCT  
 CTCCAAGCTCACTTACAGGCTCTCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTG  
 GCGGCAGCCTACCAAGAACAACCTGGACCGACCGGTGGTACCTACCCTTACCGAGT  
 CGGCGACACAGTGTGGGTCCGCCGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGA  
 AAGGACCTTACACAGTCCTGCTGACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATC  
 GCAGCTTGGATACACGCCGCCACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATC  
 CTCTAGACTGCCATGCTCGAGATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCT  
 GGCCGAGGAGGCGCTCCCCAAGAAGACAGGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGC  
 TTGTTCCCTCAGCCTCTTCTCCTTCTGATCGTGGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTGCC  
 TGCTGCACTTTGGAGTGATCGGCCCCAGAGGGAAGAGTTCCCAGGGACCTCTCTC

TAATCAGCCCTCTGGCCCAGGCAAGATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAGGTAG  
CCCATGTTGTAGCAAACCCTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGG  
GCCAATGCCCTCCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGCTGGTGGTGCC  
ATCAGAGGGCCTGTACCTCATCTACTCCCAGGTCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCCC  
CTCCACCCATGTGCTCCTCACCCACACCATCAGCCGCATCGCCGTCTCCTACCAGAC  
CAAGGTCAACCTCCTCTCTGCCATCAAGAGCCCCTGCCAGAGGGAGACCCCAAGAGG  
GGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTG  
GAGAAGGGTGACCGACTCAGCGCTGAGATCAATCGGCCCGACTATCTCGACTTTGC  
CGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTGTCGCGAGCCGAGGGCAGGG  
GAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGGAGTTTGGG  
CTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTCTAGAGACATCC  
AGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCAACATCA  
GTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCA  
GATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTACCATAACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCA  
TCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTG  
GAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACG  
TTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG  
TGGTTCTGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGAGGTGCAGCTGCAGCAGT  
CTGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTACATGCACTGTCTCAG  
GGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTC  
TGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTC  
AAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAAT  
GAACAGTCTGCAAACCTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTA  
CGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACTGTCTCCTC  
GTACGTCACTGTCTCTTACAGGATCCC GCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCA  
CACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTT  
CCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT  
GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG  
GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC  
GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG  
AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATC  
TCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCG  
GGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC  
CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACACTACAA  
GACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAC  
CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG  
AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAAAA  
GATCCCAAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTG  
CTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTG  
CACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTAA

CCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCACGCGTGAAGTTCAG  
CAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGC  
TCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGAC  
CCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATG  
AACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGA  
GCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA  
AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTA  
CTAATTATGCTCTCTTCAAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGC  
GCATTAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGC  
TGAACAGCCACTTCTGACCGAGGCCGGCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCA  
GCGCCGACTGCCCAAGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAG  
AAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAG  
CGACGTGCACCCAGCTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACCTGCA  
GGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGA  
TCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGC  
AAAGAGTGCAGGAACTGGAAGAGAAGAACAATCAAAGAGTTTTCTGCAGAGCTTCGT  
GCACATCGTGCAGATGTTTCATCAACACCAGCTGACAATTGCGCGTCATCATCGATCC  
GGATTAGTCCAATTTGTTAAAGACAGGATATCAGTGGTCCAGGCTCTAGTTTTGACT  
CAACAATATCACCAGCTGAAGCCTATAGAGTACGAGCCATAGATAAAAATAAAGAT  
TTTTTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCA  
AGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATA  
GAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACA  
GGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACA  
GCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGG  
GCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACC  
ATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAAC  
TAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATA  
AAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCC  
GGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCT  
GTTCCCTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCAC  
ACATGCAGCATGTATCAAATAAATTTGGTTTTTTTTTCTTAAGTATTTACATTAATG  
GCCATAGTACTTAAAGTTACATTGGCTTCCTTCAAATAAACATGGAGTATTCAGAAT  
GTGTCATAAATATTTCTAATTTTAAGATAGTATCTCCATTGGCTTTCTACTTTTTCTT  
TATTTTTTTTTGTCCTCTGTCTTCCATTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT  
GGTTGGTTGGTTAATTTTTTTTTTAAAGATCCTACACTATAGTTCAAGCTAGACTATTA  
GCTACTCTGTAACCCAGGGTGACCTTGAAGTCATGGGTAGCCTGCTGTTTTAGCCTT  
CCCACATCTAAGATTACAGGTATGAGCTATCATTTTTGGTATATTGATTGATTGATTG  
ATTGATGTGTGTGTGTGATTGTGTTTGTGTGTGTGACTGTGAAAATGTGTGTATGG  
GTGTGTGTGAATGTGTGTATGTATGTGTGTGTGTGAGTGTGTGTGTGTGTGTGCAT  
GTGTGTGTGTGTGACTGTGTCTATGTGTATGACTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT

GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGAAAAAATATTCTATGGTAGTGAGAGCCAACG  
CTCCGGCTCAGGTGTCAGGTTGGTTTTTGTGACAGAGTCTTTCAGTTAGCTTGGAAATT  
CACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTA  
ATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCA  
CCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGT  
ATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCAGTCTCAGTAC  
AATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGA  
CGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGT  
CTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCCGTCATCACCGAAACGCGCGAGAC  
GAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTT  
CTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTAT  
TTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGC  
TTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTA  
TTCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAA  
AGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATC  
TCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGA  
GCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAG  
AGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAG  
TCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCC  
ATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACC  
GAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCG  
TTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGC  
CTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAG  
CTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTT  
CTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAG  
CGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATC  
GTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGAT  
CGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTC  
ATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAA  
GATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGA  
GCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGC  
GTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCG  
GATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATA  
CCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTA  
GCACCGCCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGC  
GATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAAGGCGCA  
GCGGTGCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCT  
ACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAA  
GGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACAGGAGAGCGCA  
CGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCC

ACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGA  
 AAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCA  
 CATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAG  
 TGAGCTGATAACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGA  
 GGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTC  
 ATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAAC  
 GCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTC  
 CGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGGAAACAGCT  
 ATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGCTCTTAGGAGTTTCCTAATACATCCCAAATC  
 AAATATATAAAGCATTGACTTGTCTATGCCCTAGGGGGCGGGGGGAAGCTAAGC  
 CAGCTTTTTTTAAACATTTAAAATGTTAATTCATTTTAAATGCACAGATGTTTTTATT  
 TCATAAGGGTTTCAATGTGCATGAATGCTGCAATATTCCTGTTACCAAAGCTAGTAT  
 AAATAAAAATAGATAAACGTGGAAATTAAGTTTCTGTCATTAACGTTTCCTT  
 CCTCAGTTGACAACATAAATGCGCTGCTGAGCAAGCCAGTTTGCATCTGTCAGGATC  
 AATTTCCATTATGCCAGTCATATTAATTAAGTCAATTAGTTGATTTTTATTTTTG  
 ACATATACATGTG (SEQ ID NO: 15)

[0119] Одним примером аминокислотной последовательности для вектора, который кодирует мутант TNF-альфа delVal1 delPro12, и который отдельно кодирует CD19-специфичный CAR с шарниром IgG1, CD28 И CD3-зета, и который отдельно кодирует IL15, является следующий:

[0120]

MSTEMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSLIVAGATTLFCLLHFGVI  
 GPQREEFPRDLSLISPLAQARSSSRTPSDKVAHVVANPQAEGLQWLNRRANALLANGV  
 ELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQ  
 RETPEGAEAKPWYEPYILGGVVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIALLSRAEG  
 RGSLLTCGDVEENPGPMEFGLSWLFLVAILKGVQCSRDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC  
 RASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI  
 ATYFCQQGNTLPYTFGGGKLELKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGPGLV  
 APSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKD  
 NSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTTVTVSSYVTVSSQDP  
 AEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF  
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI  
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
 KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD  
 PKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYP  
 YAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEM  
 GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYD  
 ALHMQALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTE  
 AGIHVFILGCFSAAGLPKTEANWVNVISDLKIKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAM  
 KCFLELQVISLES GDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQS

FVHIVQMFINTS (SEQ ID NO: 36)

[0121] Одним примером нуклеотидной последовательности для вектора, который кодирует мутант TNF-альфа delVal1 delPro12, и который отдельно кодирует CD19-специфичный CAR с шарниром IgG1, DAP12 и CD3-зета, и который отдельно кодирует IL15, является следующий:

[0122]

AATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTT  
 TGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGG  
 AACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCT  
 GCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGAT  
 ATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGA  
 TCGGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCA  
 AGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGTTCTCGCT  
 TCTGTTTCGCGCGCTTATGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTC  
 GGGGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACC  
 CTCTTGCAAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCCCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAG  
 TGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCATTTGGGGGCTCGTCCGGGATCGGGAG  
 ACCCCTGCCAGGGACCACCGACCCACCACCGGGAGGTAAGCTGGCCAGCAACTTA  
 TCTGTGTCTGTCCGATTGTCTAGTGTCTATGACTGATTTTATGCGCCTGCGTCGGTAC  
 TAGTTAGCTAACTAGCTCTGTATCTGGCGGACCCGTGGTGGAACTGACGAGTTCGGA  
 ACACCCGGCCGCAACCCTGGGAGACGTCCAGGGACTTCGGGGGCCGTTTTTGTGG  
 CCCGACCTGAGTCCTAAAATCCCGATCGTTTAGGACTCTTTGGTGCACCCCCCTTAG  
 AGGAGGGATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGAGAACCTAAAACAGTTCCTCCGCTCCG  
 TCTGAATTTTTGCTTTCGGTTTGGGACCGAAGCCGCGCCGCGCGTCTTGTCTGCTGCA  
 GCATCGTTCTGTGTTGTCTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTATTTGTCTGAAAATATGGG  
 CCCGGGCTAGCCTGTTACCACTCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCAGTGGAAAGATGT  
 CGAGCGGATCGTCAACAACAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTACCT  
 TCTGCTCTGCAGAATGGCCAACCTTTAACGTCGGATGGCCGCGAGACGGCACCTTTA  
 ACCGAGACCTCATCACCCAGGTTAAGATCAAGGTCTTTTCACCTGGCCCGCATGGAC  
 ACCCAGACCAGGTGGGGTACATCGTGACCTGGGAAGCCTTGGCTTTTGACCCCCCTC  
 CCTGGGTCAAGCCCTTTGTACACCCTAAGCCTCCGCTCCTCTTCCCTCCATCCGCCCC  
 GTCTCTCCCCCTTGAACCTCCTCGTTCGACCCCGCCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCC  
 CTCACCTCCTTCTCTAGGCGCCCCCATATGGCCATATGAGATCTTATATGGGGCACCC  
 CCGCCCCTTGTAACCTCCCTGACCCTGACATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCT  
 CTCCAAGTCACTTACAGGCTCTCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTG  
 GCGGCAGCCTACCAAGAACAACCTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGT  
 CGGCGACACAGTGTGGGTCCGCCGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGA  
 AAGGACCTTACACAGTCCTGCTGACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATC  
 GCAGCTTGGATACACGCCGCCACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATC  
 CTCTAGACTGCCATGCTCGAGATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCT

GGCCGAGGAGGCGCTCCCCAAGAAGACAGGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGC  
TTGTTCCCTCAGCCTCTTCTCCTTCCTGATCGTGGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTGCC  
TGCTGCACTTTGGAGTGATCGGCCCCAGAGGGAAGAGTTCCCCAGGGACCTCTCTC  
TAATCAGCCCTCTGGCCCAGGCAAGATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAGGTAG  
CCCATGTTGTAGCAAACCCTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGG  
GCCAATGCCCTCCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGCTGGTGGTGCC  
ATCAGAGGGCCTGTACCTCATCTACTCCCAGGTCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCC  
CTCCACCCATGTGCTCCTCACCCACACCATCAGCCGCATCGCCGTCTCCTACCAGAC  
CAAGGTCAACCTCCTCTCTGCCATCAAGAGCCCCTGCCAGAGGGAGACCCAGAGG  
GGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTG  
GAGAAGGGTGACCGACTCAGCGCTGAGATCAATCGGCCCGACTATCTCGACTTTGC  
CGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTGTCGCGAGCCGAGGGCAGGG  
GAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGGAGTTTGGG  
CTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGCTCTAGAGACATCC  
AGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCA  
GTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCA  
GATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCA  
TCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTG  
GAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACG  
TTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG  
TGTTTCTGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGAGGTGCAGCTGCAGCAGT  
CTGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTACATGCACTGTCTCAG  
GGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAAGCTGGATTCCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTC  
TGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTC  
AAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAAT  
GAACAGTCTGCAAACCTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTA  
CGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACTGTCTCCTC  
GTACGTCACTGTCTCTTACAGGATCCCGCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCA  
CACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCACTCTTCTCCTCTT  
CCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT  
GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG  
GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC  
GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG  
AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATC  
TCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCG  
GGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC  
CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACACTACAA  
GACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAC  
CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG  
AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAAAA

