

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991827 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.02

(22) Дата подачи заявки
2018.03.02

(51) Int. Cl. C07K 14/505 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01)
A61K 35/14 (2015.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ С CD19 ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ

(31) 62/466,601; 62/484,052

(32) 2017.03.03; 2017.04.11

(33) US

(86) PCT/US2018/020741

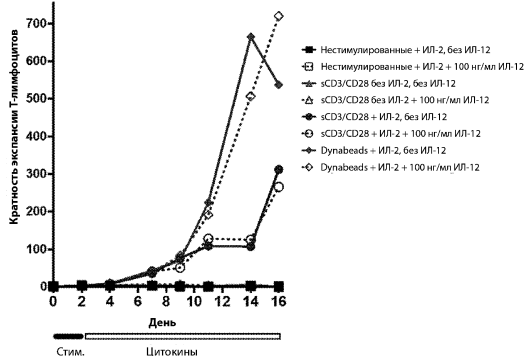
(87) WO 2018/161017 2018.09.07

(71) Заявитель:
ОБСИДИАН ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Сури Випин, Брискин Майкл Джозеф,
Долински Брайан, Элпек Кутлу
Гоксу, Ли Дань Цзюнь, Хеллер Скотт
Фрэнсис, Олс Мишель Линн, Сунь
Дэсюэ, Космидер Николь, Кулкарни
Абхишек, Балакришнан Виджайя,
Эзелл Такер (US)

(74) Представитель:
Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Глухарёва А.О., Гизатуллина
Е.М., Строкова О.В., Лебедев В.В.,
Костюшенкова М.Ю., Парамонова
К.В. (RU)

(57) Согласно данному изобретению предложены биоконтурные системы, эффекторные модули и композиции для иммунотерапии рака. Также предложены способы индукции противораковых иммунных реакций у субъекта.



A1

201991827
/ 72816102

201991827

A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ С CD19 ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/466601, поданной 3 марта 2017 года, под названием «Композиции и способы для иммунотерапии», и предварительной заявке на патент США № 62/484052, поданной 11 апреля 2017 года, под названием «Композиции и способы с анти-CD19 для иммунотерапии», содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Данная заявка подается вместе с Перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей представлен в виде файла с именем 2095_1201PCT_SL.txt, созданного 2 марта 2018 года, размер которого составляет 2116001 байт. Информация в электронном формате перечня последовательностей полностью включена в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Данное изобретение относится к композициям и способам для иммунотерапии. Согласно данному изобретению предложены полипептиды биоконтурных систем (biocircuit systems), эффекторные модули, элементы ответов на стимул (ЭОС) и иммунотерапевтические агенты, полинуклеотиды, кодирующие их, векторы и клетки, содержащие полипептиды и/или полинуклеотиды, для применения в иммунотерапии рака. В одном варианте осуществления, композиции содержат дестабилизирующие домены (ДД), которые регулируют стабильность белка.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Иммунотерапия рака направлена на уничтожение раковых клеток путем возобновления противоопухолевых функций опухолево-реактивных иммунных клеток, преимущественно Т-лимфоцитов. Стратегии иммунотерапии рака, включая недавнюю разработку блокады контрольных точек, адаптивного переноса клеток (АПК) и противораковых вакцин, которые могут увеличить количество противоопухолевых иммунных эффекторных клеток, дали хорошие результаты для нескольких видов опухолей.

[0005] Действие противоопухолевого иммунитета хозяина и иммунотерапии рака сдерживается тремя основными препятствиями: 1) низкое количество опухолевых антиген-специфических Т-лимфоцитов вследствие клональной делеции; 2) слабая активация клеток врожденного иммунитета и накопление вызывающих иммунную толерантность антигенпрезентирующих клеток в микроокружении опухоли; и 3) формирование иммуносупрессивного микроокружения опухоли. В частности, в солидных опухолях терапевтическая эффективность иммунотерапевтических схем остается неудовлетворительной из-за отсутствия эффективного противоопухолевого ответа в иммуносупрессивной микроокружающей среде опухоли. Опухолевые клетки часто индуцируют иммунную толерантность или супрессию, и такая толерантность приобретается, потому что даже действительно чужеродные опухолевые антигены становятся переносимыми. Такая толерантность также является активной и доминантной, поскольку противораковые вакцины и адаптивный перенос предварительно активированных иммунных эффекторных клеток (например, Т-лимфоцитов) подвергаются подавлению ингибирующими факторами в микроокружении опухоли (МОО).

[0006] Кроме того, введение сконструированных Т-лимфоцитов может привести к включению/выключению целевых токсичностей, а также к синдрому высвобождения цитокинов (рассмотрено *Tey Clin. Transl. Immunol.*, 2014, 3: e17 10.1038).

[0007] В случае побочных эффектов необходима разработка настраиваемого переключателя, который может включать или выключать экспрессию трансгенного иммунотерапевтического агента. Например, терапия адаптивным переносом клеток может иметь очень длительный и неопределенный период полужизни. Поскольку токсичность может быть прогрессирующей, для устранения инфузиранных клеток необходим защитный переключатель. Системы и способы, которые могут регулировать уровень трансгенного белка и диапазон экспрессии с высокой гибкостью, могут повысить терапевтическую пользу и уменьшить потенциальные побочные эффекты.

[0008] Для разработки регулируемых терапевтических агентов для лечения заболеваний, в частности противораковой иммунотерапии, данное изобретение предлагает биоконтурные системы для контроля экспрессии иммунотерапевтических агентов. Биоконтурная система содержит стимул и, по меньшей мере, один эффекторный модуль, который реагирует на стимул. Эффекторный модуль может содержать элемент ответа на стимул (ЭОС), который связывается и реагирует на стимул, и иммунотерапевтический агент, функционально связанный с ЭОС. В одном примере, ЭОС представляет собой дестабилизирующий домен (ДД), который дестабилизируется в отсутствие своего специфического лиганда и может быть стабилизирован путем связывания со своим специфическим лигандом.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] Согласно данному изобретению предложены композиции и способы для иммунотерапии. Композиции относятся к регулируемым системам и агентам, которые вызывают противораковые иммунные ответы в клетке или у субъекта. Регулируемая система и агент могут представлять собой биоконтурную систему, содержащую, по меньшей мере, один эффекторный модуль, который реагирует, по меньшей мере, на один стимул. Биоконтурная система может представлять собой, но не ограничивается лишь этими: биоконтурную систему дестабилизирующего домена (ДД), биоконтурную систему димеризации, биоконтурную систему рецептора и клеточную биоконтурную систему. Данные системы дополнительно описаны в находящейся в совместном владении патентной заявке США № 62/320864, поданной 11 апреля 2016 года, 62/466596, поданной 3 марта 2017 года, и международной публикации WO2017/180587 (содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

[0010] В некоторых вариантах осуществления, композиция для индукции иммунного ответа может содержать эффекторный модуль. В некоторых вариантах осуществления, эффекторный модуль может содержать элемент ответа на стимул (ЭОС), функционально связанный по меньшей мере с одним полезным грузом. В одном аспекте, полезный груз может представлять собой иммунотерапевтический агент.

[0011] В некоторых вариантах осуществления, иммунотерапевтический агент может быть выбран из, но не ограничиваясь лишь этими: химерного антигенного рецептора (ХАР) и антитела.

[0012] В одном аспекте, ЭОС композиция может реагировать на или взаимодействовать с по меньшей мере с одним стимулом.

[0013] В некоторых вариантах осуществления, ЭОС может содержать дестабилизирующий домен (ДД). ДД может быть получен из исходного белка или из мутантного белка, имеющего одну, две, три или большее количество аминокислотных мутаций по сравнению с исходным белком. В некоторых вариантах

осуществления, исходный белок может быть выбран из, но не ограничивается лишь этими: человеческого белка FKBP, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 3; DHFR человека (hDHFR), содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2; DHFR *E. coli*, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 1; PDE5, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 4; PPAR, гамма, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 5; CA2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 6; или NQO2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 7.

[0014] В одном аспекте, исходный белок представляет собой hDHFR, а ДД содержит мутантный белок. Мутантный белок может содержать одну мутацию и может быть выбран из, но не ограничивается лишь этими: hDHFR (I17V), hDHFR (F59S), hDHFR (N65D), hDHFR (K81R), hDHFR (A107V), hDHFR (Y122I), hDHFR (N127Y), hDHFR (M140I), hDHFR (K185E), hDHFR (N186D) и hDHFR (M140I), hDHFR (аминокислоты 2-187 из ДТ; N127Y), hDHFR (аминокислоты 2-187 из ДТ; I17V); hDHFR (аминокислоты 2-187 из ДТ; Y122I) и hDHFR (аминокислоты 2-187 из ДТ; K185E). В некоторых вариантах осуществления, мутантный белок может содержать две мутации и может быть выбран из, но не ограничивается лишь этими: hDHFR (C7R, Y163C), hDHFR (A10V, H88Y), hDHFR (Q36K, Y122I), hDHFR (M53T, R138I), hDHFR (T57A, I72A), hDHFR (E63G, I176F), hDHFR (G21T, Y122I), hDHFR (L74N, Y122I), hDHFR (V75F, Y122I), hDHFR (L94A, T147A), DHFR (V121A, Y22I), hDHFR (Y122I, A125F), hDHFR (H131R, E144G), hDHFR (T137R, F143L), hDHFR (Y178H, E181G), и hDHFR (Y183H, K185E), hDHFR (E162G, I176F) hDHFR (аминокислоты 2-187 из ДТ; I17V, Y122I), hDHFR (аминокислоты 2-187 из ДТ; Y122I, M140I), hDHFR (аминокислоты 2-187 из ДТ; N127Y, Y122I), hDHFR (аминокислоты 2-187 из ДТ; E162G, I176F), и hDHFR (аминокислоты 2-187 из ДТ; H131R, E144G), и hDHFR (аминокислоты 2-187 из ДТ; Y122I, A125F). В некоторых вариантах осуществления, мутант может содержать три мутации, и мутант может быть выбран из hDHFR (V9A, S93R, P150L), hDHFR (I8V, K133E, Y163C), hDHFR (L23S, V121A, Y157C), hDHFR (K19E, F89L, E181G), hDHFR (Q36F, N65F, Y122I), hDHFR (G54R, M140V, S168C), hDHFR (V110A, V136M, K177R), hDHFR (Q36F, Y122I, A125F), hDHFR (N49D, F59S, D153G), и hDHFR (G21E, I72V, I176T), hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Q36F, Y122I, A125F), hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Y122I, H131R, E144G), hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; E31D, F32M, V116I), и hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Q36F, N65F, Y122I). В некоторых вариантах осуществления, мутант может содержать четыре или большее количество мутаций, и мутант может быть выбран из hDHFR (V2A, R33G, Q36R, L100P, K185R), hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; D22S, F32M, R33S, Q36S, N65S), hDHFR (I17N, L98S, K99R, M112T, E151G, E162G, E172G), hDHFR (G16S, I17V, F89L, D96G, K123E, M140V, D146G, K156R), hDHFR (K81R, K99R, L100P, E102G, N108D, K123R, H128R, D142G, F180L, K185E), hDHFR (R138G, D142G, F143S, K156R, K158E, E162G, V166A, K177E, Y178C, K185E, N186S), hDHFR (N14S, P24S, F35L, M53T, K56E, R92G, S93G, N127S, H128Y, F135L, F143S, L159P, L160P, E173A, F180L), hDHFR (F35L, R37G, N65A, L68S, K69E, R71G, L80P, K99G, G117D, L132P, I139V, M140I, D142G, D146G, E173G, D187G), hDHFR (L28P, N30H, M38V, V44A, L68S, N73G, R78G, A97T, K99R, A107T, K109R, D111N, L134P, F135V, T147A, I152V, K158R, E172G, V182A, E184R), hDHFR (V2A, I17V, N30D, E31G, Q36R, F59S, K69E, I72T, H88Y, F89L, N108D, K109E, V110A, I115V, Y122D, L132P, F135S, M140V, E144G, T147A, Y157C, V170A, K174R, N186S), hDHFR (L100P, E102G, Q103R, P104S, E105G, N108D, V113A, W114R, Y122C, M126I, N127R, H128Y, L132P, F135P, I139T, F148S, F149L, I152V, D153A, D169G, V170A, I176A, K177R, V182A, K185R, N186S), и hDHFR (A10T, Q13R, N14S, N20D, P24S, N30S, M38T, T40A, K47R, N49S, K56R, I61T, K64R, K69R, I72A, R78G, E82G, F89L, D96G, N108D, M112V,

W114R, Y122D, K123E, I139V, Q141R, D142G, F148L, E151G, E155G, Y157R, Q171R, Y183C, E184G, K185del, D187N).

[0015] В одном аспекте, стимулом ЭОС может быть триметоприм или метотрексат.

[0016] В некоторых вариантах осуществления, иммунотерапевтический агент эффекторного модуля представляет собой химерный антигенный рецептор (ХАР). Химерный антиген может содержать внеклеточный целевой фрагмент; трансмембранный домен; внутриклеточный сигнальный домен; и, необязательно, один или большее количество костимулирующих доменов.

[0017] В одном аспекте, ХАР может быть выбран из, но не ограничивается лишь этими: стандартного ХАР, разделенного ХАР, ХАР с выключателем, ХАР с включателем, ХАР первого поколения, ХАР второго поколения, ХАР третьего поколения или ХАР четвертого поколения.

[0018] В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный целевой фрагмент ХАР может быть выбран из, но не ограничивается лишь этими: NAR Ig, фрагмента Fab, фрагмента Fab', фрагмента F(ab)'₂, фрагмента F(ab)'₃, Fv, одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), bis-scFv, (scFv)₂, минителя, диатела, триатела, тетратела, интратела, стабилизированного дисульфидом белка Fv (dsFv), унитела, нанотела и антигенсвязывающей области, полученной из антитела, которое может специфически связываться с любым представляющим интерес белком, лигандом, рецептором, фрагментом рецептора или пептидным аптамером.

[0019] В одном аспекте, внеклеточный целевой фрагмент может представлять собой scFv, полученный из антитела. В одном аспекте, scFv может специфически связываться с антигеном CD19.