GATCCCAAATTTTGGGGCGTGCTGGCCGGAATCGTGATGGGGCGACCTGGTGCTGAC  
AGTGCTGATCGCCCTGGCTGTGTACTTCCTGGGCAGACTGGTGCCCAGAGGAAGAG  
GCGCTGCCGAAGCCGCCACCCGGAAGCAGAGAATCACCGAGACAGAGAGCCCCTAT  
CAGGAACTGCAGGGCCAGCGGAGCGACGTGTACAGCGACCTGAATACCCAGCGGCC  
CTACTACAAACGCGGACC GCAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGAGA  
TGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCATCA  
GCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCACTTCCTGACCGAGGCCGGA  
TCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGGACTGCCCAAGACCGAGGCCAACT  
GGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCAC  
ATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCACCCCAGCTGCAAGGTGACCGC  
CATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACCTGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCGGGCAGCCCA  
GCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGC  
AACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAAGAGAAGA  
ACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTCATCAACACCA  
GCTGACAATTGCGCGTCATCATCGATCCGGATTAGTCCAATTTGTTAAAGACAGGAT  
ATCAGTGGTCCAGGCTCTAGTTTTGACTCAACAATATCACCGCTGAAGCCTATAGA  
GTACGAGCCATAGATAAAAATAAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAA  
TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGG  
CATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGAT  
GGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGG  
CTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGG  
TAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGTCC  
AGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTG  
AAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGC  
GCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGGGGCGCCA  
GTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCCTCTTGCAG  
TTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCCCTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACT  
ACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCACACATGCAGCATGTATCAAATAAATTTGGTTTTT  
TTTCTTAAGTATTTACATTAATGGCCATAGTACTTAAAGTTACATTGGCTTCCTTGA  
AATAAACATGGAGTATTCAGAATGTGTGCATAAATATTTCTAATTTTAAGATAGTATC  
TCCATTGGCTTTCTACTTTTTCTTTATTTTTTTTTTGTCCTCTGTCTTCCATTTGTTGTT  
GTTGTTGTTTGTGTTGTTGTTGTTGGTTGGTTGGTTAATTTTTTTTTTAAGATCCTAC  
ACTATAGTTCAAGCTAGACTATTAGCTACTCTGTAACCCAGGGTGACCTTGAAGTCA  
TGGGTAGCCTGCTGTTTTAGCCTTCCCACATCTAAGATTACAGGTATGAGCTATCATT  
TTTGGTATATTGATTGATTGATTGATTGATGTGTGTGTGTGATTGTGTTTGTGTGT  
GTGACTGTGAAAATGTGTGTATGGGTGTGTGTGAATGTGTGTATGTATGTGTGTGTG  
TGAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCATGTGTGTGTGTGTGACTGTGTCTATGTGTATGAC  
TGTTGTGAAAAAT  
ATTCTATGGTAGTGAGAGCCAACGCTCCGGCTCAGGTGTCAGGTTGGTTTTTGAGAC  
AGAGTCTTCACTTAGCTTGAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGG

GAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGC  
TGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCT  
GAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTT  
ACACCGCATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCA  
GCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGC  
ATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTT  
ACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATA  
GGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAA  
TGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTC  
ATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG  
TATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGCGGCATTTTGCCTTCCTGTT  
TTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA  
CGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGC  
CCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTA  
TTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCCGCATAACTATTCTCAG  
AATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGAC  
AGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACT  
TACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGG  
GGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCA  
AACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAAC  
ATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGA  
GGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTTAT  
TGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGG  
GCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAA  
CTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCAT  
TGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATT  
TTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCC  
CTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT  
CTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACC  
GCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTTTTTTCCGAAGGT  
AACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTT  
AGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACTCGCTCTGCTAATCCT  
GTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAG  
ACGATAGTTACCGGATAAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACAC  
AGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTA  
TGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCG  
GCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTA  
TCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTTGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGC  
TCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTT  
CCTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTG

TGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATAACCGCTCGCCGCAGCCGAACGA  
 CCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACC  
 GCCTCTCCCCGCGCGTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGA  
 CTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGG  
 CACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCG  
 GATAACAATTTACACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGCTCTT  
 AGGAGTTTCTAATACATCCCAAACAAATATATAAAGCATTTGACTTGTTCTATG  
 CCCTAGGGGGCGGGGGGAAGCTAAGCCAGCTTTTTTTAACATTTAAAATGTTAATTC  
 CATTTTAAATGCACAGATGTTTTTATTTTATAAGGGTTTCAATGTGCATGAATGCTGC  
 AATATTCCTGTTACCAAAGCTAGTATAAATAAAAAATAGATAAACGTGGAAATTA  
 AGAGTTTCTGTCATTAACGTTTCTTCTCAGTTGACAACATAAATGCGCTGCTGAG  
 CAAGCCAGTTTGCATCTGTCAGGATCAATTTCCATTATGCCAGTCATATTAATTA  
 AGTCAATTAGTTGATTTTTTATTTTTGACATATACATGTG (SEQ ID NO:16).

[0123] Одним примером аминокислотной последовательности для вектора, который кодирует мутант TNF-альфа delVal1 delPro12, и который отдельно кодирует CD19-специфичный CAR с шарниром IgG1, DAP12 и CD3-зета, и который отдельно кодирует IL15, является следующий:

[0124]

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSLIVAGATTLFCLLHFGVI  
 GPQREEFPRDLSLISPLAQARSSRTPSDKVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGV  
 ELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKQGQCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQ  
 RETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIALSRAEG  
 RGSLLTCGDVEENPGPMEFGLSWLFLVAILKGVQCSRDIQMTQTSSLSASLGDRVTISC  
 RASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI  
 ATYFCQQGNTLPYTFGGGKLELKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGPGLV  
 APSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLLTIKD  
 NSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTTVTVSSYVTVSSQDP  
 AEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF  
 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI  
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
 KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD  
 PKFWGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYQELQ  
 GQRSDVYSDLNTQRPYYKRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRR  
 GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTA  
 TKDITYDALHMQUALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKPHLRSISIQCYLCLLN  
 SHFLTEAGIHVFI LGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC  
 KVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNI  
 KEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ IDNO: 37)

[0125] **V. Клетки**

[0126] Варианты осуществления настоящего изобретения охватывают клетки,

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

[0127] Клетки по настоящему изобретению могут относиться к любому типу, включая по меньшей мере Т-клетки, НК-клетки, iNKT-клетки, макрофаги, В-клетки, MSC или стволовые клетки любого типа, включая по меньшей мере гемопоэтические стволовые клетки, плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки или эмбриональные стволовые клетки.

[0128] Клетки могут быть получены от индивидуума непосредственно или могут быть получены из депозитория или другого хранилища. Клетки в качестве терапии могут быть аутологичными или аллогенными по отношению к индивидууму, который получает клетки в качестве терапии.

[0129] Клетки могут быть получены от индивидуума, нуждающегося в терапии заболевания, и после их модификации для экспрессии мутанта TNF-альфа и продукта терапевтического гена (с использованием стандартных методик трансдукции и размножения для адаптивной клеточной терапии, например), они могут быть введены индивидууму, от которого они были изначально получены. В некоторых случаях клетки хранят для последующего использования у индивидуума или другого индивидуума.

[0130] Клетки, которые несут один или более сконструированных рецепторов и которые может быть необходимо элиминировать с помощью резидентного суицидного гена TNF-альфа, могут быть любого типа. В конкретных вариантах осуществления клетки являются иммунными клетками или стволовыми клетками, включая, например, клетки, которые используются для адаптивной клеточной терапии. Иммунные клетки могут представлять собой Т-клетки, НК-клетки, NKT-клетки, iNKT-клетки, В-клетки и т.п. Клетки могут состоять из популяции клеток, и эта популяция может иметь большинство, которое трансдуцировано одним или несколькими суицидными мутантными генами TNF-альфа или обоими из одного или более сконструированных рецепторов и одного или более суицидных мутантных генов TNF-альфа. Клеточная популяция может содержать 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% клеток, которые трансдуцированы одним или несколькими суицидными мутантными генами TNF-альфа и, необязательно, одним или несколькими сконструированными

рецепторами. Мутант (мутанты) TNF-альфа и сконструированный рецептор (рецепторы) представляют собой отдельные полипептиды.

[0131] Клетки могут продуцироваться суицидным мутантным геном TNF-альфа с целью их модульного использования для конкретной цели. Например, могут быть получены клетки, в том числе для коммерческого распространения, экспрессирующие мутант TNF-альфа (или распространяться в виде нуклеиновой кислоты, которая кодирует мутант для последующей трансдукции), и пользователь может модифицировать их для экспрессии одного или более интересующих терапевтических генов в зависимости от предполагаемой цели (целей). В качестве только одного примера, индивидуум, которому необходимо лечение CD5-положительного рака, может получать или генерировать экспрессирующие TNF-альфа клетки и модифицировать их для экспрессии CAR, содержащего CD5-специфический scFv. В альтернативном варианте, индивидуум, заинтересованный в лечении CD5-положительного рака, может получить трансдуцируемые клетки, получить вектор, который кодирует мутант TNF-альфа, и модифицировать вектор также для кодирования CD5-специфического CAR с последующей трансдукцией клеток. Любой из этих вариантов может быть применен к любому другому раковому антигену помимо CD5.

[0132] В конкретных вариантах осуществления геном трансдуцированных клеток, экспрессирующих мутант TNF-альфа, может быть модифицирован. Геном может быть модифицирован любым способом, но в конкретных вариантах осуществления геном модифицируют, например, с помощью методики редактирования генов CRISPR. Геном клеток может быть модифицирован для повышения эффективности мутанта TNF-альфа в качестве суицидного гена, для повышения эффективности использования продукта терапевтического гена или для другой цели. Конкретные примеры генов, которые могут быть модифицированы в клетках, включают следующее: нокаут ADAM13/TACE, повышенную устойчивость экспрессирующих мутант TNF-альфа клеток к микросреде опухоли, такой как TGF-бета-рецептор 1 или 2, IDO, молекулы контрольных точек, такие как PD1, TIGIT, KLGRG1, TIM3 и т.п.

#### [0133] VI. Применение мутантов TNF-альфа в качестве суицидного гена

[0134] В конкретных вариантах осуществления клетки, в которых используют мутантный ген TNF-альфа, представляют собой клетки, которые обладают вредоносным потенциалом, например, для индивидуума, подвергающегося воздействию клеток *in vivo*. Клетки могут быть токсичными для индивидуума при доставке или после нее, и поэтому потребность в возможности уничтожения клеток может быть постоянно представлена в клетках. Например, в любом типе клеточной терапии для использования у индивидуума *in vivo* могут использоваться раскрытые мутанты TNF-альфа в клетках, позволяя при желании завершить клеточную терапию. Клеточная терапия может стать объектом для применения суицидного мутантного гена TNF-альфа, когда у индивидуума, получающего клеточную терапию и/или получившего клеточную терапию, наблюдается один или более побочных эффектов, таких как синдром высвобождения цитокинов, нейротоксичность,

анафилаксия/аллергия и/или внеопухолевая токсичность (в качестве примеров), или у него подозревают неизбежный риск возникновения одного или более симптомов. Применение мутанта TNF-альфа в качестве суицидного гена может быть частью запланированного протокола для терапии или может применяться только при возникновении потребности в его использовании. В некоторых случаях клеточная терапия заканчивается с помощью использования агента (агентов), мишенью которых является суицидный ген TNF-альфа, поскольку терапия больше не требуется.

[0135] В конкретных вариантах осуществления изобретения, клетки, для которых используют суицидный ген TNF-альфа, могут представлять собой клетки, сконструированные для клеточной терапии для млекопитающих. В таких случаях клеточная терапия может относиться к любому типу, и клетки могут быть любого типа. В конкретных вариантах осуществления клетки являются иммунными клетками или стволовыми клетками, которые были сконструированы для экспрессии одного или более продуктов терапевтических генов. В конкретных вариантах осуществления клетки представляют собой клетки, которые трансдуцируют одним или несколькими сконструированными рецепторами для клеток. Сконструированные рецепторы могут придавать терапевтические свойства клеткам за счет направленного взаимодействия, например, путем связывания, лиганда с рецептором. В конкретных вариантах осуществления изобретения сконструированный рецептор является неприродным и может быть создан человеком. Сконструированный рецептор может быть любого типа, включая Т-клеточный рецептор, химерный антигенный рецептор (CAR), хемокиновый рецептор, цитокиновый рецептор, хоминговый рецептор, генно-редактированные клетки или их комбинацию. Например, сконструированные рецепторы могут быть сконструированы таким образом, чтобы они могли связывать, в качестве мишени, специфичный антиген, включая по меньшей мере опухолевый антиген. Сконструированные рецепторы могут быть биспецифичными или мультиспецифичными для более чем одного антигена, в некоторых случаях позволяя трансдуцированным клеткам связываться через сконструированный рецептор с клетками, которые экспрессируют множественные антигены.

[0136] В конкретных вариантах осуществления при доставке эффективного количества одного или более агентов для связывания с клетками, экспрессирующими TNF-альфа, большинство клеток, экспрессирующих мутант TNF-альфа, удаляют. В конкретных вариантах осуществления изобретения у индивидуума удаляется более чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% клеток, экспрессирующих мутанты TNF-альфа. После распознавания необходимости удаления клеток доставка агента (агентов) индивидууму может продолжаться до исчезновения одного или более побочных эффектов или до тех пор, пока не будет удалено достаточное количество клеток. Число клеток у индивидуума можно контролировать с использованием мутантов TNF-альфа в качестве маркеров.

[0137] Варианты осуществления способов по настоящему изобретению могут

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

[0138] В дополнительных вариантах осуществления введение одного или более агентов, которые связываются с несекретируемым TNF-альфа во время высвобождения цитокинов или нейротоксичности, например, имеет дополнительное преимущество нейтрализации высоких уровней растворимого TNF-альфа, которые вносят вклад в токсичность терапии. Растворимый TNF-альфа высвобождается на высоком уровне во время синдрома высвобождения цитокинов и является медиатором токсичности при использовании CAR-T-клеточной терапии. В таких случаях введение анти-TNF-альфа антител, охватываемых в настоящем изобретении, имеет двойное благотворное действие, а именно селективное уничтожение клеток, экспрессирующих мутант TNF-альфа, а также нейтрализацию растворимого TNF-альфа, вызывающего токсичность. Таким образом, варианты осуществления настоящего изобретения охватывают способы устранения или уменьшения тяжести синдрома высвобождения цитокинов у индивидуума, который получает, или который получил адаптивную клеточную терапию, в которой клетки экспрессируют несекретируемый мутант TNF-альфа, включающие в себя стадию введения эффективного количества агента, который связывается с несекретируемым мутантом TNF-альфа, причем указанный агент вызывает у индивидуума: (а) удаление по меньшей мере некоторых из клеток клеточной терапии; и (б) снижение уровня растворимого TNF-альфа.

[0139] Варианты осуществления настоящего изобретения включают способы снижения эффектов синдрома высвобождения цитокинов у индивидуума, который

получил или получает клеточную терапию клетками, которые экспрессируют несекретируемый мутант TNF-альфа, включающие в себя стадию введения эффективного количества одного или более агентов, которые связываются с мутантом, чтобы вызвать у индивидуума: (a) удаление по меньшей мере некоторых из клеток клеточной терапии; и (b) снижение уровня растворимого TNF-альфа

[0140] При возникновении необходимости в применении суицидного гена TNF-альфа, индивидууму вводят эффективное количество одного или более ингибиторов, которые способны ингибировать, например, напрямую связывание мутанта TNF-альфа на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления ингибитор (ингибиторы) может вводиться индивидууму системно и/или местно. Ингибитор может представлять собой полипептид (такой как антитело), нуклеиновую кислоту, низкомолекулярное соединение (например, производное ксантина), пептид или их комбинацию. В конкретных вариантах осуществления антитела являются одобренными FDA (FDA). Когда ингибитором является антитело, ингибитор может представлять собой моноклональное антитело по меньшей мере в некоторых случаях. Когда используются смеси антител, одно или несколько антител в смеси могут представлять собой моноклональное антитело. Примеры низкомолекулярных ингибиторов TNF-альфа включают низкомолекулярные соединения, такие как описанные в патенте США 5118500, который в полном объеме включен в данное описание в качестве ссылки. Примеры полипептидных ингибиторов TNF-альфа включают полипептиды, такие как полипептиды, описанные в патенте США № 6143866, который в полном объеме включен в данное описание в качестве ссылки.

[0141] В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере одно антитело используют для направленного воздействия на мутант TNF-альфа для запуска его активности в качестве суицидного гена. Примеры антител включают по меньшей мере Адалимумаб, Адалимумаб-atto, Цертолизумаб-пегол, Этанерсепт, Этанерсепт-szzs, Голимумаб, Инфликсимаб, Инфликсимаб-duyb или их смесь.

[0142] Варианты осуществления настоящего изобретения включают способы снижения риска токсичности клеточной терапии для индивидуума путем модификации клеток клеточной терапии для экспрессии несекретируемого мутанта TNF-альфа. Клеточная терапия предназначена для лечения рака, в конкретных вариантах осуществления, и она может содержать сконструированный рецептор, направленный на антиген, включая раковый антиген.

[0143] В конкретных вариантах осуществления, в дополнение к предлагаемой в изобретении клеточной терапии по настоящему изобретению, индивидуум может получать в прошлом, может получать в настоящем и/или он может получать в будущем дополнительную терапию заболевания. В случаях, когда заболевание представляет собой рак, индивидууму может получить одно или несколько из хирургической операции, облучения, иммунотерапии (отличной от клеточной терапии по настоящему изобретению), гормональной терапии, генной терапии, химиотерапии и т.п.

[0144] В тех случаях, когда человек, получающий лечение с помощью клеточной

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

**[0146] VII. Наборы по настоящему изобретению**

[0146] Любая из описанных в настоящем изобретении композиций может содержаться в наборе. В неограничивающем примере клетки, реагенты для получения клеток, векторы и реагенты для получения векторов и их компонентов могут быть включены в набор. В некоторых вариантах осуществления изобретения альфа-бета-T-клетки, гамма-дельта-T-клетки, NK-клетки, NKT-клетки, iNKT-клетки, В-клетки или стволовые клетки могут быть включены в набор. Такой набор может содержать или нет один или более реагентов для манипуляций с клетками. Например, такие реагенты включают низкомолекулярные соединения, белки, нуклеиновые кислоты, антитела, буферы, праймеры, нуклеотиды, соли и/или их комбинацию. В набор могут быть включены нуклеотиды, которые кодируют один или более мутантов TNF-альфа, сконструированные рецепторы или цитокины. В набор могут быть включены белки, такие как цитокины или антитела, включая моноклональные антитела. В набор могут быть включены нуклеотиды, кодирующие компоненты сконструированных рецепторов, такие как химерные антигенные рецепторы или рецепторы T-клеток, включая реагенты для их создания.

[0147] В конкретных аспектах набор включает клеточную терапию по настоящему изобретению, а также другую терапию рака. В некоторых случаях набор, в дополнение к вариантам осуществления клеточной терапии, также включает вторую раковую терапию, такую как химиотерапия, гормональная терапия и/или иммунотерапия, например. Набор (наборы) может быть адаптирован к конкретному раку для индивидуума и включает соответствующие вторые способы лечения рака для индивидуума.

[0148] Наборы могут включать подходящие аликвоты композиций по настоящему изобретению. Компоненты наборов могут быть упакованы либо в водной среде, либо в лиофилизированной форме. Средства упаковки наборов обычно включают по меньшей мере один флакон, пробирку, колбу, бутылку, шприц или другой контейнер, в который может быть помещен компонент и, предпочтительно, подходящим образом разделен на аликвоты. Когда в наборе присутствует более одного компонента, набор также может обычно содержать второй, третий или другой дополнительный контейнер, в который дополнительные компоненты могут быть помещены отдельно. Однако во флаконе могут содержаться различные комбинации компонентов. Наборы по настоящему изобретению также обычно включают средства для содержания композиции и любых других контейнеров с реагентами в небольшом пространстве для коммерческой продажи. Такие контейнеры могут включать перфорированные или формованные пластиковые контейнеры, в которых содержатся желаемые флаконы.

## ПРИМЕРЫ

[0149] Нижеследующие примеры включены, чтобы продемонстрировать предпочтительные варианты осуществления изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что методы, раскрытые в нижеследующих примерах, представляют методы, обнаруженные изобретателем, как хорошо функционирующие при осуществлении изобретения на практике, и, таким образом, которые могут рассматриваться как составляющие предпочтительные варианты для его применения на практике. Однако специалисты в данной области техники должны в свете настоящего описания принять во внимание, что в конкретные раскрытые варианты осуществления можно внести многочисленные изменения, и все же получить аналогичный или сходный результат, не выходя за рамки сущности и объема изобретения.

### ПРИМЕР 1

#### СУИЦИДНЫЙ ГЕН TNF-АЛЬФА

[0150] Настоящее изобретение относится к маркерной молекуле и суицидной молекуле для клеточной терапии на основе нерасщепляемых мутантов фактора некроза опухоли альфа 26 кД (TNF- $\alpha$ ), который обычно процессируется до компонента 17 кД. У этого подхода есть ряд преимуществ. На фиг.1 показан пример экспериментального плана по мутагенезу TNF-альфа для удаления участков мембранного расщепления. Как описано у Perez *et al.* (1990), правая панель на фиг.1 иллюстрирует три типичных мутанта TNF-альфа, которые делают мутантный TNF-альфа нерасщепляемым: (1) делеция аминокислотных остатков 1-12 TNF 17 кД; (2) делеция аминокислотных остатков 1 и 12 TNF 17 кД; и (3) делеция аминокислотных остатков 1 и 13 TNF 17 кД. В левой панели фиг. 1 представлены примеры праймеров для сайт-направленного мутагенеза в качестве примера для создания мутантов.

[0151] На фиг.2A, 2B, 2C, 2D и 2E представлены примеры векторов, которые могут кодировать мутанты TNF-альфа. На фиг.2A показан пример векторной карты мутанта TNF-альфа, имеющего делеции аминокислот Val11 и Pro12, и, например, этот мутант коэкспрессируется с CD19-специфичным CAR, а также коэкспрессируется с IL-15, все в виде отдельных полипептидов. На фиг. 2B показан пример векторной карты мутанта TNF-альфа, имеющего делецию валина 13, и, например, этот мутант отдельно коэкспрессируется с CD19-специфичным CAR и отдельно коэкспрессируется с IL-15. На фиг.2C пример векторной карты мутанта TNF-альфа, имеющего делеции аминокислот Val11 и Val13, и, например, мутант отдельно коэкспрессируется с CD19-специфичным CAR и IL-15. На фиг.2D показан пример векторной карты мутанта TNF-альфа, имеющего делеции аминокислот от Val11 до Val13 (делеция 13 аминокислот), и, например, мутант отдельно коэкспрессируется с CD19-специфичным CAR и IL-15. На фиг.2E показан пример векторной карты мутанта TNF-альфа, имеющего делеции аминокислот от Ala -1 до Val13 (делеция 14 аминокислот), и, например, мутант отдельно коэкспрессируется с CD19-специфичным CAR и IL-15.

[0152] Мутированный нерасщепляемый TNF-альфа (в клетках, трансдуцированных

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

[0153] Клетки, экспрессирующие нерасщепляемые мутанты TNF- $\alpha$ , могут стать мишенью для селективной элиминации с использованием одобренных FDA антител против TNF- $\alpha$  (например), таких как этанерцепт, инфликсимаб или адалилумаб. Фиг.4А иллюстрирует примеры антител против TNF. На фиг.4В продемонстрировано, что более 70% NK-клеток, экспрессирующих мутантный TNF-альфа, элиминируются за счет комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) в течение 90 минут после обработки инфликсимабом.

[0154] На фиг.5А продемонстрировано, что в ответ на мишени Raji NK-клетки, трансдуцированные вектором, коэкспрессирующим мутант TNF-альфа и CD19-специфичный CAR, продуцируют больше эффекторных цитокинов и дегранулируются более эффективно по сравнению с NK-клетками, которые экспрессируют только один анти-CD19. На фиг. 5B показано, что мишени Raji эффективно убиваются NK-клетками, трансдуцированными вектором, который отдельно коэкспрессирует мутант TNF-альфа (например, с делецией Val1 и Pro12) и CD19-специфичный CAR. Мутантный белок TNF-альфа с делецией валина в положении 1 и пролина в положении 12 является биологически активным и опосредует сильный противоопухолевый ответ при прямом межклеточном контакте, дополнительно внося вклад в противоопухолевую активность трансдуцированных клеток.

[0155] Трансдуцированные NK-клетки, несущие вектор, который отдельно экспрессирует CD19-специфичный CAR и мутантный TNF-альфа, не проявляют нецелевой активности (фиг.6). На фиг.7 продемонстрировано, что NK-клетки, трансдуцированные вектором, который отдельно экспрессирует CD19-специфичный CAR и мутант TNF-альфа, не проявляют нецелевой активности и не секретируют неспецифично TNF-альфа. На фиг.8 показано, что сайты связывания рецепторов TNF-альфа для TNF-рецепторов 1 и 2 по сравнению с антителами TNF-альфа, инфликсимабом и адалимумабом, различаются. Это демонстрирует, что мутации в гене TNF-альфа не будут отрицательно влиять на способность антител против TNF-альфа распознавать мутантный белок TNF $\alpha$ ; то есть мутант TNF-альфа может по-прежнему использоваться в качестве суицидного гена и быть мишенью для антител.

[0156] Могут быть использованы дополнительные исследования безопасности. Например, можно проводить исследования токсичности *in vivo* на мышах с CD19-специфичными CAR-NK-клетками. Например, в установленной модели Raji на мышах NSG можно сравнить экспрессирующие TNF-альфа WT (дикого типа) и мутантный TNF-альфа, CD19-специфичные CAR-NK-клетки, также экспрессирующие IL15. Однако эти мутанты ранее были протестированы на мышах, и их безопасность была продемонстрирована (Karr *et al.*, 1992).

[0157] Можно использовать синапсные и сигнальные исследования для характеристики взаимодействия мутанта TNF-альфа относительно TNF-альфа дикого типа относительно экзогенного TNF-альфа с TNF-альфа рецептором 1 (TNF-R1) и TNF-альфа рецептором 2 (TNF-R2). Такие исследования могут включать измерение индукции апоптоза и каспаз (сигнальный путь TNF-R1) в клетках Ramos (которые экспрессируют TNFR1, но не TNFR2). Кроме того или в альтернативном варианте, можно измерять NFκаррaB в клетках Jurkat, которые экспрессируют как TNFR2, так и TNFR1.

#### ПРИМЕР 2

#### СРАВНЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК CAR-NK, ТРАНСДУЦИРОВАННЫХ КОНСТРУКЦИЯМИ TNFAMUT-CAR19-IL15 ОТНОСИТЕЛЬНО IC9-CAR19-IL15

[0158] На фиг.11 представлено сравнение противоопухолевой активности клеток CAR-NK из пуповинной крови, трансдуцированных либо конструкцией TNF-alpha mut-CAR19-IL15, либо конструкциями индуцибельной каспазы 9 (iC9)-CAR19-IL15. На фиг. 11A, мыши NSG с опухолью Raji получали  $3 \times 10^6$  CAR-NK-клеток пуповинной крови, трансдуцированных конструкцией TNF-alpha mut-CAR19-IL15 или трансдуцированных конструкцией iC9-CAR19-IL15. На фиг.11B показан процент выживаемости с течением времени. Мыши, трансдуцированные конструкцией TNF-alpha mut-CAR19-IL15, пережили контрольных мышей и мышей, трансдуцированных конструкцией iC9-CAR19-IL15.

#### ССЫЛКИ

[0159] Все патенты и публикации, приведенные в описании, являются показателем уровня специалистов в данной области техники, к которым относятся варианты осуществления изобретения. Все патенты и публикации полностью включены в настоящее описание путем ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была специально и индивидуально указана как включенная в настоящее описание в качестве ссылки.

#### Патенты

[0160] Патент США № 5118500

[0161] Патент США № 6143866

#### Публикации

[0162] Karp, Stephen E., Hwu, Patrick, et al. (1992) In vivo Activity of Tumor Necrosis Factor (TNF) Mutants: Secretory but non Membrane-Bound TNF Mediates the Regression of Retrovirally Tranduced Murine Tumor. *J. Immunol.*, vol. 149(6): 2076-2081.

[0163] Perez, C., Albert, I. *et al.* (1990) A Nonsecretable Cell Surface Mutant of Tumor Necrosis Factor (TNF) Kills by Cell-to-Cell Contact. *Cell*, vol. 63, 251-258.

[0164] Хотя настоящее раскрытие и его преимущества были описаны подробно, следует понимать, что в нем могут быть сделаны различные изменения, замены и изменения без отступления от идеи и объема разработки, определенной прилагаемой формулой изобретения. Кроме того, объем настоящей заявки не ограничивается конкретными вариантами осуществления способа, механизма, изготовления, химического

вещества, средств, способов и стадий, описанных в спецификации изобретения. Как специалист в данной области техники легко поймет из настоящего описания, способы, механизмы, изготовление, химические вещества, средства, способы или стадии, существующие в настоящее время или разработанные позже, которые выполняют по существу ту же функцию или достигают по существу того же результата, что и соответствующие варианты осуществления, описанные в настоящем изобретении, могут быть использованы согласно настоящему изобретению. Соответственно, прилагаемая формула изобретения предназначена для включения в свой объем таких процессов, механизмов, изготовления, химических веществ, средств, способов или стадий.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Вектор, содержащий последовательность, кодирующую несекретируемый мутант TNF-альфа и сконструированный рецептор.

2. Вектор по п.1, где несекретируемый мутантный полипептид TNF-альфа содержит делецию относительно SEQ ID NO:8 следующего: аминокислотного остатка 1 и аминокислотного остатка 12; аминокислотного остатка 1 и аминокислотного остатка 13; аминокислотных остатков 1-12; аминокислотных остатков 1-13; или аминокислотных остатков от -1 до 13.