[0020] В одном аспекте, scFv ХАР может представлять собой scFv CD19. В некоторых вариантах осуществления, scFv CD19 может содержать вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, независимо выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49-80, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, независимо выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 81-122. В некоторых вариантах осуществления, scFv CD19 может содержать аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 123-267 и 624.

[0021] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен ХАР может представлять собой сигнальный домен, полученный из рецептора CD3-дзета Т-лимфоцита. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен может быть выбран из молекулы клеточной поверхности, выбранной из группы, состоящей из FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В одном аспекте, ХАР может содержать костимуляторный домен. В некоторых вариантах осуществления, костимуляторный домен может быть выбран из группы, состоящей из 2B4, HVEM, ICOS, LAG3, DAP10, DAP12, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, ICOS (CD278), рецептора фактора некроза опухолей, индуцируемого глюкокортикоидами (GITR), антигена-1, связанного с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C и B7-H3.

[0022] (b) присутствует костимуляторный домен и он выбран из группы, состоящей из 2B4, HVEM, ICOS, LAG3, DAP10, DAP12, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, ICOS (CD278), рецептор фактора некроза опухолей, индуцируемого глюкокортикоидами (GITR), антигена-1, связанного с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C и B7-H3.

[0023] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен ХАР может представлять собой сигнальный домен CD3-дзета рецептора Т-лимфоцита, который может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 339.

[0024] В некоторых вариантах осуществления, сигнальный домен CD3-дзета рецептора Т-лимфоцитов ХАР, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 626, может дополнительно содержать по меньшей мере один костимуляторный домен. Костимуляторный домен может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 268-374.

[0025] В одном варианте осуществления, трансмембранный домен ХАР может быть получен из трансмембранной области альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора. В одном аспекте, трансмембранный домен может быть получен из эпсилон-цепи CD3 Т-клеточного рецептора. В одном варианте осуществления, трансмембранный домен может быть получен из молекулы, выбранной из CD4, CD5, CD8, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD148, DAP 10, E α RI, GITR, LAG3, ICOS, Her2, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137), CD152, CD154, PD-1 или CTLA-4. В другом варианте осуществления, трансмембранный домен может быть получен из иммуноглобулина, выбранного из IgG1, IgD, IgG4 и области Fc IgG4. В одном аспекте, трансмембранный домен может содержать аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 375-425 и 897-907.

[0026] В некоторых вариантах осуществления, ХАР эффекторного модуля может дополнительно содержать шарнирную область рядом с трансмембранным доменом. В одном аспекте, шарнирная область может содержать аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 426-504.

[0027] В некоторых вариантах осуществления, иммунотерапевтический агент может представлять собой антитело, которое является специфически иммунореактивным к антигену, выбранному из опухолеспецифического антигена (OCA), ассоциированного с опухолью антигена (AOA) или антигенного эпитопа.

[0028] В одном аспекте, антиген может представлять собой антигенный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления, антигенный эпитоп может представлять собой CD19.

[0029] В некоторых вариантах осуществления, антитело может содержать переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, независимо выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 49-80, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, независимо выбранную из группы состоящий из любой из SEQ ID NO: 81-122. В одном аспекте, антитело может содержать аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 123-267 и 624.

[0030] В одном аспекте, первый эффекторный модуль может содержать аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 635-649, 1005-1010, 1015-1018 и 1215-1231.

[0031] В некоторых вариантах осуществления, первый ЭОС эффекторного модуля может стабилизировать иммунотерапевтический агент с коэффициентом стабилизации 1 или больше, причем коэффициент стабилизации может содержать отношение экспрессии, функции или уровня иммунотерапевтического агента в присутствии стимула к экспрессии, функции или уровню иммунотерапевтического агента в отсутствии стимула.

[0032] В некоторых вариантах осуществления, ЭОС может дестабилизировать иммунотерапевтический агент с коэффициентом дестабилизации между 0 и 0,09, причем коэффициент дестабилизации может содержать отношение экспрессии, функции или уровня иммунотерапевтического агента в отсутствии

стимула, специфичного для ЭОС, к экспрессии, функции или уровню иммунотерапевтического агента, который экспрессируется конститутивно, и в отсутствии стимула, специфичного для ЭОС.

[0033] Согласно данному изобретению также предложены полинуклеотиды, содержащие композиции согласно изобретению.

[0034] В одном аспекте, полинуклеотиды могут представлять собой молекулы ДНК или РНК. В одном аспекте, полинуклеотиды могут содержать пространственно-временно выбранные кодоны. В одном аспекте, полинуклеотиды согласно данному изобретению могут представлять собой молекулу ДНК. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды могут представлять собой молекулу РНК. В одном аспекте, молекула РНК может быть молекулой-мессенджером. В некоторых вариантах осуществления, молекула РНК может быть химически модифицирована.

[0035] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды могут дополнительно содержать, по меньшей мере, один дополнительный элемент, выбранный из, но не ограниченный лишь этими: промотора, линкера, сигнального пептида, метки, сайта расщепления и нацеливающего пептида.

[0036] Согласно данному изобретению также предложены векторы, содержащие полинуклеотиды, описанные в данном документе. В одном аспекте, вектор может представлять собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор может представлять собой ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, гамма-ретровирусный вектор, рекомбинантный вектор AAV, аденовирусный вектор и вектор на основе онколитического вируса.

[0037] Согласно данному изобретению также предложены иммунные клетки для адаптивного переноса клеток (АПК), которые могут экспрессировать композиции согласно данному изобретению, полинуклеотиды, описанные в данном документе. В одном аспекте, иммунные клетки могут быть инфицированы или трансфицированы векторами, описанными в данном документе. Иммунные клетки для АПК могут быть выбраны из, но не ограничиваются лишь этими: CD8+ Т-лимфоцита, CD4+ Т-лимфоцита, хелперного Т-лимфоцита, клетки естественного киллера (NK), клетки NKT, цитотоксического Т-лимфоцита (CTL), инфильтрирующегося в опухоль лимфоцита (TIL), Т-лимфоцита памяти, регуляторного Т-лимфоцита (Трег), цитокин-индуцированной киллерной (CIK) клетки, дендритной клетки, эмбриональной стволовой клетки человека, мезенхимальной стволовой клетки, гемопоэтической стволовой клетки, или их смеси.

[0038] В некоторых вариантах осуществления, иммунные клетки могут быть аутологичными, аллогенными, сингенными или ксеногенными по отношению к конкретному отдельному субъекту.

[0039] В некоторых вариантах осуществления, иммунная клетка может дополнительно экспрессировать композицию, содержащую второй эффекторный модуль, причем указанный второй эффекторный модуль содержит второй ЭОС, связанный с вторым иммунотерапевтическим агентом. В одном аспекте, второй иммунотерапевтический агент может быть выбран из цитокина и гибрида цитокин-цитокينوвого рецептора.

[0040] В одном аспекте, второй иммунотерапевтический агент может представлять собой цитокин. В одном аспекте, цитокин может представлять собой ИЛ12 или ИЛ15.

[0041] В одном аспекте, второй иммунотерапевтический агент может представлять собой гибридный полипептид цитокин-цитокينوвого рецептора.

[0042] В некоторых вариантах осуществления, гибридный полипептид цитокин-цитокينوвого рецептора может быть выбран из, но не ограничивается лишь этими: гибридного полипептида рецептора ИЛ12-ИЛ12, гибридного полипептида рецептора ИЛ15-ИЛ15 и гибридного полипептида суши-домена рецептора ИЛ15-ИЛ15.

[0043] Согласно данному изобретению предложены способы уменьшения опухолевого объема или нагрузки у субъекта, включающие в себе приведение в контакт субъекта с иммунными клетками согласно данному изобретению. Также в данном документе предложен способ индукции противоопухолевого иммунного ответа у субъекта, включающий в себя введение иммунных клеток системы субъекту.

[0044] Согласно данному изобретению также предложены способы усиления размножения и/или выживания иммунных клеток, включающие в себя приведение в контакт иммунных клеток с композициями согласно данному изобретению, полинуклеотидами согласно данному изобретению и/или векторами согласно данному изобретению.

[0045] В данном документе также предложен способ индукции иммунного ответа у субъекта, путем введения субъекту композиций согласно данному изобретению, полинуклеотидов согласно данному изобретению и/или иммунных клеток согласно данному изобретению.

[0046] Согласно данному изобретению также предложен способ идентификации домена антигена CD19, который не будет связываться с антителом FMC63 (отличный от FMC63 домен связывания CD19). Способ может включать в себя (а) приготовление композиции, содержащей антиген CD19, (b) приведение в контакт композиции (а) с предельными уровнями антитела FMC63, (в) приведение в контакт композиции этапа (b) с одним или большим количеством выбранных членов библиотеки потенциальных связующих CD19 агентов; и (d) идентификацию связывающего домена на антигене CD19 на основе дифференциального связывания выбранных членов библиотеки связующих CD19 агентов по сравнению со связыванием FMC63. В некоторых вариантах осуществления, связывающие домены библиотеки могут быть получены с использованием методик фагового дисплея с антигеном CD19 в качестве затравочной последовательности. В одном аспекте, связывающий домен может быть выбран из фрагмента Fab, фрагмента Fab', фрагмента F(ab)'2, фрагмента F(ab)'3, Fv, одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), bis-scFv, (scFv)2, минителя, диатела, триатела, тетратела, дисульфд-стабилизированного белка Fv (dsFv), унитела, нанотела, или антиген-связывающей области антитела, и фрагмента антитела. В одном аспекте, антиген CD19 может быть выбран из целого или части антигена CD19 человека, и целого или части антигена CD19 макака резус.

[0047] Согласно данному изобретению также предложены химерные рецепторы антигена, которые могут содержать отличный от FMC63 домен связывания CD19, полученный в соответствии со способами, описанными в данном документе. Также в данном документе предложен элемент ответа на стимул (ЭОС), функционально связанный с химерными рецепторами антигена, которые содержат отличный от FMC63 домен связывания CD19.

[0048] В некоторых вариантах осуществления, эффекторный модуль содержит элемент ответа на стимул (ЭОС) и, по меньшей мере, один полезный груз, содержащий представляющий интерес белок (ПИБ).

[0049] В некоторых вариантах осуществления, ЭОС может представлять собой дестабилизирующий домен (ДД). В некоторых примерах, ДД представляет собой мутантный домен, полученный из белка, такого как FKBP (белок, связывающий FK506), DHFR *E. coli* (дигидрофолатредуктаза) (ecDHFR), DHFR человека (hDHFR) или любого представляющего интерес белка. В данном контексте биоконтурная система представляет собой биоконтурную систему ДД.

[0050] Полезный груз может представлять собой любой иммунотерапевтический агент, используемый для иммунотерапии рака, такой как химерный рецептор агента (ХАР), такой как CD19 ХАР, который нацелен на любую молекулу опухолевых клеток, антитело, антиген-связывающий домен или комбинацию антиген-связывающих доменов, цитокин, такой как гибрид ИЛ12, ИЛ15 или ИЛ15/ИЛ15Ra, или любой

агент, который может индуцировать иммунный ответ. ЭОС и полезный груз могут быть функционально связаны посредством одного или большего количества линкеров, и положения компонентов могут варьировать в пределах эффекторного модуля.

[0051] В некоторых вариантах осуществления, эффекторный модуль может дополнительно содержать один или большее количество дополнительных элементов, таких как линкерные последовательности (с определенными последовательностями и длиной), сайты расщепления, регуляторные элементы (которые регулируют экспрессию представляющего интерес белка, такие как сайты нацеливания микроРНК), сигнальные последовательности, которые направляют эффекторный модуль к определенному клеточному или субклеточному местоположению, последовательности проникновения, или тэги и биомаркеры для отслеживания эффекторного модуля.

[0052] В некоторых вариантах, ДД может стабилизировать иммунотерапевтический агент с коэффициентом стабилизации, по меньшей мере, один в присутствии стимула. Согласно данному изобретению, ДД может дестабилизировать иммунотерапевтический агент в отсутствие лиганда с коэффициентом дестабилизации от 0 до 0,99.

[0053] Согласно данному изобретению предложены полипептиды биоконтра, эффекторные модули, элементы ответа на стимул (ЭОС) и полезные грузы, а также полинуклеотиды, кодирующие любое из вышеперечисленного; векторы, содержащие полинуклеотиды согласно данному изобретению; и клетки, экспрессирующие полипептиды, полинуклеотиды и векторы согласно данному изобретению. Полипептиды, полинуклеотиды, вирусные векторы и клетки являются полезными для индукции противоопухолевых иммунных ответов у субъекта.

[0054] В некоторых вариантах осуществления, вектор изобретения представляет собой вирусный вектор. Вирусный вектор может включать в себя, но не ограничивается лишь этими: ретровирусный вектор, аденовирусный вектор, аденоассоциированный вирусный вектор или лентивирусный вектор.

[0055] В некоторых вариантах осуществления, вектор согласно данному изобретению может представлять собой невирусный вектор, такой как наночастицы и липосомы.

[0056] Данное изобретение также относится к иммунным клеткам, сконструированным для включения в себя одного или большего количества полипептидов, полинуклеотидов или векторов согласно данному изобретению. Такие клетки могут представлять собой иммунные эффекторные клетки, включая Т-лимфоциты, такие как цитотоксические Т-лимфоциты, хелперные Т-лимфоциты, Т-лимфоциты памяти, регуляторные Т-лимфоциты, клетки естественные киллеры (NK), NK Т-лимфоциты, цитокин-индуцированные киллерные (CIK) клетки, цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), и инфильтрирующие в опухоль лимфоциты (TIL). Сконструированная клетка может быть использована для адаптивного переноса клеток для лечения заболевания (например, рака).

[0057] Согласно данному изобретению также предложены способы индукции иммунных ответов у субъекта с использованием композиций согласно данному изобретению. Также предложены способы уменьшения опухолевой нагрузки у субъекта с использованием композиций согласно данному изобретению.