3. Вектор по п.1 или 2, где вектор представляет собой вирусный вектор или невирусный вектор.

4. Вектор по п.3, где вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор или аденоассоциированный вирусный вектор.

5. Вектор по п.3, где невирусный вектор представляет собой плазмиду, липид или транспозон.

6. Вектор по любому из пп. 1-5, где последовательность вектора, которая кодирует несекретируемый мутант TNF-альфа, и последовательность вектора, которая кодирует сконструированный рецептор, разделены в векторе элементом 2A или элементом IRES.

7. Вектор по п.6, где сконструированный рецептор представляет собой CAR.

8. Вектор по п.6 или 7, где сконструированный рецептор нацелен на раковый антиген.

9. Вектор по любому из пп. 1-8, где вектор дополнительно кодирует цитокин.

10. Вектор по п.9, где цитокин представляет собой IL-7, IL-2, IL-15, IL-12, IL-18 или IL-21.

11. Вектор по п.9 или 10, где цитокин экспрессируется из вектора в виде отдельного полипептида, такого как мутант TNF-альфа и сконструированный рецептор.

12. Применение вектора по любому из пп. 1-11 для лечения рака.

13. Способ индукции гибели трансдуцированной клетки, экспрессирующей сконструированный несекретируемый мутантный полипептид TNF-альфа, включающий стадию предоставления эффективного количества по меньшей мере одного агента, который связывает мутант TNF-альфа на трансдуцированной клетке.

14. Способ по п.13, где агент, связывающий TNF-альфа, представляет собой антитело, малую молекулу, полипептид, нуклеиновую кислоту или их комбинацию.

15. Способ по п.14, где антитело представляет собой моноклональное антитело.

16. Способ по любому из пп. 13-15, где клетка дополнительно экспрессирует сконструированный рецептор.

17. Способ по п.16, где сконструированный рецептор представляет собой рецептор Т-клеток или CAR.

18. Способ по п.16 или 17, где сконструированный рецептор нацелен на раковый антиген.

По доверенности

Праймер дикого типа

TCGAGAAGATGATCTGACTGCCTGGGCCAGAGG

CP 495: Del VAL 1

Мутантный праймер

5' -TCG AGA AGA TGA TCT TGC CTG GGC CAG AGG-:

CP496: Скрининг на Del VAL1

5' -TGA TCT TGC CTG-3'

Праймер дикого типа

TAC AAC ATG GGC TACAGGCTTGTCACTCGGGGT

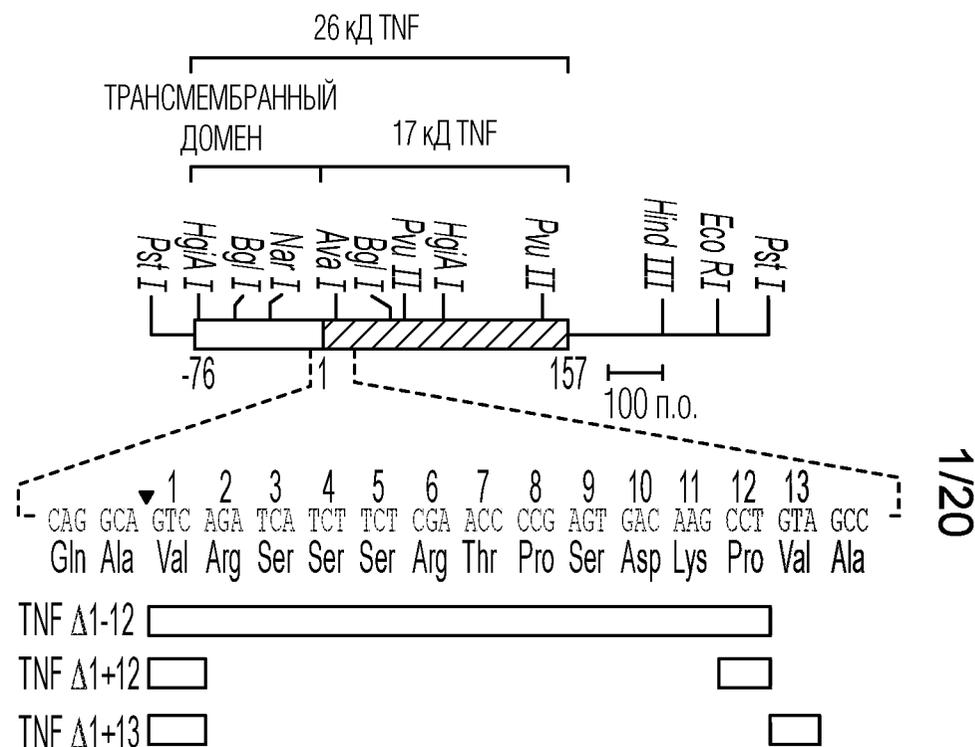
CP 497: Del PRO 12

Мутантный праймер

5' -TAC AAC ATG GGC TAC CTT GTC ACT CGG GGT-3'

CP498: Скрининг на Del PRO 12

5' -GGC TAC CTT GTC-3'



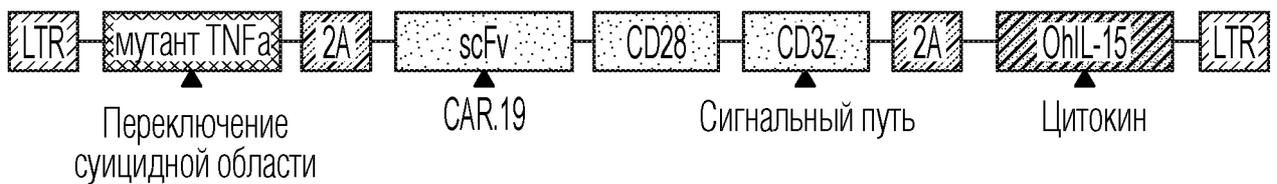
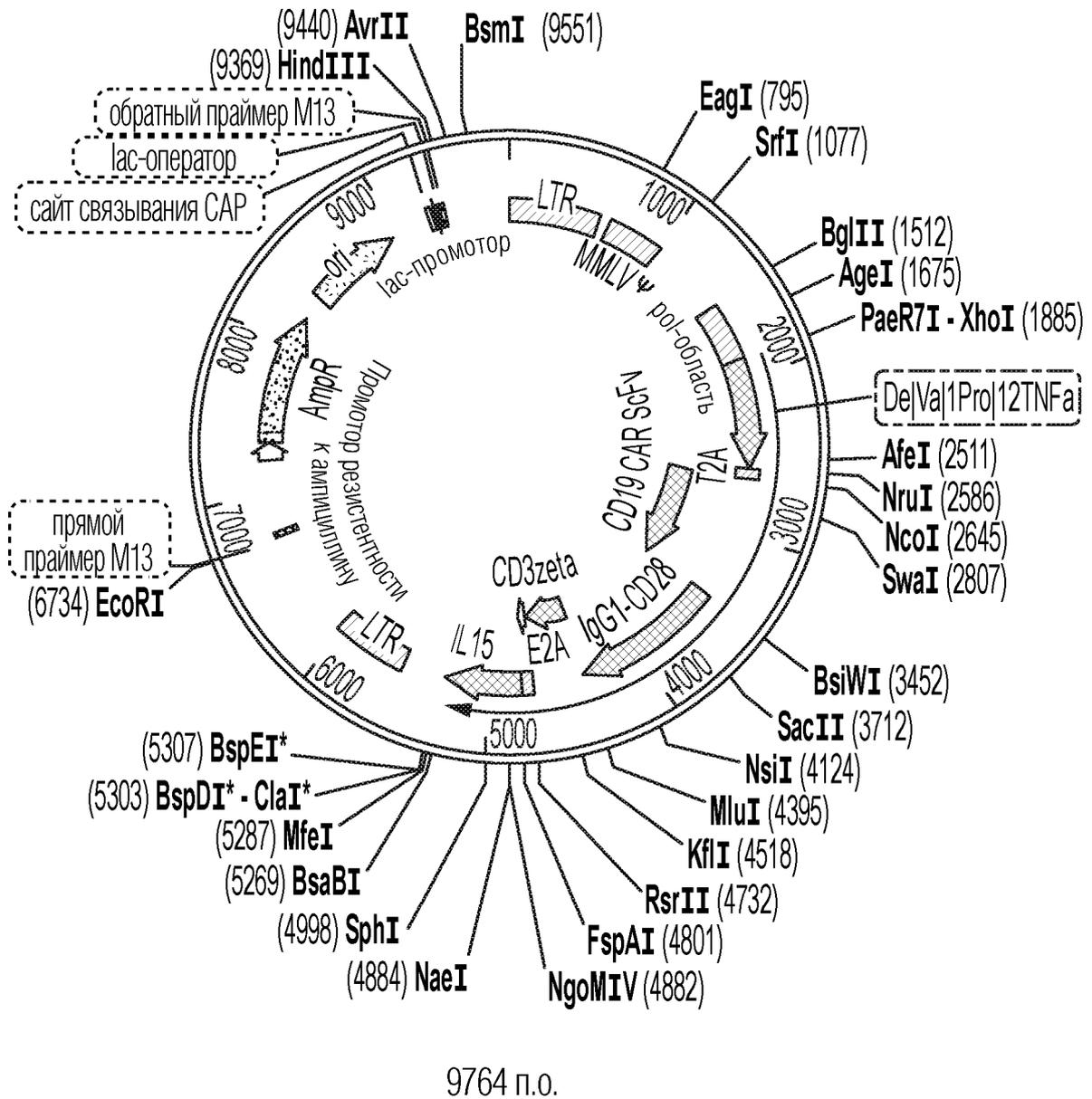
Perez et al., 1990