[0058] В данном документе также предложены способы для идентификации отличных от FMC63 связывающих доменов и использования антигенов CD19, в которых эпитоп, связываемый FMC63, замаскирован или отсутствует. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен FMC63 может быть включен в состав полезных грузов и эффекторные модули согласно данному изобретению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0059] Фиг. 1 демонстрирует общую схему биоконтурной системы согласно изобретению. Биоконтур содержит стимул и, по меньшей мере, один эффекторный модуль, реагирующий на стимул, причем ответ на стимул продуцирует сигнал или следствие. Эффекторный модуль содержит, по меньшей мере, один элемент ответа на стимул (ЭОС) и один полезный груз.

[0060] Фиг. 2 демонстрирует репрезентативные эффекторные модули, несущие один полезный груз. Сигнальная последовательность (СП), ЭОС и полезный груз могут быть расположены или размещены различными способами с (от А до F) или без (от G до Z, и от AA к DD) сайта расщепления. Необязательный линкер может быть вставлен между каждым компонентом эффекторного модуля.

[0061] Фиг. 3 демонстрирует репрезентативные эффекторные модули, несущие два полезных груза без сайта расщепления. Два полезных груза могут быть либо прямо соединены друг с другом, или быть разделенными.

[0062] Фиг. 4 демонстрирует репрезентативные эффекторные модули, несущие два полезных груза с сайтом расщепления. В одном варианте осуществления, СП расположен на N-конце конструкции, в то время как другие компоненты: ЭОС, два полезных груза и сайт расщепления могут быть расположены в разных позициях (от А до L). В другом варианте осуществления, сайт расщепления расположен на N-конце конструкции (M-X). Необязательный линкер может быть вставлен между каждым компонентом эффекторного модуля.

[0063] Фиг. 5 демонстрирует эффекторные модули согласно изобретению, несущие два полезных груза, причем ЭОС расположен на N-конце конструкции (от А до L), в то время как СП, два полезных груза и сайт расщепления могут быть в любой конфигурации. Необязательный линкер может быть вставлен между каждым компонентом эффекторного модуля.

[0064] Фиг. 6 демонстрирует эффекторные модули согласно изобретению, несущие два полезных груза, причем либо два полезных груза (от А до F), либо один из двух полезных грузов (от G до X) расположен на N-конце конструкции (от А до L), в то время как СП, ЭОС и сайт расщепления могут быть в любой конфигурации. Необязательный линкер может быть вставлен между каждым компонентом эффекторного модуля.

[0065] Фиг. 7 иллюстрирует типичные конфигурации стимула и эффекторного модуля в пределах биоконтурной системы. Трансмембранный эффекторный модуль активируют либо свободным стимулом (Фиг. 7А), либо мембран-связанным стимулом (Фиг. 7В), который связывается с ЭОС. Ответ на стимул вызывает расщепление внутриклеточного сигнала/полезного груза, что активирует ниже эффектор/полезный груз.

[0066] Фиг. 8 иллюстрирует биоконтурную систему с двойным стимулом-двойным презентатором, причем два связанных стимула (А и В) от двух разных презентаторов (например, различных клеток) связываются с двумя различными эффекторными модулями в одном приемнике (например, другой единственной клетке) одновременно, и создают двойной сигнал к находящимся ниже по потоку полезным грузам.

[0067] Фиг. 9 иллюстрирует биоконтурную систему с двойным стимулом-двойным презентатором, причем два связанных стимула (А и В) от одного и того же презентатора (например, единственной клетки) связываются с двумя различными эффекторными модулями в другой единственной клетке одновременно, и создают двойной сигнал.

[0068] Фиг. 10 иллюстрирует биоконтурную систему с опосредованием одиночного стимула с приемником. В этой конфигурации, связанный стимул (А) связывается с эффекторным модулем в клетке-посреднике, и создает сигнал для активации полезного груза, который является стимулом (В) для другого эффекторного модуля в конечном приемнике (например, другой клетке).

[0069] Фиг. 11 иллюстрирует биоконтурную систему с единственным стимулом-единственным приемником, причем один приемник содержит два эффекторных модуля, которые последовательно активируются с помощью единственного стимула.

[0070] Фиг. 12 иллюстрирует биоконтурную систему, которая требует двойной активации. В этом варианте осуществления, один стимул должен связать трансмембранный эффекторный модуль первым, чтобы подготовить клетку-приемник к активации другим стимулом. Приемник активируется только тогда, когда он опознает оба стимула (В).

[0071] Фиг. 13 иллюстрирует стандартный эффекторный модуль системы химерного антигенного рецептора (ХАР), которая содержит антиген-связывающий домен в качестве ЭОС, и сигнальный домен(ы) в качестве полезного груза.

[0072] Фиг. 14 иллюстрирует структуру конструкции регулируемой системы ХАР, где трансмембранные эффекторные модули содержат антиген-связывающие домены, опознающие антиген и первый домен переключения, и внутриклеточный модуль содержит второй домен переключения и сигнальные домены. Стимул (например, димеризирующая малая молекула) может димеризовать первый и второй домены переключения, и собирать активированную систему ХАР.

[0073] Фиг. 15 демонстрирует схематическое представление системы ХАР, имеющей один (А) или два (В и С) ЭОС, встроенных в эффекторный модуль.

[0074] Фиг. 16 иллюстрирует разделенную конструкцию ХАР, чтобы контролировать активацию Т-лимфоцитов с помощью двойного стимула (например, антигена и малой молекулы). Фиг. 16А демонстрирует нормальную активацию Т-лимфоцитов, которая вызывает двойную активацию ТКР и ко-стимулирующего рецептора. Обычная конструкция ХАР (Фиг. 16В) сочетает в себе домен распознавания антигена с сигнальным мотивом ТКР и ко-стимулирующим мотивом в одной молекуле. Система разделенного ХАР разделяет компоненты обычного ХАР на два отдельных эффекторных модуля, которые могут быть пересобраны, когда присутствует гетеродимеризирующая малая молекула (стимул).

[0075] Фиг. 17 иллюстрирует положительную и отрицательную регуляцию активации ХАР-сконструированных Т-лимфоцитов. Отсутствие или присутствие второго стимула может отрицательно (А) или положительно (В) контролировать активацию Т-лимфоцитов.

[0076] Фиг. 18 демонстрирует схематическое представление активации ХАР-сконструированных Т-лимфоцитов через логический элемент. Если нормальная клетка, которая не подвергнута стимулу (например, антиген) (Фиг. 18А), или взаимодействует с антигеном, который не может связаться с трансмембранным эффекторным модулем (Фиг. 18В), или только антигеном, который активирует трансмембранный эффекторный модуль и подготавливает принимающий Т-лимфоцит к экспрессии второго эффектора (Фиг. 18С), принимающий Т-лимфоцит остается неактивным. Когда оба стимула (например, два антигена), которые связываются с трансмембранным эффекторным модулем и подготавливающим эффектором, присутствуют на презентующей клетке (например, раковой клетке), активируется Т-лимфоцит (Фиг. 18d).

[0077] Фиг. 19А представляет собой столбчатую диаграмму, изображающую уровни ИЛ12 в различных разведениях среды, полученной из клеток, экспрессирующих ДД-ИЛ12. Фиг. 19В представляет собой столбчатую диаграмму, изображающую зависимость от дозы Shield-1 индукцию ДД-ИЛ12. Фиг. 19С иллюстрирует плазменные уровни ИЛ12 у мышей с имплантированными клетками SKOV3. Фиг. 19D иллюстрирует плазменные уровни ИЛ12 у мышей в ответ на различные схемы введения доз Shield-1.

[0078] Фиг. 20А иллюстрирует Вестерн-блоттинг уровней белка ИЛ15 в клетках 293. Фиг. 20В и 20С представляют собой столбчатые диаграммы, изображающие поверхностную экспрессию ИЛ15 и ИЛ15Ra. Фиг. 20D иллюстрирует Вестерн-блоттинг ИЛ15 и hDNFR в клетках HCT116.

[0079] Фиг. 21А и Фиг. 21В иллюстрирует результаты Вестерн-блоттинга, демонстрирующие уровни белка CD3 дзета конструкции ХАР ДД-CD19, и актина. Фиг. 21С демонстрирует экспрессию химерных антигенных рецепторов CD19 в Вестерн-блоттинге с использованием антитела 4-1ВВ. Фиг. 21D представляет собой столбчатую диаграмму, изображающую поверхностную экспрессию ХАР CD19.

[0080] Фиг. 22 иллюстрирует частоту ИФН-гамма-положительных Т-лимфоцитов.

[0081] Фиг. 23А иллюстрирует продуцирование ИФН-гамма в Т-лимфоцитах. Фиг. 23В иллюстрирует экспансию Т-лимфоцитов при обработке ИЛ15/ИЛ15Ra. Фиг. 23С представляет собой точечную диаграмму, изображающую долю клеток человека после клеточного переноса *in vivo*. Фиг. 23D представляет собой корреляционную диаграмму, изображающую CD4⁺/CD8⁺ Т-клетки.

[0082] Фиг. 24А иллюстрирует субпопуляции Т-лимфоцитов, экспрессирующих ХАР CD19. Фиг. 28В иллюстрирует клеточную гибель, вызванную Т-лимфоцитами, экспрессирующими ХАР CD19.

[0083] Фиг. 25А представляет собой столбчатую диаграмму, изображающую ИЛ15Ra-положительные клетки с 24-часовой обработкой TMP. Фиг. 25В представляет собой столбчатую диаграмму, изображающую ИЛ15Ra-положительные клетки с 48-часовой обработкой TMP. Фиг. 25С представляет собой столбчатую диаграмму, изображающую ИЛ15Ra-положительные клетки в ответ на варьирующие концентрации TMP.

[0084] Фиг. 26 иллюстрирует Вестерн-блоттинг уровней белка ИЛ15Ra в клетках HCT116.

[0085] Фиг. 27А демонстрирует долю человеческих Т-лимфоцитов в крови по отношению к Т-лимфоцитам мыши. Фиг. 27В демонстрирует число Т-лимфоцитов в крови. Фиг. 27С демонстрирует соотношение количества CD4 клеток к CD8 клеткам в крови. Фиг. 27D демонстрирует долю ИЛ15Ra-положительных CD4 и CD8 Т-лимфоцитов в крови.

[0086] Фиг. 28А иллюстрирует экспансию Т-лимфоцитов в ответ на обработки цитокинами. Фиг. 28В, Фиг. 28С и Фиг. 28D иллюстрируют частоту ИФН-гамма-позитивных клеток при обработке ИЛ12.

[0087] Фиг. 29 представляет столбчатую диаграмму, представляющую влияние промоторов на экспрессию трансгена.

[0088] Фиг. 30А демонстрирует экспрессию CD19 в исходных клетках K562 и клетках K562-CD19. Фиг. 30В демонстрирует пролиферацию клеток K562, ко-культивированных с Т-лимфоцитами, экспрессирующими ДД-регулируемые конструкции ХАР, в присутствии или в отсутствие лиганда. Фиг. 30С демонстрирует площадь клеток-мишеней, убитых Т-лимфоцитами, экспрессирующими ДД-регулируемые конструкции ХАР, в присутствии лиганда.

[0089] Фиг. 31А демонстрирует концентрацию ИФН-гамма. Фиг. 31В демонстрирует концентрацию ИЛ-2.

[0090] Фиг. 32А предоставляет данные об конечной концентрации ИЛ12 для каждой из четырех проанализированных групп. Фиг. 32В демонстрирует, что ИЛ-12 обнаруживается в почках, и Фиг. 32С демонстрирует, что ИЛ-12 обнаруживается в опухоли.

[0091] Фиг. 33А демонстрирует регуляцию ИЛ12 в течение 24 часов. Фиг. 33В демонстрирует регуляцию в плазме, и Фиг. 33С демонстрирует обнаружение flexi-ИЛ12 в почках.

[0092] Фиг. 34А демонстрирует то, что рестимуляция повышала экспрессию ИЛ12. Фиг. 34В и Фиг. 34С демонстрируют то, что лиганд увеличил продуцирование ИЛ12.

[0093] Фиг. 35А демонстрирует зависимость от концентрации индукцию секреции ИЛ12 из первичных Т-лимфоцитов человека. Фиг. 35В демонстрирует зависимость от времени индукцию секреции ИЛ12 из первичных Т-лимфоцитов человека.

[0094] Фиг. 36А демонстрирует зависимость от дозы Aquashield-индуцированную регуляцию ДД-ИЛ12 *in vivo*. Фиг. 36В демонстрирует то, что уровни ИЛ12 в плазме остаются высокими у животных, трансплантированных Т-лимфоцитами, трансдуцированными конститутивным ИЛ12.

[0095] Фиг. 37А и 37В демонстрируют экспрессию ИЛ12 *in vivo* в течение 7 дней. Фиг. 37С и 37D демонстрируют экспрессию ИЛ12 *in vivo* в течение 11 дней. Фиг. 37Е демонстрирует значение геометрического МИФ (ГеоМИФ) гранзима В (GRB) через 7 дней в CD8+ Т-лимфоцитах. Фиг. 37F демонстрирует ГеоМИФ перфорина на 7-й день в CD8+ Т-лимфоцитах.

[0096] Фиг. 38А демонстрирует регуляцию ИЛ12 с помощью промоторов PGK и EF1a и доменов FKBP. Фиг. 38В демонстрирует относительную экспрессию ИЛ12.

[0097] Фиг. 39 иллюстрирует кинетику поверхностной экспрессии ИЛ15Ra на CD4 Т-лимфоцитах после обработки TMP.

[0098] Фиг. 40 представляет результаты Вестерн-блоттинга белка ИЛ15-ИЛ15Ra в опухолях НСТ116 у мышей, которых обрабатывали TMP в течение 17 дней в ксенотрансплантатных анализах.

[0099] Фиг. 41 представляет собой график результатов анализа MSD уровней белка ИЛ15 в клетках HEK293.

[00100] Фиг. 42А предоставляет графики FACS, демонстрирующие экспрессию мембран-связанного ИЛ15 после исследования зависимости ответа от дозы TMP. Фиг. 42В представляет собой два графика, демонстрирующих влияние дозы и времени воздействия TMP *in vitro* на экспрессию мембран-связанного ИЛ15.

[00101] Фиг. 43А-43С демонстрируют регуляцию мембран-связанного ИЛ15, с применением окрашивания ИЛ-15 (Фиг. 43А), ИЛ15Ra (Фиг. 43b), или ++ двойного окрашивания ИЛ15/ИЛ15Ra (Фиг. 43С). Фиг. 43D демонстрирует графики FACS экспрессии ИЛ15. Фиг. 43Е представляет собой график регуляции ИЛ15 в крови, и Фиг. 43F представляет собой график уровней TMP в плазме.

[00102] Фиг. 44 предоставляет данные регуляции мембран-связанного ИЛ15 при ПО или ВВ введение доз TMP.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00103] Детали одного или большего количества вариантов осуществления изобретения изложены в прилагаемом описании ниже. Хотя любые материалы и способы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут использоваться при практическом применении или испытании данного

изобретения, предпочтительные материалы и способы описаны здесь. Другие признаки, объекты и преимущества изобретения будут очевидны из описания. В описании, формы единственного числа существительных также включают в себя их множественное число, если контекст явно не указывает на иное. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится данное изобретение. В случае конфликта, данное описание будет иметь преимущество.

I. ВВЕДЕНИЕ

[00104] Иммуноterapia рака направлена на индукцию или восстановление реактивности иммунной системы по отношению к раку. Значительные успехи в исследованиях в области иммунотерапии привели к разработке различных стратегий, которые можно в целом классифицировать на активную иммуноterapia и пассивную иммуноterapia. В целом, как правило, эти стратегии могут быть использованы для прямого уничтожения раковых клеток или для противодействия иммуносупрессивному микроокружению опухоли. Активная иммуноterapia направлена на индукцию эндогенного, продолжительного специфичного для опухолевого антигена иммунного ответа. Ответ может быть дополнительно усилен неспецифической стимуляцией модификаторов иммунного ответа, таких как цитокины. Напротив, пассивная иммуноterapia включает в себя подходы, в которых хозяину вводят иммунные эффекторнeе молекулы, такие как опухолевый антиген-специфические цитотоксические Т-лимфоциты или антитела. Этот подход недолговечный и требует множественного применения.

[00105] Несмотря на значительные успехи, эффективность современных стратегий иммунотерапии ограничена сопутствующими токсичностями. Они часто связаны с узким терапевтическим окном, ассоциированным с иммунотерапией, которое отчасти возникает из-за необходимости подтолкнуть терапевтическую дозу к границе потенциально смертельной токсичности, чтобы получить клинически значимый терапевтический эффект. Кроме того, доза увеличивается *in vivo*, поскольку адаптивно переносимые иммунные клетки продолжают пролиферировать внутри пациента, часто непредсказуемо.

[00106] Основным риском, связанным с иммунотерапией, являются побочные эффекты при поражении цели, но не опухоли, вызванные активацией Т-лимфоцитов в ответ на нормальную тканевую экспрессию опухоль-ассоциированного антигена (АОА). Клинические испытания с использованием Т-лимфоцитов, экспрессирующих Т-клеточный рецептор к специфическому АОА, сообщали о кожной сыпи, колите и потере слуха в ответ на иммуноterapia.

[00107] Иммуноterapia может также вызывать токсичность при поражении цели на опухоли, которая возникает при гибели опухолевых клеток в ответ на иммуноterapia. Побочные эффекты включают в себя синдром лизиса опухоли, синдром высвобождения цитокинов и родственньи синдром активации макрофагов. Важно отметить, что эти побочные эффекты могут возникать при разрушении опухолей, и, таким образом, даже успешная иммуноterapia, воздействующая на опухоль, может привести к токсичности. Подходы к регулируемому контролю иммунотерапии, таким образом, очень желательны, поскольку они могут снизить токсичность и максимизировать эффективность.

[00108] Данное изобретение обеспечивает системы, композиции, иммунотерапевтические агенты и способы иммунотерапии рака. Данные композиции обеспечивают настраиваемую регуляцию экспрессии генов и функции при иммунотерапии. Согласно данному изобретению также предложены биоконтурные системы, эффекторные модули, элементы ответа на стимул (ЭОС) и полезные грузы, а также полинуклеотиды, кодирующие любое из вышеперечисленного. В одном аспекте, системы, композиции,

иммунотерапевтические агенты и другие компоненты изобретения могут контролироваться отдельно добавляемым стимулирующим агентом, который обеспечивает значительную гибкость в регуляции иммунотерапии рака. Дополнительно, системы, композиции и способы согласно данному изобретению также можно комбинировать с терапевтическими агентами, такими как химиотерапевтические агенты, малые молекулы, генная терапия и антитела.

[00109] Настраиваемая природа систем и композиций согласно данному изобретению обладает потенциалом для повышения активности и продолжительности эффективности иммунотерапии. Обратимое подавление биологической активности адаптивно переносимых клеток с использованием композиций согласно данному изобретению позволяет максимизировать потенциал клеточной терапии без необратимого уничтожения и прекращения терапии.

[00110] Согласно данному изобретению предложены способы тонкой настройки иммунотерапии после введения пациентам. Это, в свою очередь, повышает безопасность и эффективность иммунотерапии и увеличивает популяцию субъектов, которые могут получить пользу от иммунотерапии.

II. КОМПОЗИЦИИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00111] Согласно данному изобретению предложены биоконтурные системы, которые содержат в своей основе, по меньшей мере, одну эффекторную модульную систему. Такие эффекторные модульные системы содержат, по меньшей мере, один эффекторный модуль, связанный или интегрированный с один или большим количеством элементов ответа на стимул (ЭОС). Общая архитектура биоконтурной системы согласно данному изобретению показана на Фиг. 1. В целом, как правило, элемент ответа на стимул (ЭОС) может быть функционально связан с конструкцией полезного груза, которая может представлять собой любой представляющий интерес белок (ПИБ) (например, иммунотерапевтический агент), для формирования эффекторного модуля. ЭОС, когда активируется определенным стимулом, например, малой молекулой, может создавать сигнал или эффект для регуляции транскрипции и/или уровней белка связанного полезного груза либо повышая их, либо понижая, путем закрепления стабилизирующего сигнала или дестабилизирующего сигнала, или любого другого вида регуляции. Более подробное описание биоконтурной системы можно найти в предварительной заявке на патент США № 62/320864, поданной 11 апреля 2016 года, или в предварительной заявке США № 62/466 596, поданной 3 марта 2017 года, и международной публикации WO2017/180587 (содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). В соответствии с данным изобретением предлагаются биоконтурные системы, эффекторные модули, ЭОС и компоненты, которые регулируют уровни экспрессии и активность любых агентов, используемых для иммунотерапии.

[00112] Как применяется в данном документе, термин «биоконтур» или «биоконтурная система» определяется как контур внутри биологических систем или полезный в биологических системах, содержащий стимул и, по меньшей мере, один эффекторный модуль, реагирующий на стимул, причем реакция на стимул производит, по меньшей мере, один сигнал или исход внутри, между, в качестве индикатора, или в/на биологической(ую) системе(у). Под биологическими системами в целом, как правило, понимают любую клетку, ткань, орган, систему органов или организм, будь то животное, растение, грибы, бактерии или вирусы. Также понятно, что биоконтурные могут быть искусственными контурами, которые используют стимулы или эффекторные модули, описанные в данном изобретении, и влияют на сигналы или эффекты в бесклеточных моделях, таких как диагностические, репортерные системы, устройства,

аналитические системы или наборы. Искусственные схемы могут быть связаны с одним или большим количеством электронных, магнитных или радиоактивных компонентов или частей.

[00113] В соответствии с данным изобретением биоконтурная система может представлять собой биоконтурную систему дестабилизирующего домена (ДД), биоконтурную систему димеризации, биоконтурную систему рецептора и клеточную биоконтурную систему. Любая из таких систем может выступать в качестве сигнала для любой другой из таких биоконтурных систем.

Эффекторные модули и ЭОС для иммунотерапии

[00114] В соответствии с данным изобретением предлагаются биоконтурные системы, эффекторные модули, ЭОС и компоненты, которые регулируют уровни экспрессии и активность любых агентов, используемых для иммунотерапии. В качестве неограничивающих примеров иммунотерапевтический агент может представлять собой антитело и его фрагменты и варианты, рак-специфический рецептор Т-лимфоцитов (ТКР) и его варианты, анти-опухоль специфический химерный антигенный рецептор (ХАР), химерный переключающий рецептор, ингибитор коингибирующего рецептора или лиганда, агонист костимулирующего рецептора и лиганда, цитокин, хемокин, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор, растворимый фактор роста, метаболический фактор, ген самоуничтожения, «хоминг»-рецептор или любой агент, который вызывает иммунный ответ в клетке и субъекте.

[00115] Как указано, биоконтурные согласно данному изобретению включают в себя, по меньшей мере, один эффекторный модуль в качестве компонента системы эффекторных модулей. Как применяется в данном документе, термин «эффекторный модуль» представляет собой одно- или мультикомпонентную конструкцию или комплекс, содержащий по меньшей мере (а) один или большее количество элементов ответа на стимул (то есть представляющих интерес белков (ПИБ)). Как применяется в данном документе, термин «элемент ответа на стимул (ЭОС)» представляет собой компонент эффекторного модуля, который соединяют, присоединяют, связывают или объединяют с одним или большим количеством полезных грузов эффекторного модуля, и в некоторых случаях отвечает за способность эффекторного модуля реагировать на один или большее количество стимулов. Как применяется в данном документе, термин способность «реагировать» ЭОС на стимул может характеризоваться ковалентным или нековалентным взаимодействием, прямой или косвенной ассоциацией или структурной или химической реакцией на стимул. Кроме того, ответ любого ЭОС на стимул может быть вопросом степени или вида. Ответ может быть частичным ответом. Ответ может быть обратимым ответом. Ответ может в конечном итоге привести к регулируемому сигналу или эффекту. Такой выходной сигнал может быть условного характера относительно стимула, например, вызывая эффект модуляции от 1% до 100% или фактическое увеличение или уменьшение, такое как 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное, 10-кратное или больше.

[00116] В некоторых вариантах осуществления, согласно данному изобретению предложены способы модуляции экспрессии, функции или уровня белка. В некоторых аспектах, модуляция экспрессии, функции или уровня белка относится к модуляции экспрессии, функции или уровня по меньшей мере на около 20%, например по меньшей мере на около 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% и 100%, или по меньшей мере на 20-30%, 20-40%, 20-50%, 20-60%, 20-70%, 20-80%, 20-90%, 20-95%, 20-100%, 30-40%, 30-50%, 30-60%, 30-70%, 30-80%, 30-90%, 30-95%, 30-100%, 40-50%, 40-60%, 40-70%, 40-80%, 40-90%, 40-95%, 40-100%, 50-60%, 50-70%, 50-80%, 50-90%, 50-95%, 50-100%, 60-70%, 60-80%, 60-90%, 60-95%, 60-100%, 70-80%, 70-90%, 70-95%, 70-100%, 80-90%, 80-95%, 80-100%, 90-95%, 90-100% или 95-100%.

[00117] В некоторых вариантах осуществления, согласно данному изобретению предложены способы модуляции экспрессии, функции или уровня белка путем измерения коэффициента стабилизации и коэффициента дестабилизации. Как применяется в данном документе, коэффициент стабилизации может быть определен как отношение экспрессии, функции или уровня представляющего интерес белка в ответ на стимул к экспрессии, функции или уровню представляющего интерес белка в отсутствие стимула, специфичного для ЭОС. В некоторых аспектах, коэффициент стабилизации составляет по меньшей мере 1, например по меньшей мере 1-10, 1-20, 1-30, 1-40, 1-50, 1-60, 1-70, 1-80, 1-90, 1-100, 20-30, 20-40, 20-50, 20-60, 20-70, 20-80, 20-90, 20-95, 20-100, 30-40, 30-50, 30-60, 30-70, 30-80, 30-90, 30-95, 30-100, 40-50, 40-60, 40-70, 40-80, 40-90, 40-95, 40-100, 50-60, 50-70, 50-80, 50-90, 50-95, 50-100, 60-70, 60-80, 60-90, 60-95, 60-100, 70-80, 70-90, 70-95, 70-100, 80-90, 80-95, 80-100, 90-95, 90-100 или 95-100. Как применяется в данном документе, коэффициент дестабилизации может быть определен как отношение экспрессии, функции или уровня представляющего интерес белка в отсутствие стимула, специфичного для эффекторного модуля, к экспрессии, функции или уровню представляющего интерес белка, который конститутивно экспрессируется и в отсутствие стимула, специфичного для ЭОС. Как применяется в данном документе, термин «конститутивно» относится к экспрессии, функции или уровню представляющего интерес белка, который не связан с ЭОС, и, следовательно, экспрессируется как в присутствии, так и в отсутствие стимула. В некоторых аспектах, коэффициент дестабилизации составляет по меньшей мере 0, например по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или по меньшей мере 0-0,1, 0-0,2, 0-0,3 0-0,4, 0-0,5, 0-0,6, 0-0,7, 0-0,8, 0-0,9, 0,1-0,2, 0,1-0,3, 0,1-0,4, 0,1-0,5, 0,1-0,6, 0,1-0,7, 0,1-0,8, 0,1-0,9, 0,2-0,3, 0,2-0,4, 0,2-0,5, 0,2-0,6, 0,2-0,7, 0,2-0,8, 0,2-0,9, 0,3-0,4, 0,3-0,5, 0,3-0,6, 0,3-0,7 0,3-0,8, 0,3-0,9, 0,4-0,5, 0,4-0,6, 0,4-0,7, 0,4-0,8, 0,4-0,9, 0,5-0,6, 0,5-0,7, 0,5-0,8, 0,5-0,9, 0,6-0,7, 0,6-0,8, 0,6-0,9, 0,7-0,8, 0,7-0,9 или 0,8-0,9.

[00118] В некоторых вариантах осуществления, стимул согласно данному изобретению может быть ультразвуковой стимуляцией. В некоторых вариантах осуществления, ЭОС согласно данному изобретению могут происходить из механочувствительных белков. В одном варианте осуществления, ЭОС согласно данному изобретению может представлять собой механически чувствительный ионный канал, Piezo1.