ФИГ. 1

1/20

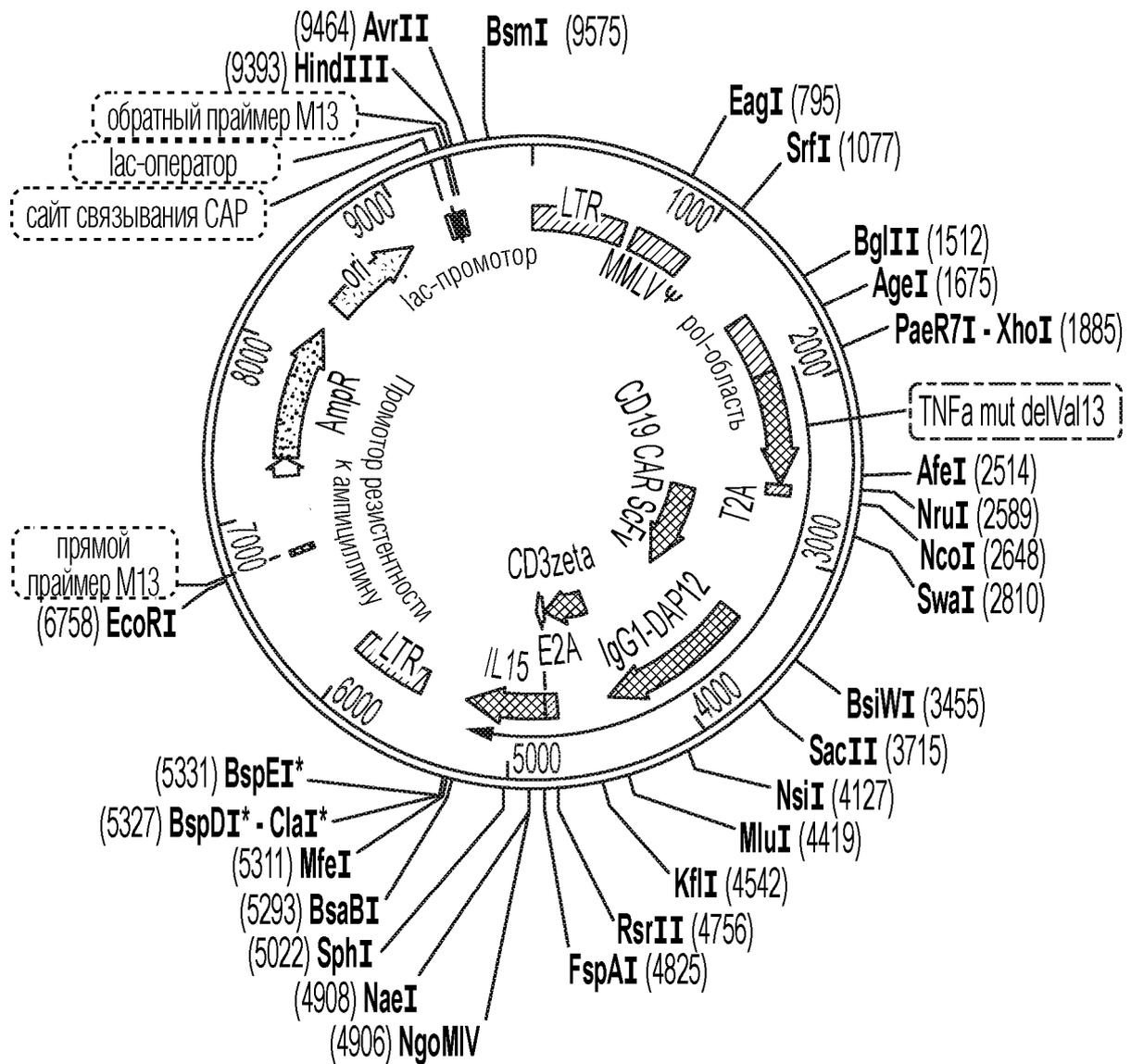
579355

Мутант TNFa delVal1 и delPro12



ФИГ. 2А

## Мутант TNFa delVal13

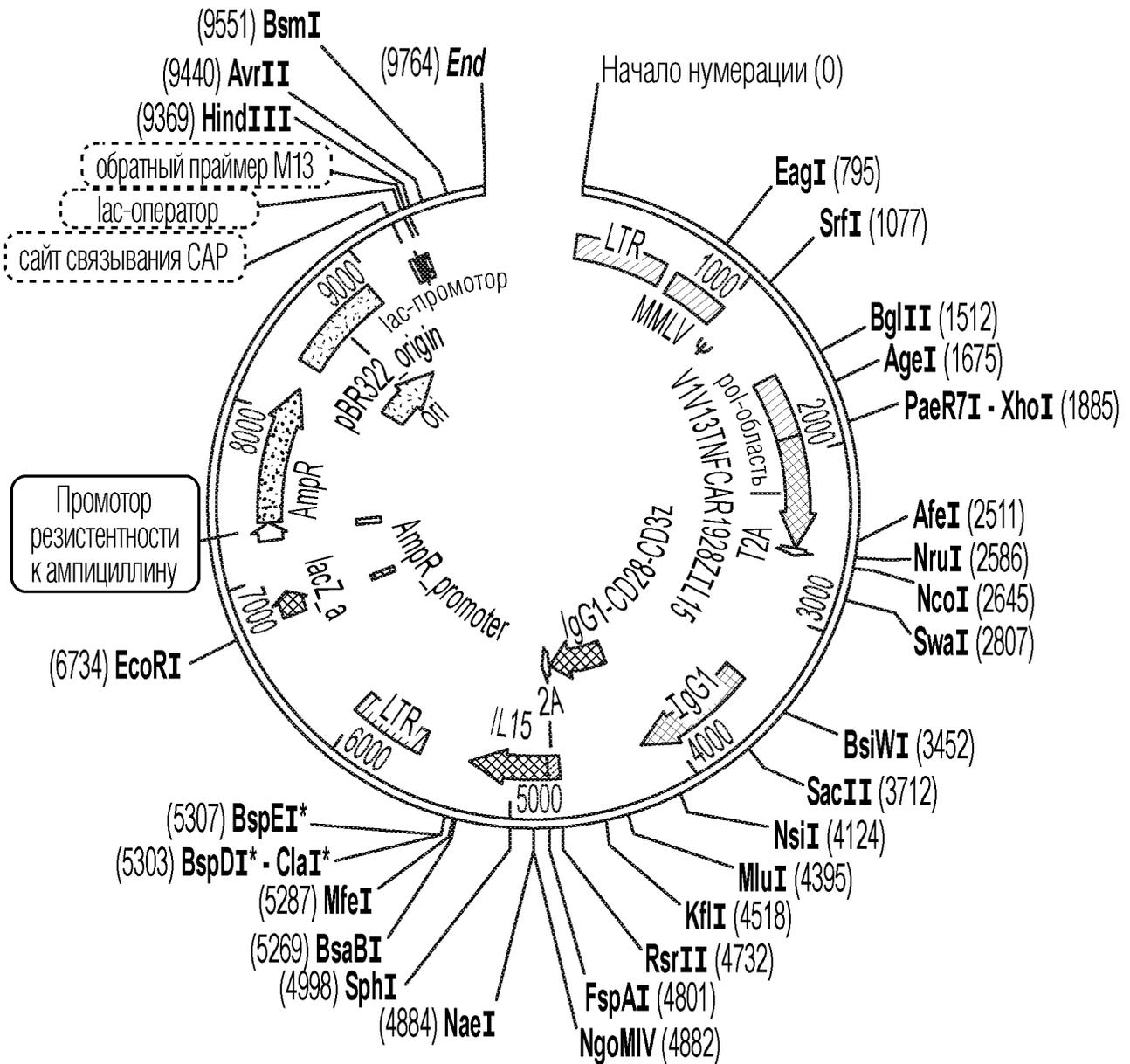


Идентификационный номер конструкции 18ACIQEP-TNFa mut delVAL13 CAR.CD19.IgG1.DAP12.CD3z.IL15

9788 п.о.

ФИГ. 2В

Мутант TNF $\alpha$  delVal13 и delVal13

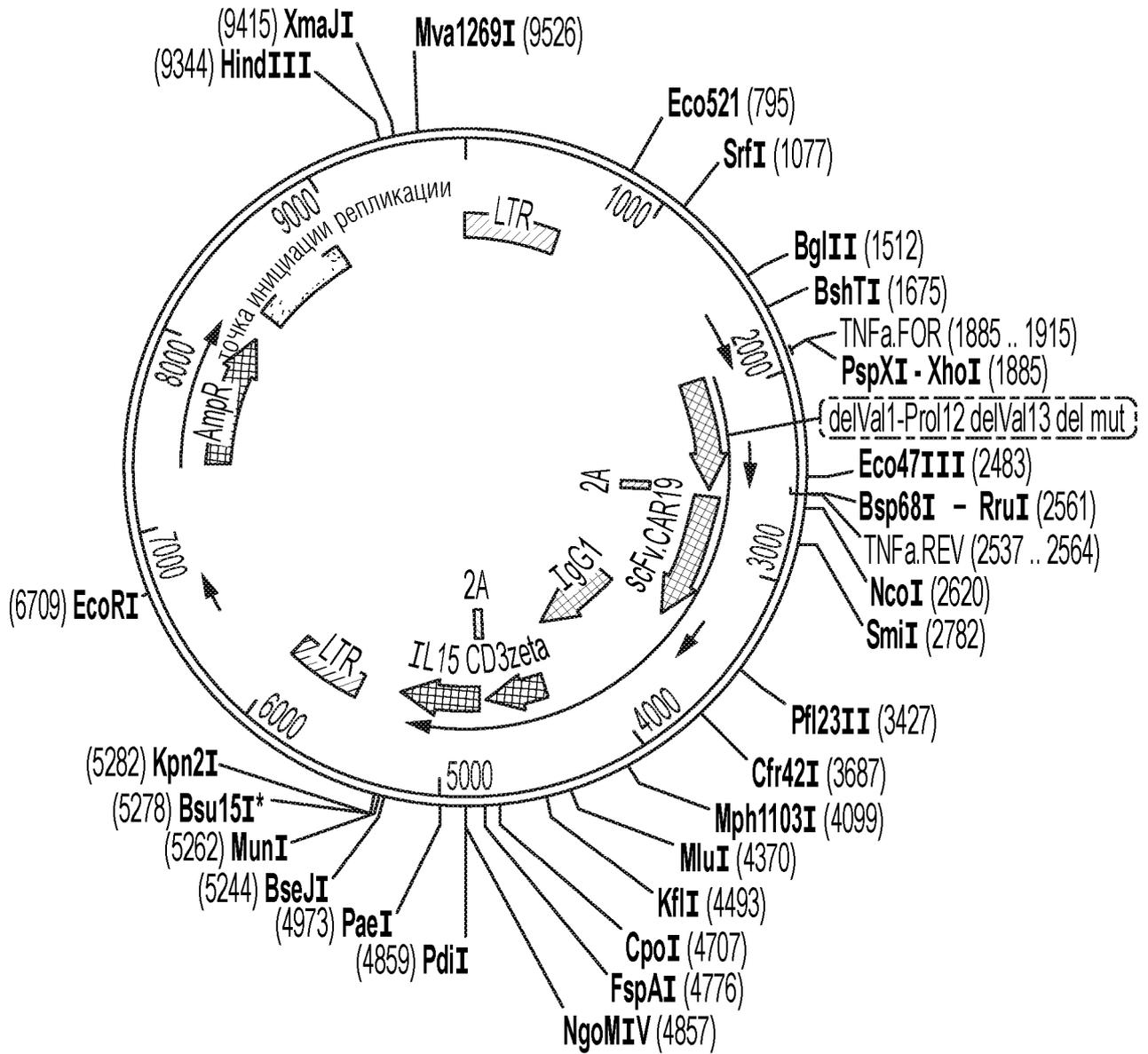


Клонирован V1V13TNFCAR1928ZIL15 (18AC4AZP)

9764 п.о.

ФИГ. 2С

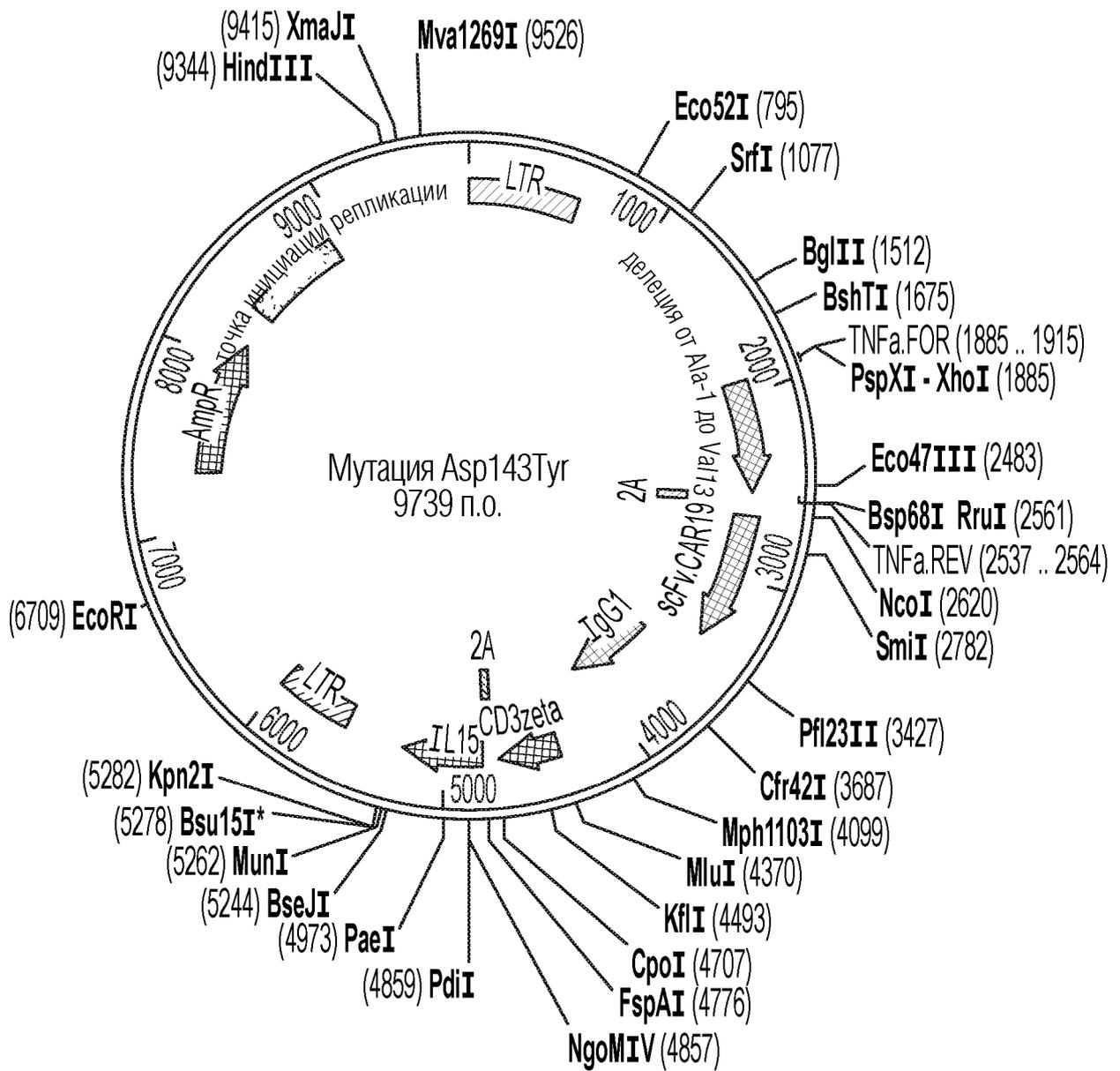
Мутант TNFa delVal1-Pro12delVal13 (удалено 13 ак)



Клонирован Val1Pro12Val13delCAR19IgG128zIL15  
9739 п.о.

ФИГ. 2D

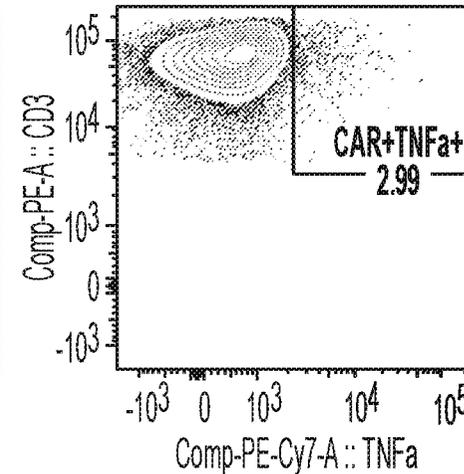
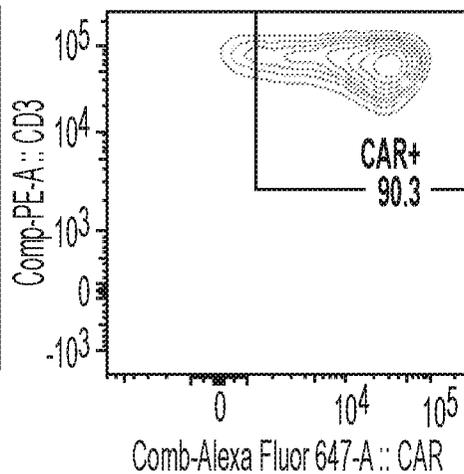
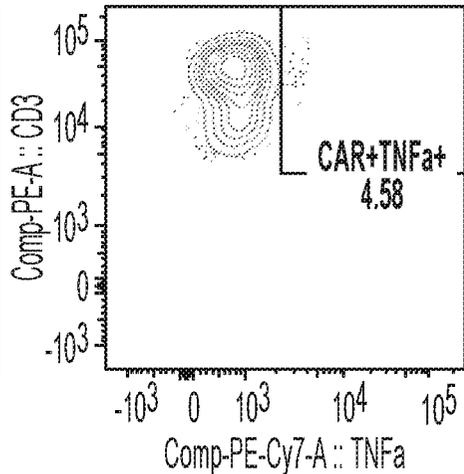
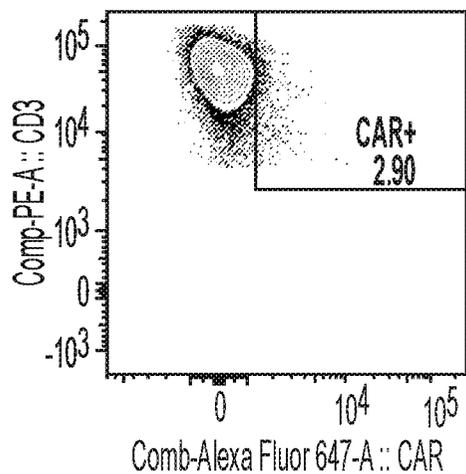
Мутант TNFa delAla-1 - Val13 (удалено 14 ак)