[00119] Экспрессия груза интереса в таких случаях настраивается с помощью фокусированной ультразвуковой стимуляции. В других вариантах осуществления, ЭОС согласно данному изобретению могут быть получены из кальциевых биосенсоров, а стимул согласно данному изобретению может представлять собой кальций. Кальций может быть получен механической стимуляцией механочувствительных ионных каналов, индуцированной ультразвуком. Ультразвуковая активация ионного канала вызывает приток кальция, тем самым создавая стимул. В одном варианте осуществления, механочувствительный ионный канал представляет собой Piezo 1. Механосенсоры могут иметь преимущества в использовании, так как они обеспечивают пространственный контроль в определенном месте тела.

[00120] ЭОС эффекторного модуля может быть выбран из, но не ограничивается лишь этими: пептида, пептидного комплекса, пептид-белкового комплекса, белка, гибридного белка, белкового комплекса, белок-белкового комплекса. ЭОС может содержать одну или большее количество областей, полученных из любого природного или мутированного белка, или антитела. В данном аспекте, ЭОС является элементом, который когда реагирует на стимул, может регулировать внутриклеточную локализацию, внутримолекулярную активацию и/или деструкцию полезных грузов.

[00121] В некоторых вариантах осуществления, эффекторные модули согласно данному изобретению могут содержать дополнительные элементы, которые облегчают экспрессию и регуляцию эффекторного

модуля, такие как одна или большее количество сигнальных последовательностей (СП), один или большее количество сайтов расщепления и/или процессинга, один или большее количество пептидов нацеливания и/или проникновения, один или большее количество тэгов и/или один или большее количество линкеров. Кроме того, эффекторные модули согласно данному изобретению могут дополнительно содержать другие регуляторные фрагменты, такие как индуцибельные промоторы, энхансерные последовательности, сайты микроРНК и/или сайты нацеливания микроРНК. Каждый аспект или регулируемая модальность могут привести в эффекторный модуль или биоконтур отдельно настраиваемый элемент. Например, ЭОС может представлять собой дестабилизирующий домен, в то время как мутации в белковом полезном грузе могут изменять его сайты расщепления, или свойства димеризации, или время полужизни, а включение одной или большего количества микроРНК или сайтов связывания микроРНК может влиять на клеточные признаки ненацеливания или переноса. Следовательно, данное изобретение охватывает биоконтуры, которые являются мультифакторными по своей обоснованности. Такие биоконтуры могут быть сконструированы так, чтобы они содержали один, два, три, четыре или большее количество регулируемых элементов.

[00122] В некоторых вариантах осуществления, эффекторные модули согласно данному изобретению могут включать в себя один или большее количество дегронов для регуляции экспрессии. Как применяется в данном документе, «дегрон» относится к минимальной последовательности в белке, достаточной для распознавания и деградации протеолитической системой. Важным свойством дегронов является то, что они являются перемещаемыми, то есть добавление дегрона к последовательности обеспечивает деградацию последовательности. В некоторых вариантах осуществления, дегрон может быть присоединен к дестабилизирующим доменам, полезному грузу или обоим. Внесение дегрона в эффекторный модуль согласно изобретению наделяет дополнительной белковой нестабильностью эффекторный модуль и может использоваться для минимизации базисной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, дегрон может представлять собой N-дегрон, фосфодегрон, индуцируемый теплом дегрон, светочувствительный дегрон, кислородзависимый дегрон. В качестве неограничивающего примера дегрон может представлять собой орнитиндекарбоксилазный дегрон, как описано Takeuchi et al. (Takeuchi J et al. (2008). *Biochem J.* 2008 Mar 1;410(2):401-7; содержание которых включено посредством ссылки в полном объеме). Другие примеры дегронов, полезных в данном изобретении, включают в себя дегроны, описанные в международных патентных публикациях № WO2017004022, WO2016210343 и WO2011062962; содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00123] Как показано на Фиг. 2, продемонстрированы варианты осуществления типичного эффекторного модуля, содержащего один полезный груз, то есть один иммунотерапевтический агент. Каждый компонент эффекторного модуля может быть расположен или размещен различными способами без (от A до F) или с (от G до Z и от AA до DD) сайтом расщепления. Необязательный линкер может быть вставлен между каждым компонентом эффекторного модуля.

[00124] На Фиг. 3-6 показаны типичные варианты осуществления эффекторного модуля, содержащего два полезных груза, то есть два иммунотерапевтических агента. В некоторых аспектах, больше чем два иммунотерапевтических агента (полезных груза) могут быть включены в эффекторный модуль под управлением одного и того же ЭОС (например, одного и того же DD). Два или большее количество агентов могут быть либо напрямую соединены друг с другом, либо разделены (Фиг. 3). ЭОС может быть расположен на N-конце конструкции, или на C-конце конструкции, или во внутренней области.

[00125] В некоторых аспектах, два или большее количество иммунотерапевтических агентов могут быть одного типа, например два антитела, или разных типов, например конструкция ХАР и цитокин ИЛ12. Биоциклы и компоненты, использующие такие эффекторные молекулы, приведены на Фиг. 7-12.

[00126] В некоторых вариантах осуществления, биоконтуры согласно изобретению могут быть модифицированы для снижения их иммуногенности. Иммуногенность является результатом сложной серии ответов на вещество, которое воспринимается как чужеродное, и может включать в себя выработку нейтрализующих и ненейтрализующих антител, формирование иммунных комплексов, активацию комплемента, активацию тучных клеток, воспаление, реакции гиперчувствительности и анафилаксию. Несколько факторов могут способствовать иммуногенности белка, включая, но не ограничиваясь лишь этими: последовательность белка, путь и частоту введения и популяцию пациентов. В предпочтительном варианте осуществления, белковая инженерия может использоваться для снижения иммуногенности композиций согласно данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления, модификации для снижения иммуногенности могут включать в себя модификации, которые уменьшают связывание процессированных пептидов, полученных из исходной последовательности, с белками ГКГС. Например, модификации аминокислот могут быть сконструированы таким образом, чтобы отсутствовало или было минимальным количество иммунных эпитопов, которые, как предсказывают, будут связываться с высокой аффинностью с любыми распространенными аллелями ГКГС. В данной области техники известно несколько способов идентификации эпитопов, связывающихся с ГКГС, с известными белковыми последовательностями, и их можно использовать для определения количества эпитопов в композициях согласно данному изобретению. Такие способы раскрыты в публикациях патентов США № US 20020119492, US 20040230380 и US 20060148009; содержания которых включены посредством ссылки в полном объеме.

[00127] Идентификация эпитопа и последующая модификация последовательности могут применяться для снижения иммуногенности. Идентификация иммуногенных эпитопов может быть достигнута либо физически, либо путем вычислений. Физические способы идентификации эпитопов могут включать в себя, например, масс-спектрометрию и методы тканевого/клеточного культивирования. Могут также быть использованы вычислительные подходы, которые используют информацию, полученную при процессинге антигена, загрузке и отображении, структурные и/или протеомные данные, для идентификации несобственных пептидов, которые могут возникнуть в результате процессинга антигена и которые, вероятно, будут иметь хорошие характеристики связывания в канавке ГКГС. Согласно данному изобретению могут быть введены одна или большее количество мутаций в биоконтуры, управляющие экспрессией белка, чтобы сохранить его функциональность, одновременно делая менее иммуногенным или неиммуногенным идентифицированный эпитоп.

[00128] В некоторых вариантах осуществления, в данном изобретении также могут быть полезны модификации белка, введенные в структуру композиций согласно данному изобретению для вмешательства в процессинг антигена и загрузку пептидов, такие как гликозилирование и ПЭГилирование. Композиции согласно данному изобретению также могут быть сконструированы так, чтобы включать в себя неклассические аминокислотные боковые цепи для конструирования менее иммуногенных композиций. Любой из способов, обсуждаемых в международной патентной публикации № WO2005051975 для снижения иммуногенности, может быть полезен в данном изобретении (содержание которого включено посредством ссылки в полном объеме).

[00129] В одном варианте осуществления, пациенты также могут быть стратифицированы в соответствии с иммуногенными пептидами, представленными их иммунными клетками, и могут использоваться в качестве параметра для определения подходящих групп пациентов, которые могут получать терапевтическую пользу от композиций согласно данному изобретению.

[00130] В некоторых вариантах осуществления, сниженная иммуногенность может быть достигнута путем ограничения процессинга иммунопротеосомами. Протеосома является важной клеточной протеазой, которая обнаруживается в двух формах: конститутивная протеосома, которая экспрессируется во всех типах клеток и которая содержит активные, например, каталитические субъединицы и иммунопротеосома, которая экспрессируется в клетке гематопоетической линии и которая содержит различные активные субъединицы, называемые низкомолекулярными белками (LMP), а именно LMP-2, LMP-7 и LMP-10. Иммунопротеосомы демонстрируют измененную пептидазную активность и предпочтения сайтов расщепления, которые дают более эффективное высвобождение многих эпитопов ГКГС класса I. Хорошо описанная функция иммунопротеосомы состоит в том, чтобы создавать пептиды с гидрофобным С-концом, которые могут быть процессированы для вписывания в бороздку молекул ГКГС класса I. Deol P et al. показали, что иммунопротеосомы могут приводить к частому расщеплению специфических пептидных связей и, следовательно, к более быстрому появлению определенного пептида на поверхности антиген-презентирующих клеток; и увеличению количества пептидов (Deol P et al. (2007) J Immunol. 178 (12) 7557-7562; содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Данное исследование показывает, что снижение иммунопротеосомного процессинга может сопровождаться снижением иммуногенности. В некоторых вариантах осуществления, иммуногенность композиций согласно данному изобретению может быть снижена путем модификации последовательности, кодирующей композиции согласно данному изобретению, для предотвращения иммунопротеосомного процессинга. Биоциклы согласно данному изобретению также можно комбинировать с иммунопротеосома-селективными ингибиторами для достижения тех же эффектов. Примеры ингибиторов, полезных в данном изобретении, включают в себя UK-101 (селективное соединение B1i), IPSI-001, ONX 0914 (PR-957) и PR-924 (IPSI).

1. Дестабилизирующие домены (ДД)

[00131] В некоторых вариантах осуществления, биоконтурные системы, эффекторные модули и композиции согласно данному изобретению относятся к посттрансляционной регуляции функции белка (полезного груза) противоопухолевого иммунного ответа иммунотерапевтических агентов. В одном варианте осуществления, ЭОС представляет собой стабилизирующий/дестабилизирующий домен (ДД). Присутствие, отсутствие или количество лиганда-малой молекулы, который связывается с ДД или взаимодействует с ним, может при таком связывании или взаимодействии модулировать стабильность полезного груза(-ов) и, следовательно, функцию полезного груза. В зависимости от степени связывания и/или взаимодействия измененная функция полезного груза может меняться, следовательно, обеспечивая «регуляцию» функции полезного груза.

[00132] В некоторых вариантах осуществления, дестабилизирующие домены, описанные в данном документе или известные в данной области техники, могут использоваться в качестве ЭОС в биоконтурных системах согласно данному изобретению в комбинации с любым из иммунотерапевтических агентов (полезные грузы), описанных в данном документе. Дестабилизирующие домены (ДД) представляют собой небольшие белковые домены, которые могут быть добавлены к целевому белку, представляющему интерес.

ДД делают нестабильным прикрепленный белок интереса в отсутствие ДД-связывающегося лиганда, так что белок быстро разрушается убиквитин-протеосомной системой клетки (Stankunas, K., et al., *Mol. Cell*, 2003, 12: 1615–1624; Banaszynski, et al., *Cell*; 2006, 126(5): 995–1004; рассмотрено в Banaszynski, L.A., и Wandless, T.J. *Chem. Biol.*; 2006, 13:11–21 и Rakhit R et al., *Chem Biol.* 2014; 21(9):1238-1252). Однако, когда специфический лиганд-малая молекула связывает свой целевой ДД в качестве лиганд-связывающего партнера, нестабильность изменяется и функция белка восстанавливается. Зависящий от условий характер стабильности ДД делает возможным быстрый и не искаженный переход от стабильного белка к нестабильному субстрату для деградации. Кроме того, его зависимость от концентрации его лиганда дополнительно обеспечивает настраиваемый контроль скорости деградации.

[00133] В некоторых вариантах осуществления, желательные характеристики ДД могут включать в себя, но не ограничиваются лишь этими: низкие уровни белка в отсутствие лиганда ДД (т. е. низкая базовая стабильность), большой динамический диапазон, надежный и предсказуемый характер дозы-ответа, и быстрая кинетика деградации. ДД, которые связываются с желаемым лигандом, но не с эндогенными молекулами, могут быть предпочтительными.

[00134] Несколько белковых доменов с дестабилизирующими свойствами и их спаренные малые молекулы были идентифицированы и использованы для контроля экспрессии белка, включая систему FKBP/shield-1 (Egeler et al., *J Biol. Chem.* 2011, 286(36): 32328-31336; содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме), есDHFR и его лиганд триметоприм (TMP); домены рецептора эстрогена, которые могут регулироваться несколькими антагонистами рецептора эстрогена (Miyazaki et al., *J Am Chem. Soc.*, 2012, 134(9): 3942-3945; содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме); и флуоресцентный дестабилизирующий домен (ФДД), полученный из индуцируемого билирубином флуоресцентного белка, UnaG и его родственный лиганд билирубин (БР) (Navarro et al., *ACS Chem Biol.*, 2016, June 6; содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

[00135] Известные ДД также включают в себя те, которые описанные в патенте США № 8173792 и патенте США № 8530636, содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00136] В некоторых вариантах осуществления, ДД согласно данному изобретению могут быть получены из некоторых известных последовательностей, для которых была проверена способность посттрансляционной регуляции белков. Например, Xiong et al. продемонстрировали, что некаталитический N-концевой домен (54 остатка) ACS7 (1-аминоциклопропан-1-карбоксилатсинтазы) в *Arabidopsis* при слиянии с репортером β-глюкуронидазы (GUS), может значительно уменьшить накопление гибридного белка GUS (Xiong et al., *J. Exp. Bot.*, 2014, 65(15): 4397-4408). Xiong et al. дополнительно продемонстрировали, что как обработка экзогенной 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислотой (ACC), так и солью могут восстанавливать уровни накопления N-концевого ACS и гибридного белка GUS. N-конец ACS опосредует регуляцию стабильности ACS7 через протеосомный путь убиквитин-26S.