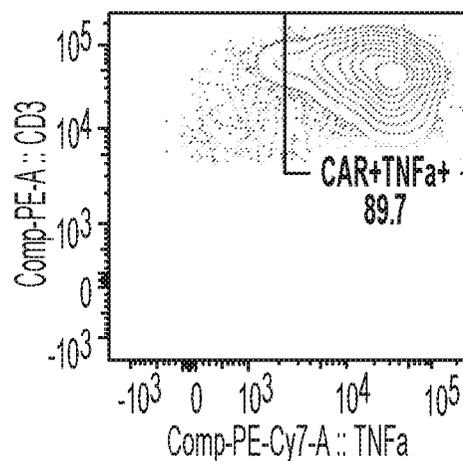
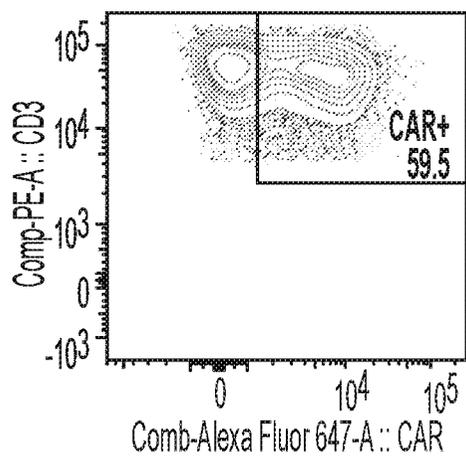
ФИГ. 2Е

Контрольные нетрансдуцированные размноженные NK-клетки

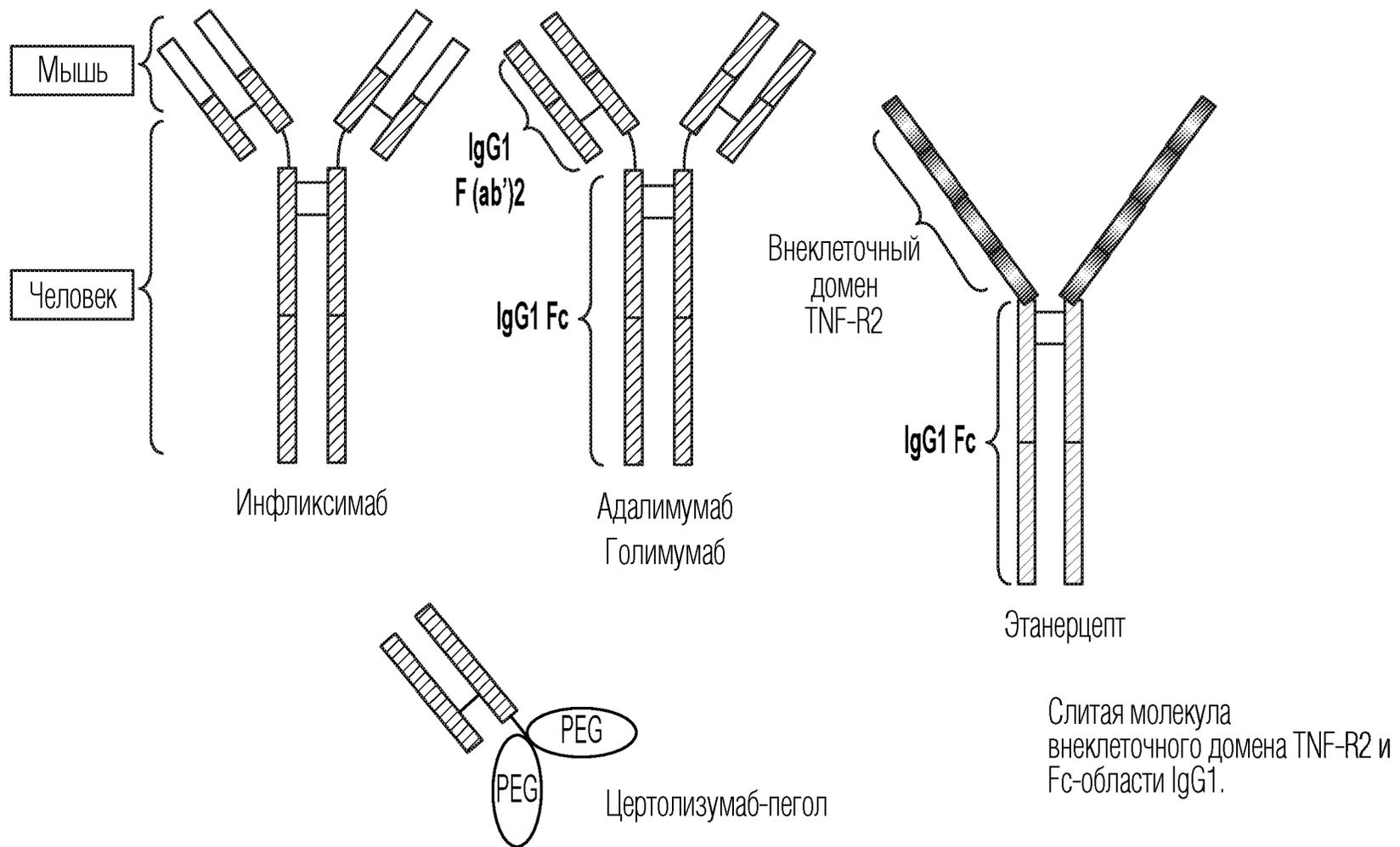
NK-клетки, трансдуцированные CAR19



NK-клетки, трансдуцированные TNFdVal1Pro12CAR19

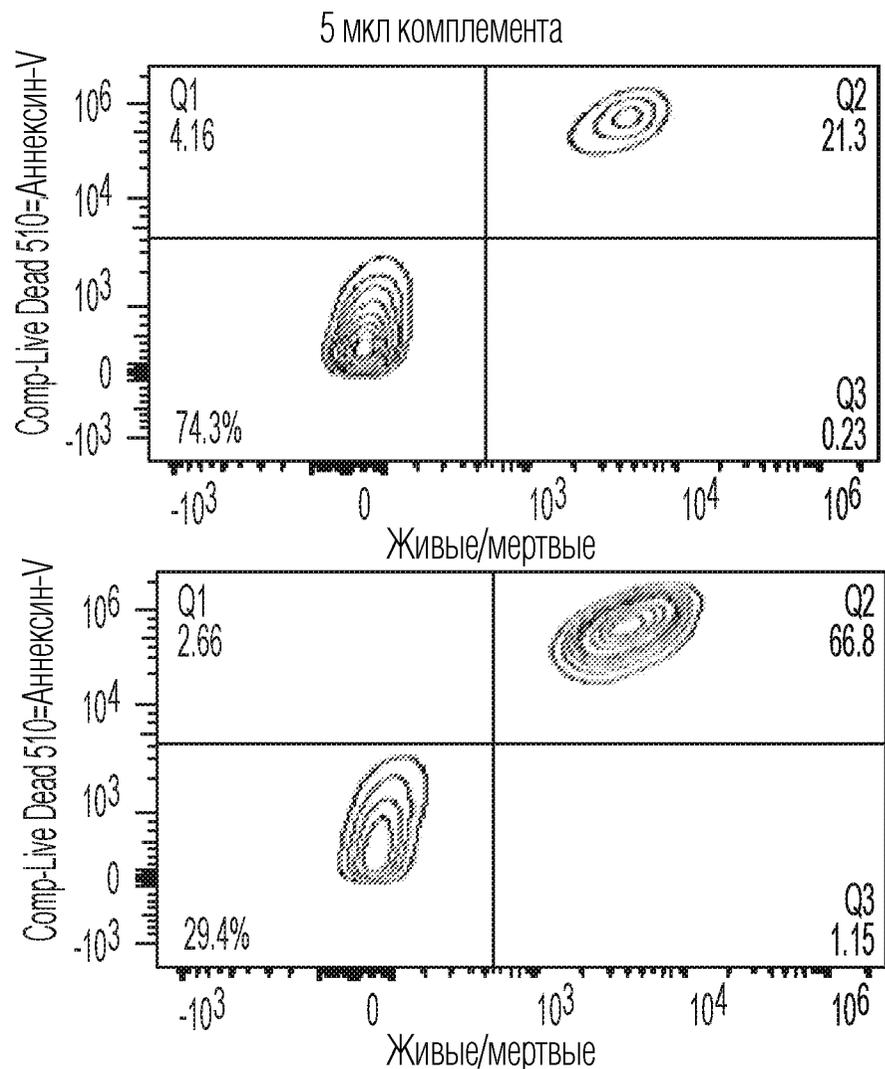
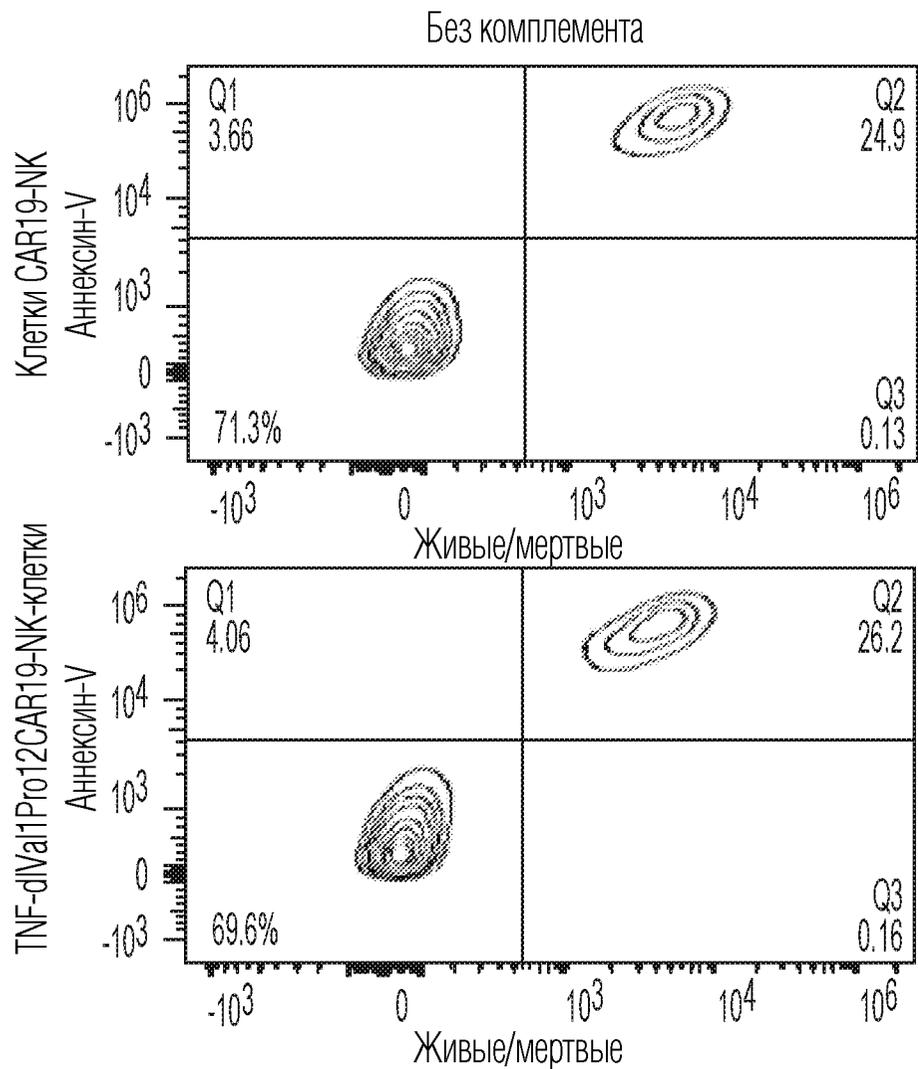


ФИГ. 3

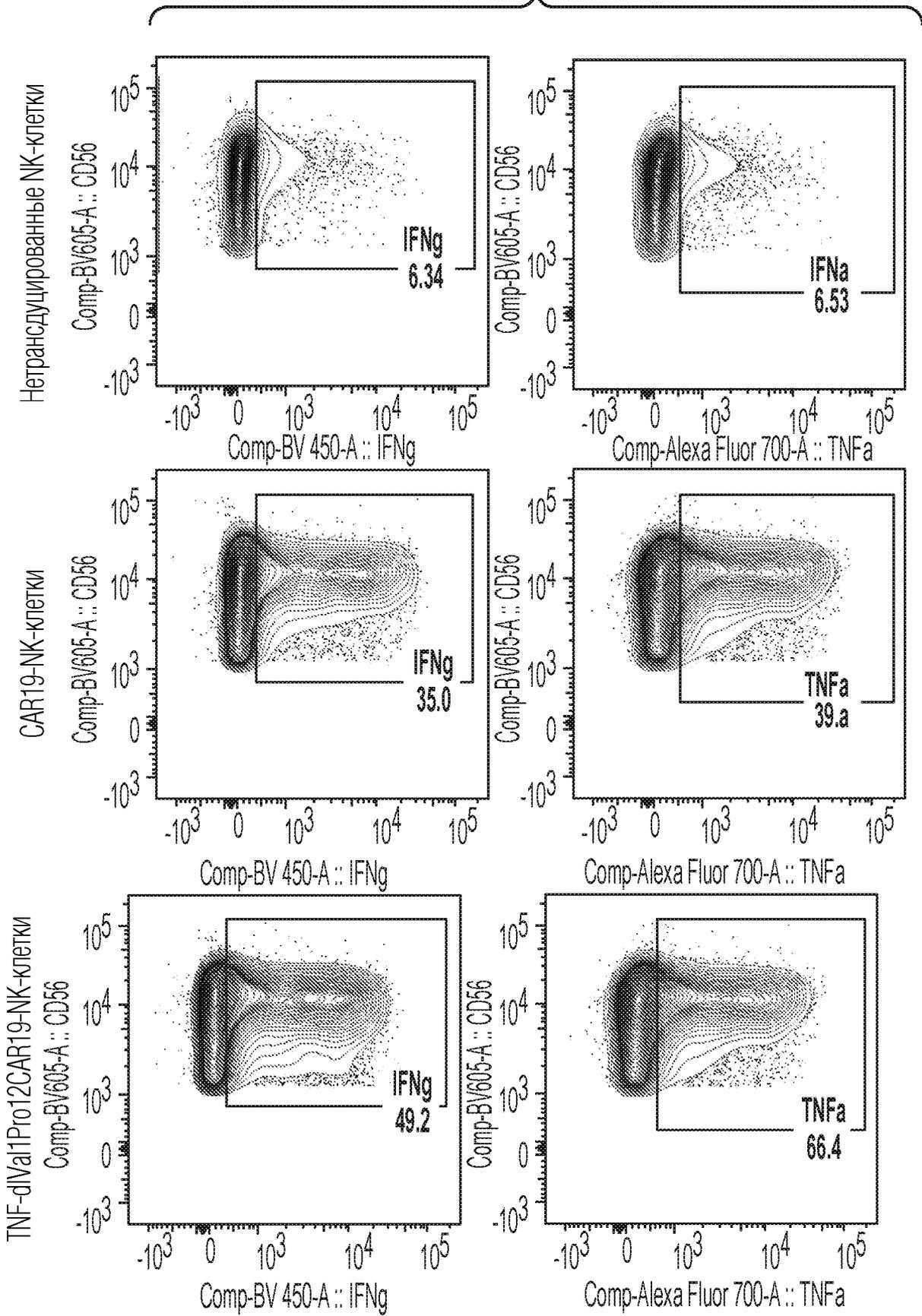


ПЭГ илированный Fab'-фрагмент гуманизованного моноклонального анти-TNF антитела.