[00137] Другим неограничивающим примером является область контроля стабильности (ОКС, остатки 97-118) тропомиозина (Tm), которая контролирует стабильность белка. Дестабилизирующая мутация L110A и стабилизирующая мутация A109L существенно влияют на динамику белка тропомиозина (Kirwan and Hodges, *J. Biol. Chem.*, 2014, 289: 4356-4366). Такие последовательности могут быть подвергнуты скринингу на наличие лигандов, которые связывают их и регулируют их стабильность. Идентифицированные

последовательности и пары лигандов могут быть использованы в качестве компонентов согласно данному изобретению.

[00138] В некоторых вариантах осуществления, ДД согласно данному изобретению могут быть получены из известных белков. Области или части или домены белков дикого типа могут использоваться в качестве ЭОС/ДД полностью или частично. Они могут быть объединены или реорганизованы для создания новых пептидов, белков, областей или доменов, любые из которых могут быть использованы в качестве ЭОС/ДД или в качестве отправной точки для конструирования дополнительных ЭОС и/или ДД.

[00139] Лиганды, такие как малые молекулы, которые, как известно, связывают белки-кандидаты, могут быть проверены на их регуляцию в ответах белков. Малые молекулы могут быть клинически одобрены, чтобы быть безопасными и иметь соответствующую фармацевтическую кинетику и распределение. В некоторых вариантах осуществления, стимул представляет собой лиганд дестабилизирующего домена (ДД), например, малую молекулу, которая связывается с дестабилизирующим доменом и стабилизирует ПИБ, слитый с дестабилизирующим доменом. В некоторых вариантах осуществления, лиганды, ДД и ЭОС согласно данному изобретению включают в себя, без ограничения, любые из тех, которые описаны в Таблицах 2-4, совместно рассматриваемой и находящейся в совместном владении предварительной заявки на патент США № 62/320864, поданной 4/11/2016, или в предварительной заявке США № 62/466,596, поданной 3 марта 2017 года, и международной публикации WO2017/180587, содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Некоторые примеры белков, которые могут быть использованы для проектирования ДД и их лигандов, перечислены в Таблице 1.

Таблица 1: Белки и их связывающиеся лиганды

Белок	Последовательность белка	SEQ ID NO: белка	Лиганды
Дигидрофолатредуктаза <i>E. coli</i> (ecDHFR) (Uniprot ID: P0ABQ4)	MISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADL AWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGR KNILSSQPGTDDRVTWVKSVDEAIAACG DVPEIMVIGGGRVYEQFLPKAQKLYLTHI DAVEGDTHFPDYEPPDWESVFSEFHDA DAQNSHSYCFEILERR	1	Метотрексат (MTX) Триметоприм (TMP)
Дигидрофолатредуктаза человека (hDHFR) (Uniprot ID: P00374)	MVGSLNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPL RNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKK TWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQG AHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDF ESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEE KGIKYKFEVYEKND	2	Метотрексат (MTX) Триметоприм (TMP)
FK506	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTG	3	Shield-1

связывающий белок (FKBP) (Uniprot ID: P62942)	MLEDGKKFDSSDRNKPFFMLGKQEV RGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGA TGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE		
Фосфодиэстераз а 5 (PDE5), лиганд- связывающий домен (Uniprot ID: Uniprot ID O76074)	MEETRELQSLAAAVVPSAQTDLTDFSF DFELSDLETALCTIRMFTDLNLVQNFQMK HEVLCRWILSVKKNYRKNVAYHNWRHA FNTAQCMFAALKAGKIQNKLTDLLEILALL IAALSHDLDRGVNNSYIQRSEHPLAQLY CHSIMEHHHFDQCLMILNSPGNQILSGLSI EEYKTTLKIIKQAILATDLALYIKRRGEFFE LIRKNQFNLEDPHQKELFLAMLTACDLS AITKPWPIQQRIAELVATEFFDQGDREKE LNIEPTDLMNREKKNKIPSMQVGFIDAICL QLYEALTHVSEDCFPLLDGCRKNRQKWQ ALAEQQ	4	Силденафил; Варденафил; Тадалафил
PPAR гамма, лиганд- связывающий домен (Uniprot ID: P37231; аминокислоты 317-505)	SVEAVQEITEYAKSIPGFVNLDLNDQVTL LKYGVHEIITYTMLASLMNKDGVLISEGQG FMTREFLKSRLKPFQDFMEPKFEFAVKFN ALELDDSDLAIFIAVILSGDRPGLLNKPI EDIQDNLLQALELQLKLNHPESQLFAKL LQKMTDLRQIVTEHVQLLQVIKKTETDMS LHPLLQEIKDLY	5	Позиглитазон Пиоглитазон
Карбоангидраза II (CA2) (Uniprot ID: P00918)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGER QSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPL DGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKK KYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDG LAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKT KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSL TTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRK LNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQI KASFK	6	Целекоксиб Ацетозоламид
NRH: Хинооксидоред уктаза 2 (NQO2) (Uniprot ID: P16083)	MAGKKVLIVYAHQEPKSFNGSLKNVAVD ELSRQGCTVTVDLYAMNLEPRATDKDIT GTLSNPEVFNYGVETHEAYKQRSASDIT DEQKKVREADLVIFQFPLYWFSVPAILKG WMDRVLCQGFAFDIPGFYDSGLLQGKLA LLSVTTGGTAEMYTKTGNGDSRYFLWP LQHGTLHFCGFKVLAPQISFAPEIASEEER KGMVAAWSQRLQTIWKEEPICTAHWHF	7	Иматиниба Мелатонин

	GQ		

[00140] В некоторых вариантах осуществления, ДД согласно данному изобретению могут быть ДД FKBP или ДД ecDHFR, такими как перечисленные в Таблице 2. Позиция мутированной аминокислоты, указанная в Таблице 2, является относительной к ecDHFR (Uniprot ID: P0ABQ4) SEQ ID NO. 1 для ДД ecDHFR и относительно FKBP (идентификатор Uniprot: P62942) SEQ ID NO. 3 для ДД FKBP.

Таблица 2: ДД ecDHFR и ДД FKBP

ДД	Последовательность	SEQ ID NO:
ecDHFR (R12Y, Y100I)	MISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNT LNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNILSSQPGTDDRVT TWVKSVDIAAAGCDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQ KLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDAD AQNSHSYCFEILERR	8
ecDHFR (аминокислота 2-159 ДТ) (R12Y, Y100I)	ISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTL NKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNILSSQPGTDDRVT WVKSVDIAAAGCDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQK LYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADA AQNSHSYCFEILERR	9
ecDHFR (аминокислота 2-159 ДТ) (R12H, E129K)	ISLIAALAVDHYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTL NKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNILSSQPGTDDRVT WVKSVDIAAAGCDVPEIMVIGGGRVYEQFLPKAQ KLYLTHIDAEVEGDTHFPDYKPDWESVFSEFHDAD AQNSHSYCFEILERR	10
FKBP (F36V, L106P)	GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGGKK VDSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQ RAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKPE	11
FKBP (E31G, F36V, R71G, K105E)	GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGGKK VDSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQ GAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLELE	12

[00141] Авторы данного изобретения протестировали и идентифицировали несколько кандидатов-белков человека, которые можно использовать для разработки дестабилизирующих доменов. Как показано в Таблице 2, эти кандидаты включают в себя DHFR человека (hDHFR), PDE5 (фосфодиэстераза 5), PPAR гамма (гамма-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом), CA2 (карбоангидраза II) и NQO2 (NRH: Хиноноксидоредуктаза 2). Последовательность дестабилизирующего домена-кандидата, идентифицируемая по белковым доменам этих белков (в качестве матрицы), может быть мутирована для создания библиотек мутантов на основе шаблона последовательности домена-кандидата. Стратегии мутагенеза, используемые для создания библиотек ДД, могут включать в себя сайт-направленный мутагенез, например, используя обеспечиваемую структурой информацию; или случайный мутагенез, например используя подверженную ошибкам ПЦР или комбинацию обоих. В некоторых вариантах

осуществления, дестабилизирующие домены, идентифицированные с использованием случайного мутагенеза, могут использоваться для идентификации структурных свойств кандидатов ДД, которые могут потребоваться для дестабилизации, которые затем могут использоваться для дальнейшего создания библиотек мутаций с использованием сайт-направленного мутагенеза.

[00142] В некоторых вариантах осуществления, новые ДД, полученные из DHFR *E. coli* (ecDHFR), могут содержать аминокислоты 2-159 последовательности ecDHFR дикого типа. Это может упоминаться как мутация M1del.

[00143] В некоторых вариантах осуществления, новые ДД, полученные из ecDHFR, могут содержать аминокислоты 2-159 последовательности ecDHFR дикого типа (также упоминается как мутация M1del) и могут включать в себя одну, две, три, четыре, пять или большее количество мутаций, включая, но не ограничиваясь, M1del, R12Y, R12H, Y100I и E129K.

[00144] В некоторых вариантах осуществления, новые ДД, полученные из FKBP, могут содержать аминокислоты 2-107 последовательности FKBP дикого типа. Это может упоминаться как мутация M1del.

[00145] В некоторых вариантах осуществления, новые ДД, полученные из FKBP, могут содержать аминокислоты 2-107 последовательности FKBP дикого типа (также упоминается как мутация M1del) и могут включать в себя одну, две, три, четыре, пять или большее количество мутаций, включая, но не ограничиваясь, M1del, E31G, F36V, R71G, K105E, и L106P.

[00146] В некоторых вариантах осуществления, библиотеки мутантов ДД могут быть подвергнуты скринингу на мутации с измененной, предпочтительно более высокой аффинностью связывания с лигандом, по сравнению с белком дикого типа. Библиотеки ДД также могут быть подвергнуты скринингу с использованием двух или большего количества лигандов, и могут быть предпочтительно выбраны мутации ДД, которые стабилизируются некоторыми лигандами, но не другими. Также могут быть выбраны мутации ДД, которые связываются преимущественно с лигандом по сравнению с природным белком. Такие способы могут быть использованы для оптимизации отбора лиганда и аффинности связывания лиганда ДД. Кроме того, такие подходы могут использоваться для минимизации вредных эффектов, вызванных связыванием лиганда с не мишенью.

[00147] В некоторых вариантах осуществления, подходящие ДД могут быть идентифицированы путем скрининга библиотек мутантов с использованием штрих-кодов. Такие способы могут использоваться для обнаружения, идентификации и количественного определения отдельных мутантных клонов в гетерогенной библиотеке мутантов. Каждый мутант ДД в библиотеке может иметь различные последовательности штрих-кодов (по отношению друг к другу). В других случаях, полинуклеотиды также могут иметь различные последовательности штрих-кодов в отношении 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или большего количества нуклеотидных оснований. Каждый мутант в библиотеке ДД также может содержать множество последовательностей штрих-кодов. При использовании в количестве больше одного можно использоваться так, чтобы каждый штрих-код был уникальным по отношению к любому другому штрих-коду. В альтернативном варианте, каждый используемый штрих-код может не быть уникальным, но комбинация используемых штрих-кодов может создать уникальную последовательность, которая может отслеживаться отдельно от остальных. Последовательность штрих-кода может быть размещена выше ЭОС, ниже ЭОС или в некоторых случаях может быть размещена в ЭОС. Мутанты ДД могут быть идентифицированы с помощью штрих-кодов с использованием методов секвенирования, таких как секвенирование по Сэнгеру и секвенирование следующего поколения, но также с помощью полимеразной цепной реакции и

количественной полимеразной цепной реакции. В некоторых вариантах осуществления, праймеры для полимеразной цепной реакции, которые амплифицируют продукт разного размера для каждого штрих-кода, могут быть использованы для идентификации каждого штрих-кода на агарозном геле. В других случаях, каждый штрих-код может иметь уникальную последовательность для праймера количественной полимеразной цепной реакции, которая позволяет выполнить целевую амплификацию каждого штрих-кода.

[00148] В некоторых вариантах осуществления, ДД по изобретению могут быть получены из дигидрофолатредуктазы человека (hDHFR). hDHFR - это небольшой (18 кДа) фермент, который катализирует восстановление дигидрофолата и играет жизненно важную роль в разнообразных анаболических путях. Дигидрофолатредуктаза (DHFR) является незаменимым ферментом, который превращает 7,8-дигидрофолат (DHF) в 5,6,7,8, тетрагидрофолат (THF) в присутствии никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH). Анти-фолатные препараты, такие как метотрексат (MTX), структурный аналог фолиевой кислоты, который связывается с DHFR сильнее, чем природный субстрат DHF, препятствуют метаболизму фолата, главным образом за счет ингибирования дигидрофолатредуктазы, что приводит к подавлению синтеза предшественников пуринов и пиримидинов. Другие ингибиторы hDHFR, такие как фолат, TQD, триметоприм (TMP), эпигаллокатехин галлат (EGCG) и ECG (эпикатехин галлат), также могут связываться с мутантами hDHFR и регулировать их стабильность. В одном аспекте изобретения, ДД согласно изобретению могут быть мутантами hDHFR, включая hDHFR с одной мутацией (Y122I), hDHFR (K81R), hDHFR (F59S), hDHFR (I17V), hDHFR (N65D), hDHFR (A107V), hDHFR (N127Y), hDHFR (K185E), hDHFR (N186D), и hDHFR (M140I); с двойной мутацией: hDHFR (M53T, R138I), hDHFR (V75F, Y122I), hDHFR (A125F, Y122I), hDHFR (L74N, Y122I), hDHFR (L94A, T147A), hDHFR (G21T, Y122I), hDHFR (V121A, Y122I), hDHFR (Q36K, Y122I), hDHFR (C7R, Y163C), hDHFR (Y178H, E181G), hDHFR (A10V, H88Y), hDHFR (T137R, F143L), hDHFR (E63G, I176F), hDHFR (T57A, I72A), hDHFR (H131R, E144G), и hDHFR (Y183H, K185E); и с тройной мутацией: hDHFR (Q36F, N65F, Y122I), hDHFR (G21E, I72V, I176T), hDHFR (I8V, K133E, Y163C), hDHFR (V9A, S93R, P150L), hDHFR (K19E, F89L, E181G), hDHFR (G54R, M140V, S168C), hDHFR (L23S, V121A, Y157C), hDHFR (V110A, V136M, K177R), и hDHFR (N49D, F59S, D153G).