ФИГ. 4А



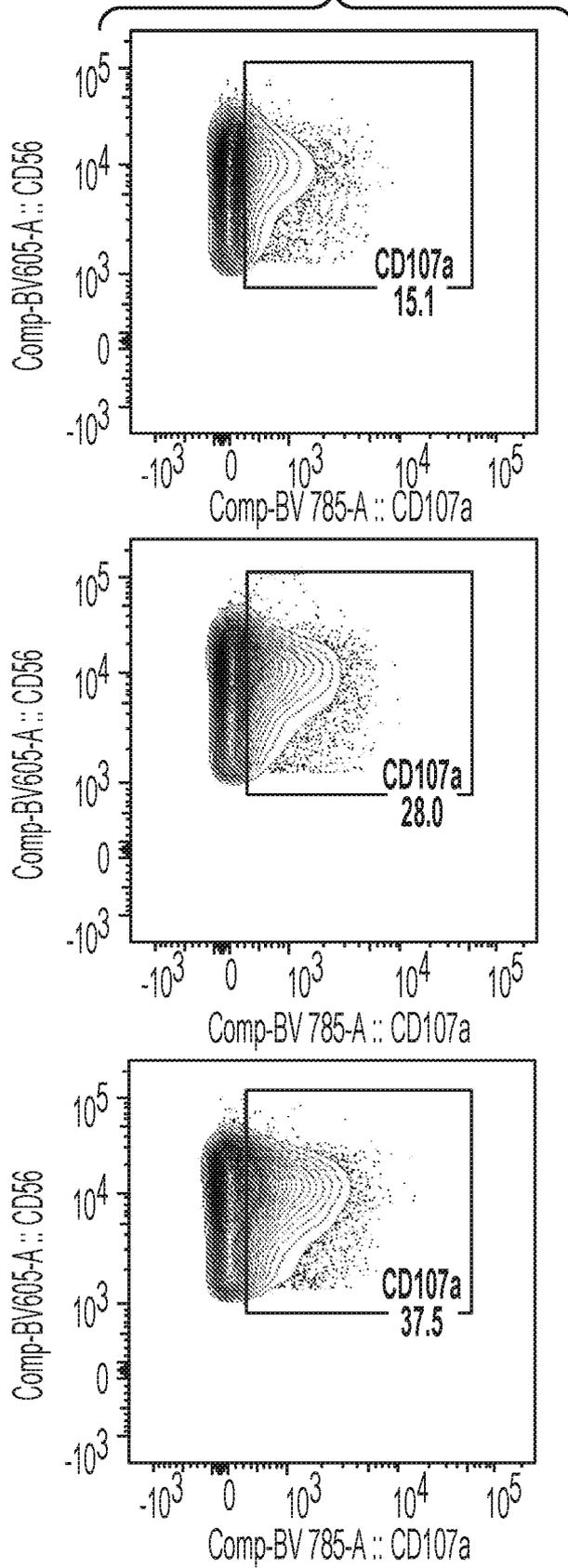
ФИГ. 4В



ФИГ. 5А

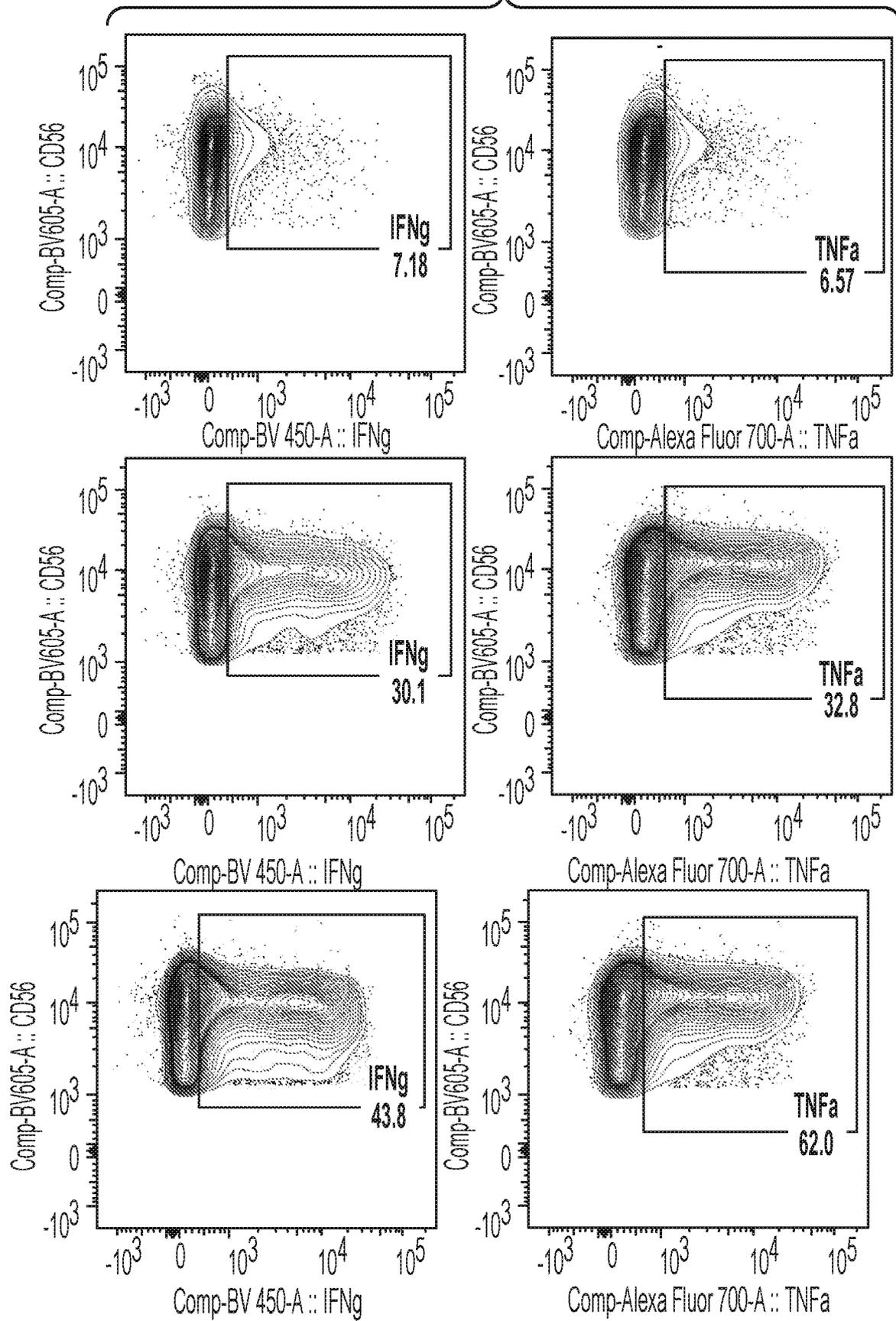
11/20

Донор 1



ФИГ. 5А

ПРОДОЛЖЕНИЕ

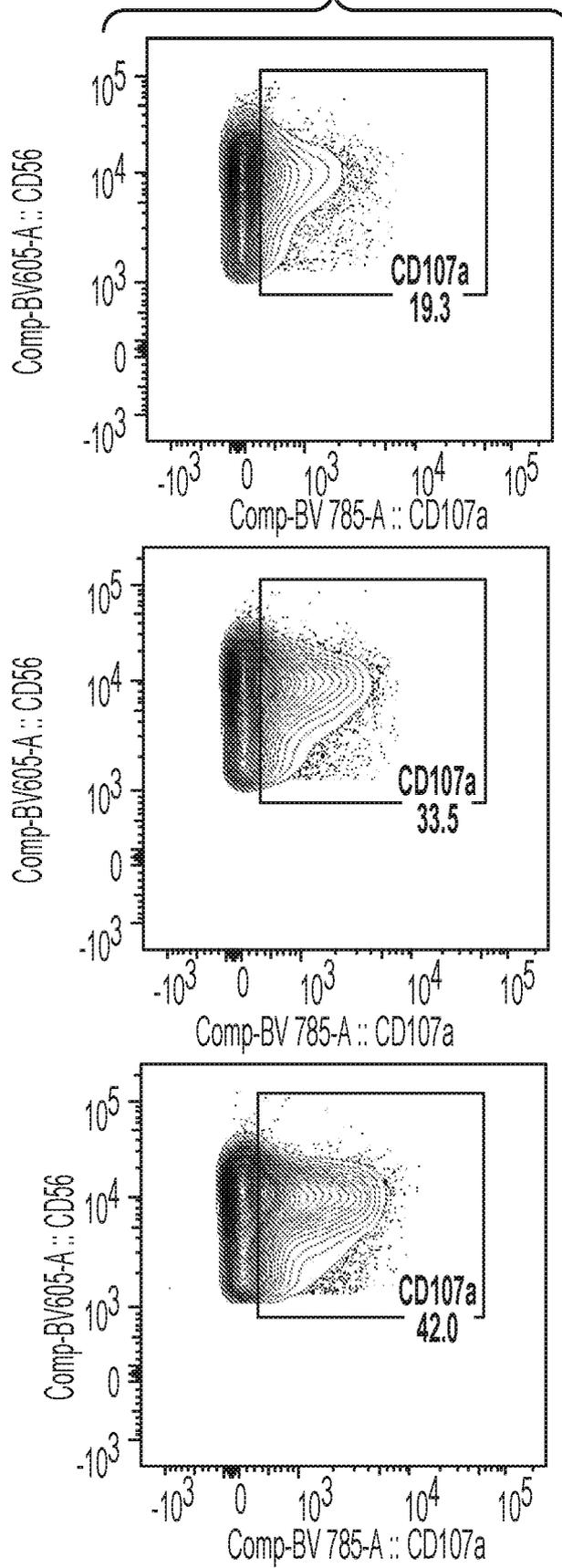


ФИГ. 5А

ПРОДОЛЖЕНИЕ

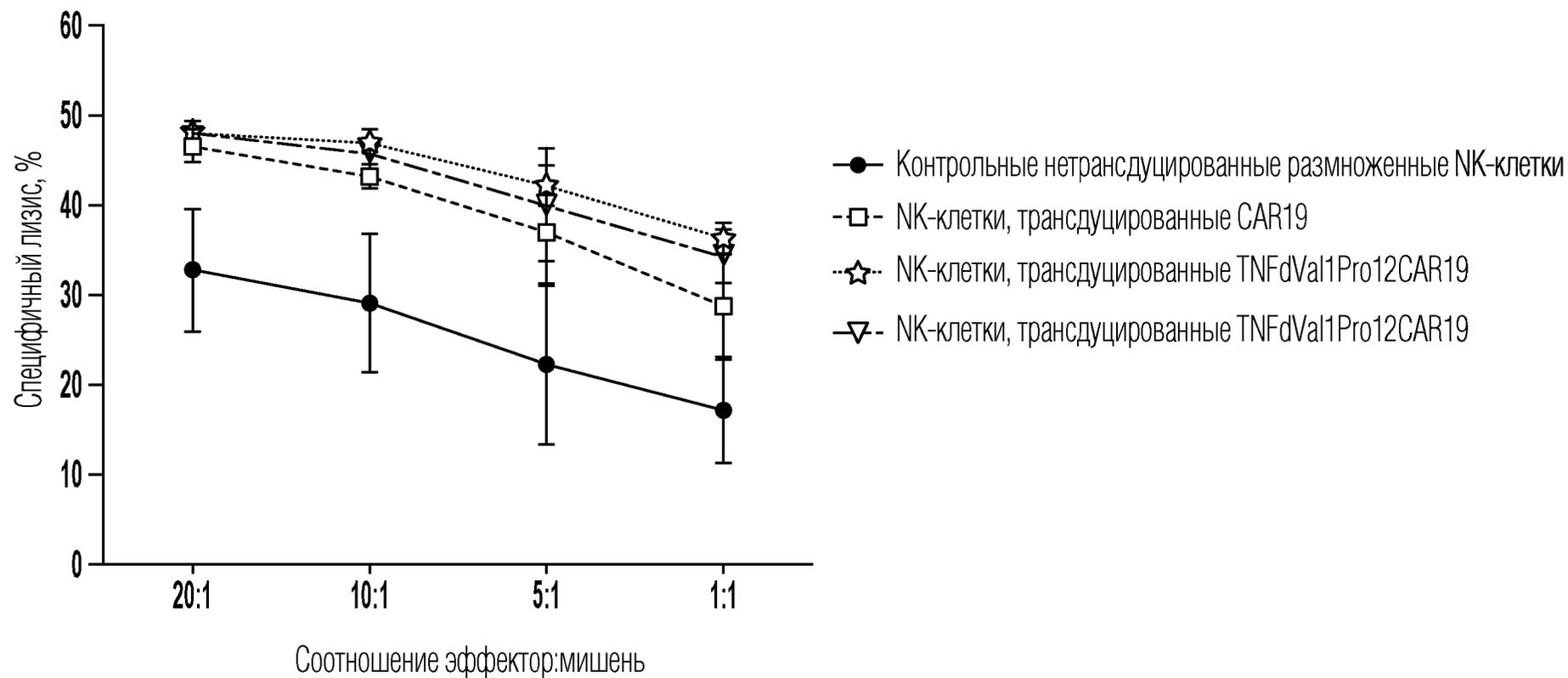
13/20

Донор 1



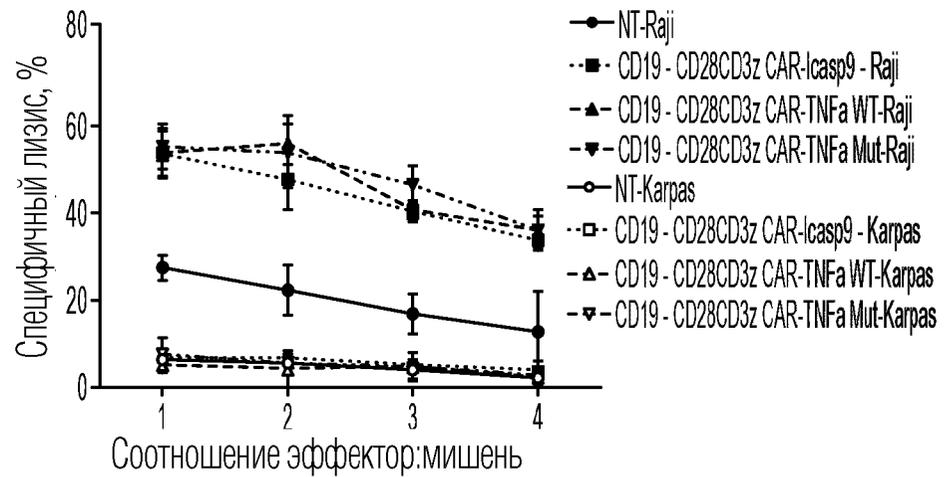
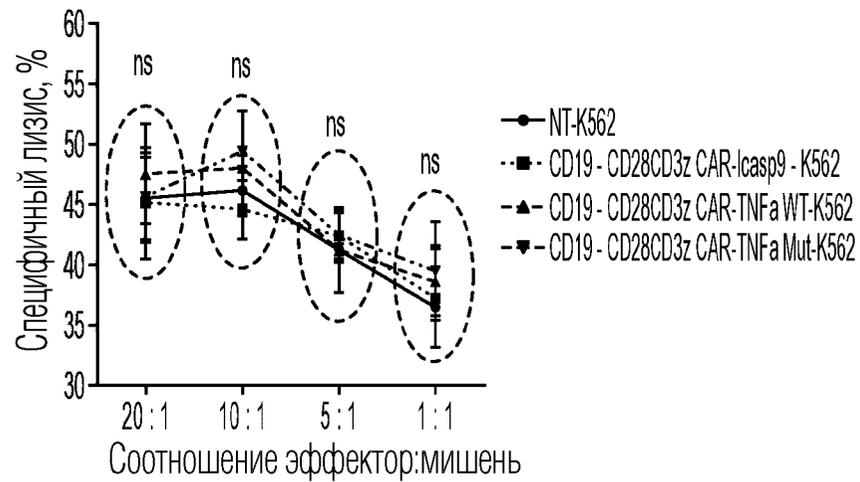
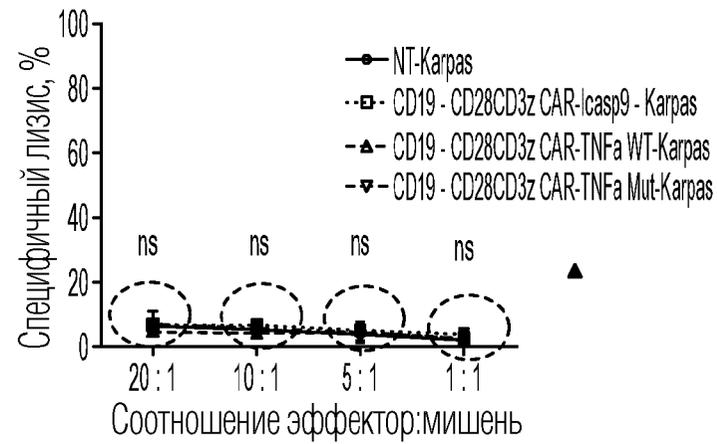
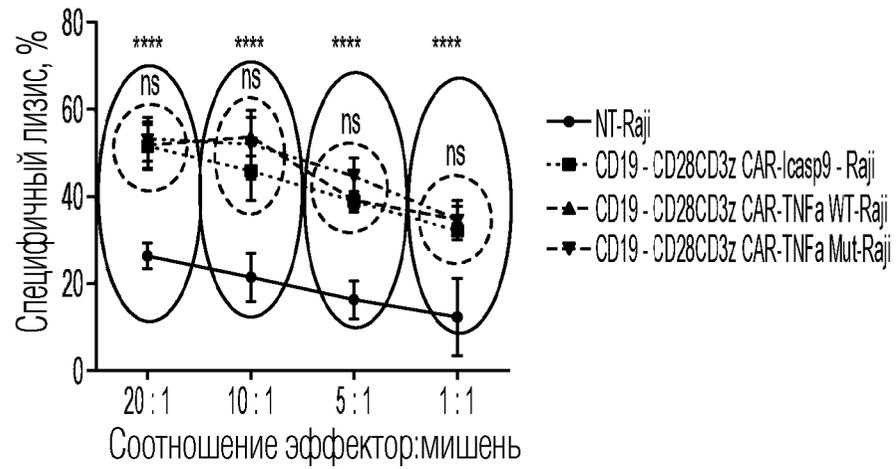
ФИГ. 5А

ПРОДОЛЖЕНИЕ

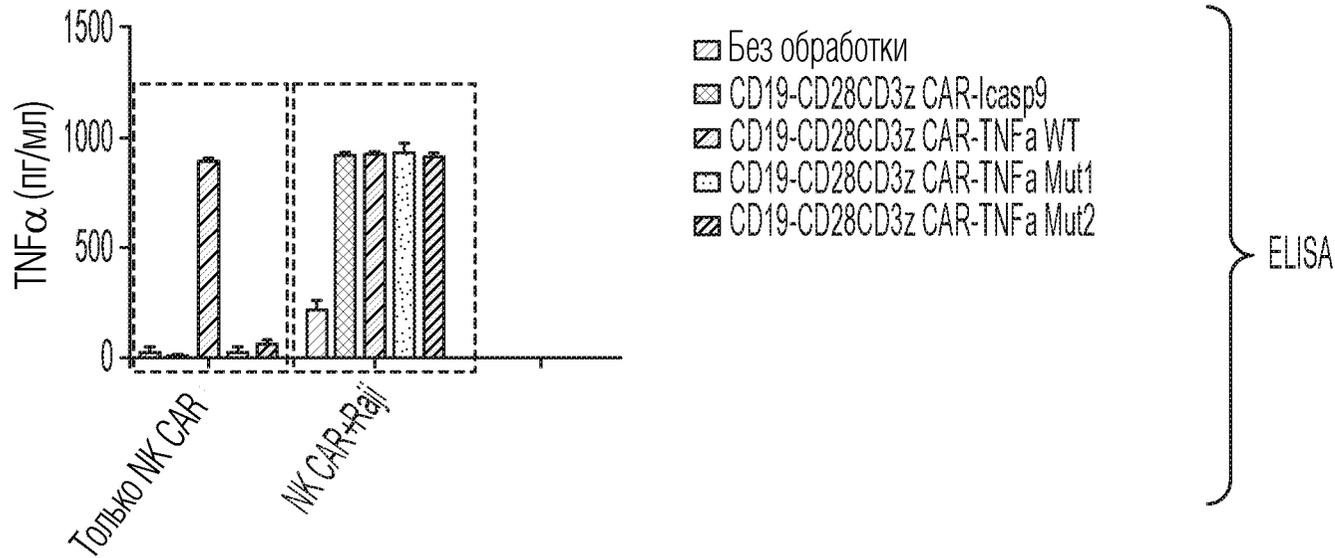
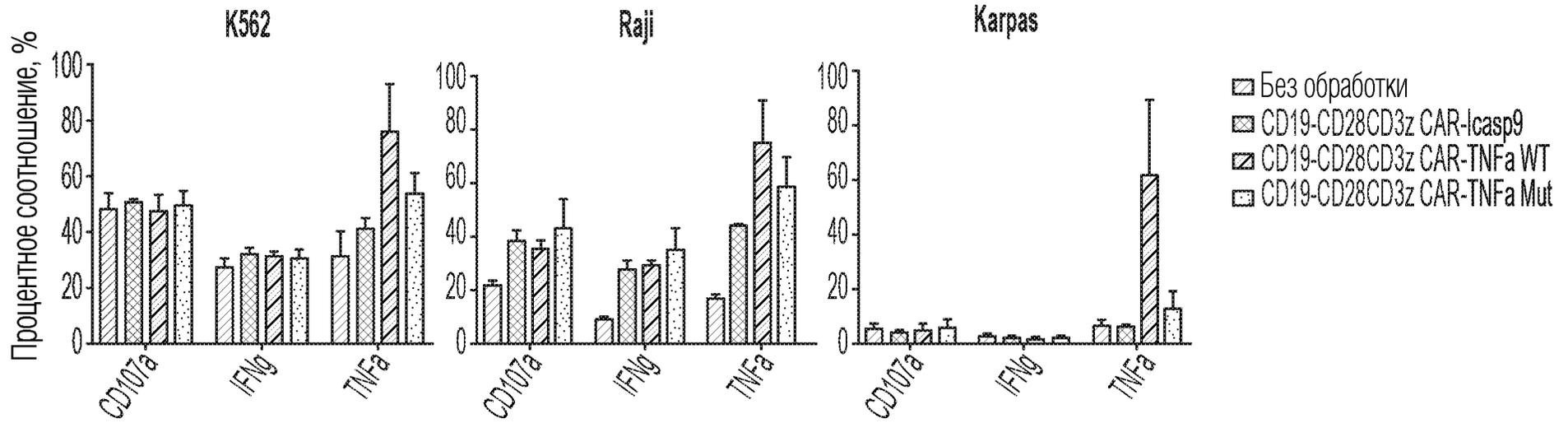


14/20

ФИГ. 5В



ФИГ. 6



ФИГ. 7

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRD  
 LSLISPLAQAAHVVANPQAEQLOWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLVLIYSQVLFKG  
 QGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPYLGGVFQLEKGDRL  
 SAEINRPDYLDFAEISGQVYFGIIAL

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

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

ФИГ. 8

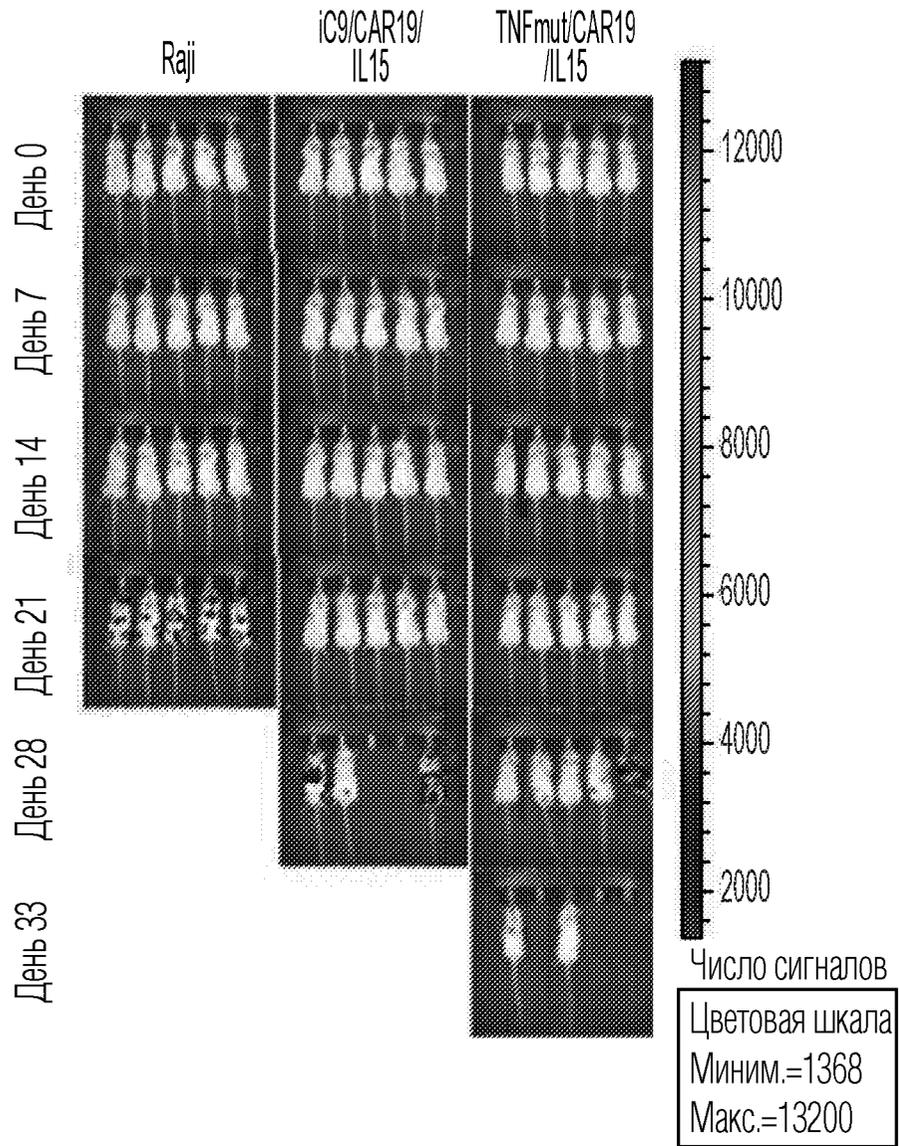