[00149] В одном варианте осуществления, стимул представляет собой малую молекулу, которая связывается с ЭОС для посттрансляционной регуляции уровней белка. В одном аспекте, лиганды DHFR: триметоприм (TMP) и метотрексат (MTX) используются для стабилизации мутантов hDHFR. Дестабилизирующие домены на основе hDHFR перечислены в Таблице 3. Позиция мутированной аминокислоты, указанная в Таблице 3, является относительной DHFR человека (Uniprot ID: P00374) SEQ ID NO. 2 для DHFR человека. В Таблице 3 «del» означает, что мутация представляет собой делецию аминокислоты в данной позиции относительно последовательности дикого типа.

Таблица 3: Мутанты DHFR человека и новые дестабилизирующие домены

Мутанты	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
hDHFR (I17V)	MVGSLNCIVAVSQNMGVGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEID	13

	LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	
hDHFR (F59S)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWSSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	14
hDHFR (N65D)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKDRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	15
hDHFR (K81R)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELREPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	16
hDHFR (A107V)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELVNKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	17
hDHFR (Y122I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDL EKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	18
hDHFR (N127Y)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMYHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	19
hDHFR (M140I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIIQDFESDTFFPEIDL EKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	20
hDHFR (K185E)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEEND	21

hDHFR (N186D)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKDD	22
hDHFR (C7R, Y163C)	MVGSLNRIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEID LEKYKLLPECPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	23
hDHFR (A10V, H88Y)	MVGSLNCIVVVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	24
hDHFR (Q36K, Y122I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDL EKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	25
hDHFR (M53T, R138I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTTSSVEGKQNLVITGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTIIMQDFESDTFFPEIDL EKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	26
hDHFR (T57A, I72A)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTTSSVEGKQNLVIMGKKAWSIPEKNRPLKGRANLV LSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMV WIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEI DLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	27
hDHFR (E63G, I176F)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPGKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGFKYKFEVYEKND	28
hDHFR (G21T, Y122I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNTDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLS RELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWI VGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDL EKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	29
hDHFR (L74N, Y122I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR	30

	MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINNVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDL EKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	
hDHFR (V75F, Y122I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLFL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDL EKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	31
hDHFR (L94A, T147A)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDAFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	32
DHFR (V121A, Y22I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSAIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDL EKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	33
hDHFR (Y122I, A125F)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVIKEFMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDL EKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	34
hDHFR (H131R, E144G)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGRLKLFVTRIMQDFGSDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	35
hDHFR (T137R, F143L)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVRRIMQDLESDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	36
hDHFR (Y178H, E181G)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKHKFGVYEKND	37
hDHFR (Y183H, K185E)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL	38

	SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVHEEND	
hDHFR (V9A, S93R, P150L)	MVGSLNCIAAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRRLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFLEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	39
hDHFR (I8V, K133E, Y163C)	MVGSLNCVVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLELFVTRIMQDFESDTFFPEID LEKYKLLPECPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	40
hDHFR (L23S, V121A, Y157C)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDSPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSAYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEID LEKCKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	41
hDHFR (K19E, F89L, E181G)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGENGDLWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLS RELKEPPQGAHLLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWI VGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDL EKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFGVYEKND	42
hDHFR (Q36F, N65F, Y122I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFFRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKFRPLKGRINLVLS RELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWI VGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDL EKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	43
hDHFR (G54R, M140V, S168C)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQNLVIMRKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIVQDFESDTFFPEIDL EKYKLLPEYPGVLCVQEEKGIKYKFEVYEKND	44
hDHFR (V110A, V136M, K177R)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKADMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFMTRIMQDFESDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIRYKFEVYEKND	45
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Q36F, Y122I, A125F)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFFRMT TTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSR ELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV	46

	GGSSVIKEFMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	
hDHFR (N49D, F59S, D153G)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQDLVIMGKKTWSSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIG LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	47
hDHFR (G21E, I72V, I176T)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNEDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRVNLVLS RELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWI VGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDL EKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGTKYKFEVYEKND	48
hDHFR (L100P, E102G, Q103R, P104S, E105G, N108D, V113A, W114R, Y122C, M126I, N127R, H128Y, L132P, F135P, I139T, F148S, F149L, I152V, D153A, D169G, V170A, I176A, K177R, V182A, K185R, N186S)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKPTGRSGLADKVDMAR IVGGSSVCKEAIRYPGHPKLPVTRTMQDFESDTSLPEVA LEKYKLLPEYPGVLSGAQEEKGARYKFEAYERSD	871
hDHFR (V2A, R33G, Q36R, L100P, K185R)	MAGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFGYFRR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKPTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYERND	872
hDHFR (G16S, I17V, F89L, D96G, K123E, M140V, D146G, K156R)	MVGSLNCIVAVSQNMSVGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHLLSRSLDGALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYEEAMNHPGHLKLFVTRIVQDFESGTFFPEIDL ERYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	873
hDHFR (F35L, R37G, N65A, L68S, K69E, R71G, L80P, K99G, G117D, L132P, I139V, M140I, D142G, D146G, E173G, D187G)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYLQG MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKARPSEGGINLVL SREPKEPPQGAHFLSRSLDDALGLTEQPELANKVDMVW IVDGSSVYKEAMNHPGHPKLFVTRVIQGFESGTFFPEIDL EKYKLLPEYPGVLSDVQEGKGIKYKFEVYEKNG	874
hDHFR (I17N, L98S, K99R, M112T, E151G, E162G, E172G)	MVGSLNCIVAVSQNMGNKGNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDASRLTEQPELANKVDTVWI	875

	VGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPGIDL EKYKLLPGYPGVLSDVQGEKGIKYKFEVYEKND	
hDHFR (R138G, D142G, F143S, K156R, K158E, E162G, V166A, K177E, Y178C, K185E, N186S)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTGIMQGESDTEFFPEID LERYELLPGYPGALSVDVQEEKGIECKFEVYEESD	876
hDHFR (K81R, K99R, L100P, E102G, N108D, K123R, H128R, D142G, F180L, K185E)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELREPPQGAHFLSRSLDDALRPTGQPELADKVDMVW IVGGSSVYREAMNRPGLKLFVTRIMQGFESDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKLEVYEEND	877
hDHFR (N14S, P24S, F35L, M53T, K56E, R92G, S93G, N127S, H128Y, F135L, F143S, L159P, L160P, E173A, F180L)	MVGSLNCIVAVSQSMGIGKNGDLSWPPLRNEFRYLQRM TTTSSVEGKQNLVITGKETWFSIPEKNRPLKGRINLVLSR ELKEPPQGAHFLSGGLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV GGSSVYKEAMSYPGHLKLLVTRIMQDSESDTEFFPEIDLE KYKPPPEYPGVLSDVQEAKGIKYKLEVYEKND	878
hDHFR (V2A, I17V, N30D, E31G, Q36R, F59S, K69E, I72T, H88Y, F89L, N108D, K109E, V110A, I115V, Y122D, L132P, F135S, M140V, E144G, T147A, Y157C, V170A, K174R, N186S)	MAGSLNCIVAVSQNMGVGKNGDLPWPPLRDGFRYFRR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWSSIPEKNRPLEGRTNLV LSRELKEPPQGAAYLLSRSLDDALKLTEQPELADEAGMV WVVGSSVDKEAMNHPGHPKLSVTRIVQDFGSDAFFPE IDLEKCKLLPEYPGVLSDAQEERGIKYKFEVYEKSD	879
hDHFR (L28P, N30H, M38V, V44A, L68S, N73G, R78G, A97T, K99R, A107T, K109R, D111N, L134P, F135V, T147A, I152V, K158R, E172G, V182A, E184R)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPRHEFRYFQRV TTTSSAEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPSKGRIGLVLS GELKEPPQGAHFLSRSLDDTLRLTEQPELTNRVNMVWI VGGSSVYKEAMNHPGHLRPVVTRIMQDFESDAFFPEVD LEKYRLLPEYPGVLSDVQGEKGIKYKFEAYRKND	880
hDHFR (A10T, Q13R, N14S, N20D, P24S, N30S, M38T, T40A, K47R, N49S, K56R, I61T, K64R, K69R, I72A, R78G, E82G, F89L, D96G, N108D)	MVGSLNCIVTVSRSMGIGKDGDLSPPLRSEFRYFQRTT ATSSVEGRQSLVIMGKRTWFSTPERNRPLRGRANLVLS GELKGPPQGAHLLSRSLDGALKLTEQPELADKVDDVRI VGGSSVDEEAMNHPGHLKLFVTRVMRGFESDTLFPGID LGKRKLLPEYPGVLSDVREEKGIKYKLEVCGNN	881

M112V, W114R, Y122D, K123E, I139V, Q141R, D142G, F148L, E151G, E155G, Y157R, Q171R, Y183C, E184G, K185del, D187N)		
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; I17V, Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMGVGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLS RELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWI VGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDL EKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	882
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Y122I, M140I)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSR ELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV GGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	883
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; N127Y, Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSR ELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV GGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLE KYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	884
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Y122I, H131R, E144G)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSR ELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV GGSSVIKEAMNHPGRLKLFVTRIMQDFGSDTFFPEIDLE KYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	885
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; D22S, F32M, R33S, Q36S, N65S)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGSLPWPPLRNEMSYFSRMT TTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKSRPLKGRINLVLSR ELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLE KYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	886
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; E31D, F32M, V116I)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNDMRYFQRM TTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLS RELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWII GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLE KYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	887
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; E162G, I176F)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSR ELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLE KYKLLPGYPGVLSDVQEEKGFKYKFEVYEKND	888

hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; K185E)	VGSLNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSR ELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLE KYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEEND	889
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Y122I, A125F)	VGSLNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSR ELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV GGSSVIKEFMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	890
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Q36F, N65F, Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRYFFRMT TTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKFRPLKGRINLVLSR ELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV GGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLE KYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	891
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; N127Y)	VGSLNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSR ELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV GGSSVYKEAMYHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLE KYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	892
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; H131R, E144G)	VGSLNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSR ELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV GGSSVYKEAMNHPGRLKLFVTRIMQDFGSDTFFPEIDLE KYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	893
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; I17V)	VGSLNCIVAVSQNMVGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLS RELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWI VGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDL EKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	894
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSR ELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV GGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLE KYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	895
hDHFR (E162G, I176F)	MVGSLNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQR MTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLV SRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVW IVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEID LEKYKLLPGYPGVLSDVQEEKGFKYKFEVYEKND	896
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; K185E)	VGSLNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRYFKRMT	981

2-187 ДТ; Q36K, Y122I)	TTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSR ELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV GGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLE KYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND	

[00150] В некоторых вариантах осуществления, могут быть предпочтительно выбраны мутации ДД, которые не ингибируют связывание лиганда. В некоторых вариантах осуществления, связывание лиганда может быть улучшено путем мутирования остатков в DHFR. Аминокислотные позиции, выбранные для мутации, включают в себя аспарагиновую кислоту в позиции 22 SEQ ID NO. 2, глутаминовую кислоту в позиции 31 SEQ ID NO. 2; фенилаланин в позиции 32 SEQ ID NO. 2; аргинин в позиции 33 SEQ ID NO. 2; глутамин в позиции 36 SEQ ID NO. 2; аспарагин в позиции 65 SEQ ID NO. 2; и валин в позиции 115 SEQ ID NO. 2. В некоторых вариантах осуществления, одна или большее количество из следующих мутаций могут использоваться в ДД согласно данному изобретению для улучшения связывания TMP, включая, но не ограничиваясь лишь этими: D22S, E31D, F32M, R33S, Q36S, N65S и V116I. Позиция мутированных аминокислот является таковой относительно человеческого DHFR дикого типа (Uniprot ID: P00374) SEQ ID NO. 2.

[00151] В некоторых вариантах осуществления, новые ДД, полученные из DHFR человека, могут содержать одну, две, три, четыре, пять или большее количество мутаций, включая, но не ограничиваясь лишь этими: M1del, V2A, C7R, I8V, V9A, A10T, A10V, Q13R, N14S, G16S, I17N, I17V, K19E, N20D, G21T, G21E, D22S, L23S, P24S, L28P, N30D, N30H, N30S, E31G, E31D, F32M, R33G, R33S, F35L, Q36R, Q36S, Q36K, Q36F, R37G, M38V, M38T, T40A, V44A, K47R, N49S, N49D, M53T, G54R, K56E, K56R, T57A, F59S, I61T, K64R, N65A, N65S, N65D, N65F, L68S, K69E, K69R, R71G, I72T, I72A, I72V, N73G, L74N, V75F, R78G, L80P, K81R, E82G, H88Y, F89L, R92G, S93G, S93R, L94A, D96G, A97T, L98S, K99G, K99R, L100P, E102G, Q103R, P104S, E105G, A107T, A107V, N108D, K109E, K109R, V110A, D111N, M112T, M112V, V113A, W114R, I115V, I115L, V116I, G117D, V121A, Y122C, Y122D, Y122I, K123R, K123E, A125F, M126I, N127R, N127S, N127Y, H128R, H128Y, H131R, L132P, K133E, L134P, F135P, F135L, F135S, F135V, V136M, T137R, R138G, R138I, I139T, I139V, M140I, M140V, Q141R, D142G, F143S, F143L, E144G, D146G, T147A, F148S, F148L, F149L, P150L, E151G, I152V, D153A, D153G, E155G, K156R, Y157R, Y157C, K158E, K158R, L159P, L160P, E162G, Y163C, V166A, S168C, D169G, V170A, Q171R, E172G, E173G, E173A, K174R, I176A, I176F, I176T, K177E, K177R, Y178C, Y178H, F180L, E181G, V182A, Y183C, Y183H, E184R, E184G, K185R, K185del, K185E, N186S, N186D, D187G, и D187N.