atgagcactgaaaTGCATCCCGAAGGGGGTCTGGCACgaggaggcgctccccaagaagacaggggggccccagggct  
ccaggcggtgcttgctcctcagcctcttctccttctgatcgtggcaggcgccaccacgctcttctTcctgctgcactttggagtgatcgccc  
ccagaggggaagagttccccagggacctctctctaatacagcctctggccgagcccatggttagcaaaccctcaagctgaggggcagct  
ccagtggctgaaccgcccggccaatgcctcctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgccatcagagggcctgt  
acctcatctactcccaggtcctcttcaagggccaaggctgcccctccaccatgtgctcctcaccacaccatcagccgcatcgccgtctcc  
CaccagaccaaggtcaacctcctctTCgccatcaagagcccctgccagagggagaccccagagggggctgaggccaagccctggtat  
gagcccatctatctgggaggggtcttcagctggagaagggtagccgactcaTcgctgagatcaatcggcccgactatctcTactttgccg  
agtAtgggcaggctctactttgggatcattgcctgtcg

MSTEMHPGRGSWHEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATLFFLLHFGVIGPQREEFPRDLSLISPLAQAHVVAN  
PQAEGLQWLNRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGCPSTHVLITHTISRIAVSHQTKVNLLFAIKSP  
CQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLIAEINRPDYLYFAEYGVYFGIIALS

ФИГ. 10

ФИГ. 11А



ФИГ. 11В