[00152] В некоторых вариантах осуществления, новые ДД, полученные из DHFR человека, могут содержать аминокислоты 2-187 последовательности человеческого DHFR дикого типа. Это может упоминаться как мутация M1del.

[00153] В некоторых вариантах осуществления, новые ДД, полученные из DHFR человека, могут содержать аминокислоты 2-187 последовательности человеческого DHFR дикого типа (также упоминается как мутация M1del) и могут содержать одну, две, три, четыре, пять или большее количество мутаций, включая, но не ограничиваясь лишь этими: M1del, V2A, C7R, I8V, V9A, A10T, A10V, Q13R, N14S, G16S, I17N, I17V, K19E, N20D, G21T, G21E, D22S, L23S, P24S, L28P, N30D, N30H, N30S, E31G, E31D, F32M, R33G, R33S, F35L, Q36R, Q36S, Q36K, Q36F, R37G, M38V, M38T, T40A, V44A, K47R, N49S, N49D, M53T, G54R, K56E, K56R, T57A, F59S, I61T, K64R, N65A, N65S, N65D, N65F, L68S, K69E, K69R, R71G, I72T, I72A, I72V, N73G, L74N, V75F, R78G, L80P, K81R, E82G, H88Y, F89L, R92G, S93G, S93R, L94A, D96G,

A97T, L98S, K99G, K99R, L100P, E102G, Q103R, P104S, E105G, A107T, A107V, N108D, K109E, K109R, V110A, D111N, M112T, M112V, V113A, W114R, I115V, I115L, V116I, G117D, V121A, Y122C, Y122D, Y122I, K123R, K123E, A125F, M126I, N127R, N127S, N127Y, H128R, H128Y, H131R, L132P, K133E, L134P, F135P, F135L, F135S, F135V, V136M, T137R, R138G, R138I, I139T, I139V, M140I, M140V, Q141R, D142G, F143S, F143L, E144G, D146G, T147A, F148S, F148L, F149L, P150L, E151G, I152V, D153A, D153G, E155G, K156R, Y157R, Y157C, K158E, K158R, L159P, L160P, E162G, Y163C, V166A, S168C, D169G, V170A, Q171R, E172G, E173G, E173A, K174R, I176A, I176F, I176T, K177E, K177R, Y178C, Y178H, F180L, E181G, V182A, Y183C, Y183H, E184R, E184G, K185R, K185del, K185E, N186S, N186D, D187G, и D187N.

2. Полезные грузы: Иммунотерапевтические агенты

[00154] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут представлять собой иммунотерапевтические агенты, которые индуцируют иммунные ответы в организме. Иммунотерапевтический агент может представлять собой, но не ограничивается лишь этими: антитело и его фрагменты и варианты, химерный антигенный рецептор (ХАР), химерный переключающий рецептор, цитокин, хемокин, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор, гибридный полипептид цитокин-цитокинового рецептора, или любой агент, который вызывает иммунный ответ. В одном варианте осуществления, иммунотерапевтический агент индуцирует противораковый иммунный ответ в клетке или у субъекта.

Антитела

[00155] В некоторых вариантах осуществления, антитела, фрагменты и их варианты представляют собой полезные грузы согласно данному изобретению.

[00156] В некоторых вариантах осуществления, антитела согласно данному изобретению включают в себя, без ограничения, любые из тех, которые описаны в Таблице 5, совместно рассматриваемой и находящейся в совместном владении предварительной заявки на патент США № 62/320864, поданной 4/11/2016, или в предварительной заявки США № 62/466596, поданной 3 марта 2017 года, и международной публикации WO2017/180587, содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Фрагменты и варианты антител

[00157] В некоторых вариантах осуществления, фрагменты и варианты антител могут содержать антиген-связывающие области из интактных антител. Примеры фрагментов и вариантов антител могут включать в себя, но не ограничиваются лишь этими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; димеры; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител, такие как одноцепочечный переменный фрагмент (scFv); и мультиспецифичные антитела, сформированные из фрагментов антител. При расщеплении антител папаином образуются два идентичных антиген-связывающих фрагмента, называемых «Fab» фрагментами, каждый из которых имеет один антиген-связывающий сайт. Также получают остаточный фрагмент «Fc», название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином дает фрагмент F(ab')₂, который имеет два антиген-связывающих сайта и все еще способен к перекрестному связыванию с антигеном. Фармацевтические композиции, биоконтур, компоненты биоконтуров, эффекторный модуль, включая их ЭОС или полезные грузы согласно данному изобретению, могут содержать один или большее количество из этих фрагментов.

[00158] Для целей данного изобретения «антитело» может содержать тяжелый и легкий переменный домен, а также область Fc. Как применяется в данном документе, термин «нативное антитело» обычно

относится к гетеротетрамерному гликопротеину около 150000 дальтон, состоящему из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Известны гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи антител, и сегменты, составляющие каждую из них были хорошо охарактеризованы и описаны (Matsuda et al., *The Journal of Experimental Medicine*. 1998, 188(11): 2151-62 и Li et al., *Blood*, 2004, 103(12): 4602-4609; содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Каждая легкая цепь соединена с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, в то время как число дисульфидных связей варьирует среди тяжелых цепей разных изотипов иммуноглобулинов. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет регулярно расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце вариабельный домен (VH), за которым следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь имеет вариабельный домен на одном конце (VL) и константный домен на другом конце; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, а вариабельный домен легкой цепи выровнен с вариабельным доменом тяжелой цепи.

[00159] Как применяется в данном документе, термин «вариабельный домен» относится к специфическим доменам антител, обнаруживаемым как в тяжелых, так и в легких цепях антитела, которые сильно различаются по последовательности среди антител и используются в связывании и специфичности каждого конкретного антитела для его конкретного антигена. Вариабельные домены содержат гипервариабельные области. Как применяется в данном документе, термин «гипервариабельная область» относится к области в вариабельном домене, содержащей аминокислотные остатки, ответственные за связывание антигена. Аминокислоты, присутствующие в гипервариабельных областях, определяют структуру областей, определяющих комплементарность (CDR), которые становятся частью антиген-связывающего сайта антитела. Как применяется в данном документе, термин «CDR» относится к области антитела, содержащей структуру, которая является комплементарной его целевому антигену или эпитопу. Другие части вариабельного домена, не взаимодействующие с антигеном, называют каркасными (FW) областями. Антиген-связывающий сайт (также известный как антиген-связывающий центр антитела или паратоп) содержит аминокислотные остатки, необходимые для взаимодействия с конкретным антигеном. Точные остатки, составляющие антиген-связывающий сайт, обычно выясняются с помощью ко-кристаллографии со связанным антигеном, однако также можно использовать расчетные оценки, основанные на сравнении с другими антителами (Strohl, W.R. *Therapeutic Antibody Engineering*. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 3, p47-54, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Определение остатков, составляющих CDR, может включать в себя использование схем нумерации, включая, но не ограничиваясь, теми, которые составлены Кабатом (Wu et al., *JEM*, 1970, 132(2):211-250 и Johnson et al., *Nucleic Acids Res.* 2000, 28(1): 214-218, содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме), Чотиа (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 1987, 196, 901, Chothia et al., *Nature*, 1989, 342, 877, и Al-Lazikani et al., *J. Mol. Biol.* 1997, 273(4): 927-948, содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме), Лефранком (Lefranc et al., *Immunome Res.* 2005, 1:3) и Honegger (Honegger and Pluckthun, *J. Mol. Biol.* 2001, 309(3): 657-70, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

[00160] Каждый домен VH и VL имеет три CDR. CDR VL обозначаются в данном документе как CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 в порядке встречаемости при продвижении от N- к С-концу вдоль полипептида вариабельного домена. CDR VH обозначаются в данном документе как CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 в порядке встречаемости при продвижении от N- к С-концу вдоль полипептида вариабельного домена. Каждая

CDR обладает предпочтительными каноническими структурами, за исключением CDR-H3, которая содержит аминокислотные последовательности, которые могут сильно варьировать по последовательности и длине среди антител, что дает в результате множество трехмерных структур в антиген-связывающих доменах (Nikoloudis, et al., *PeerJ*. 2014, 2: e456). В некоторых случаях, CDR-H3 могут быть проанализированы среди панели родственных антител для оценки разнообразия антител. В данной области техники известны различные способы определения последовательностей CDR и они могут применяться к известным последовательностям антител (Strohl, W.R. *Therapeutic Antibody Engineering*. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 3, p47-54, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

[00161] Как применяется в данном документе, термин «Fv» относится к фрагменту антитела, содержащему минимальный фрагмент на антителе, необходимый для образования полного антиген-связывающего сайта. Данные области состоят из димера вариабельной области одной тяжелой цепи и одной легкой цепи в тесном, нековалентном объединении. Фрагменты Fv могут быть получены путем протеолитического расщепления, но они в основном нестабильны. В данной области техники известны рекомбинантные способы получения стабильных фрагментов Fv, обычно путем вставки гибкого линкера между вариабельным доменом легкой цепи и вариабельным доменом тяжелой цепи (с образованием одноцепочечного Fv (scFv)) или путем введения дисульфидного мостика между вариабельными доменами тяжелой и легкой цепей (Strohl, W.R. *Therapeutic Antibody Engineering*. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 3, p46-47, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

[00162] Как применяется в данном документе, термин «легкая цепь» относится к компоненту антитела из любого вида позвоночных, относящемуся к одному из двух четко различимых типов, называемых каппа и лямбда, на основе аминокислотных последовательностей константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей, антитела можно отнести к разным классам. Существует пять основных классов интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2.

[00163] Как применяется в данном документе, термин «одноцепочечный Fv» или «scFv» относится к гибриднему белку доменов VH и VL антитела, причем эти домены соединены друг с другом в единую полипептидную цепь с помощью гибкого пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления, полипептидный линкер Fv позволяет scFv образовывать желаемую структуру для связывания антигена. В некоторых вариантах осуществления, scFv используются в сочетании с фаговым дисплеем, дрожжевым дисплеем или другими способами отображения, где они могут быть экспрессированы в комплексе с элементом поверхности (например, белком оболочки фага) и используются при идентификации пептидов с высокой аффинностью к данному антигену.

[00164] Используя молекулярную генетику, два scFv могут быть сконструированы парно-последовательно в один полипептид, разделенные линкерным доменом, называемый «тандемный scFv» (tascFv). Конструирование tascFv с генами двух разных scFv дает «биспецифичные одноцепочечные вариабельные фрагменты» (bis-scFvs). Только два tascFvs были разработаны коммерческими фирмами для клинического применения; оба являются биспецифическими агентами на активной ранней фазе разработки Micromet для онкологических показаний, и описаны как «вовлекающие биспецифические активаторы Т-

лимфоцитов (BiTE)». Блинатумомаб является анти-CD19/анти-CD3-биспецифическим tascFv, который усиливает Т-клеточные ответы на В-клеточные неходжкинские лимфомы в фазе 2. MT110 представляет собой анти-EP-CAM/анти-CD3 биспецифический tascFv, который усиливает Т-клеточные ответы на солидные опухоли в фазе 1. Биспецифические, четырехвалентные «TandAbs» также исследуются Affimed (Nelson, A. L., MABS., 2010, Jan-Feb; 2(1):77–83). Также могут быть включены макситела (двухвалентный scFv, слитый с аминоконцом Fc (домены CH2-CH3) IgG).

[00165] Как применяется в данном документе, термин «биспецифическое антитело» относится к антителу, способному связывать два разных антигена. Такие антитела обычно содержат области по меньшей мере из двух разных антител. Биспецифические антитела могут включать в себя любые из описанных в Riethmuller, G. *Cancer Immunity*. 2012, 12:12-18, Marvin et al., 2005. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2005, 26(6): 649-658 и Schaefer et al., *PNAS*. 2011, 108(27):11187-11192, содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00166] Как применяется в данном документе, термин «диатело» относится к небольшому фрагменту антитела с двумя антиген-связывающими сайтами. Диатела представляют собой функциональные биспецифичные одноцепочечные антитела (bscAb). Диатела содержат переменный домен VH тяжелой цепи, соединенный с переменным доменом VL легкой цепи в одной и той же полипептидной цепи. Используя линкер, который является слишком коротким, чтобы сделать возможным спаривание между двумя доменами в одной цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антиген-связывающих сайта. Диатела описаны более полно, например, в, EP 404,097; WO 93/11161; и Hollinger et al. (Hollinger, P. et al., “Diabodies”: Small bivalent and bispecific antibody fragments. *PNAS*, 1993. 90: 6444-6448); содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00167] Термин «интратело» относится к форме антитела, которая не секретируется из клетки, в которой оно продуцируется, а вместо этого нацеливается на один или большее количество внутриклеточных белков. Интратела могут быть использованы для воздействия на множество клеточных процессов, включая, но не ограничиваясь лишь этими: внутриклеточный транспорт, транскрипцию, трансляцию, метаболические процессы, пролиферативный сигналинг и деление клеток. В некоторых вариантах осуществления, способы согласно данному изобретению могут включать в себя основанную на интрателах терапию. В некоторых таких вариантах осуществления, последовательности переменного домена и/или последовательности CDR, раскрытые в данном документе, могут быть включены в одну или большее количество конструкций для терапии на основе интратела.

[00168] Как применяется в данном документе, термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных клеток (или клонов), то есть отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными и/или связывают один и тот же эпитоп, за исключением возможных вариантов, которые могут возникать во время производства моноклональных антител, такие варианты в целом, как правило, присутствуют в небольших количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно содержат разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене.

[00169] Определение «моноклональный» указывает на характер антитела, получаемого из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать как требующее получения антитела каким-

либо конкретным способом. Моноклональные антитела в данном документе включают в себя «химерные» антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из определенного вида или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, тогда как остаток цепи(ей) идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител.

[00170] Как применяется в данном документе, термин «гуманизированное антитело» относится к химерному антителу, содержащему минимальную часть из одного или большего количества отличных от человека (или мышиных) источников антител, а остальная часть получена из одного или большего количества источников иммуноглобулина человека. По большей части гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (антитело-реципиент), в которых остатки из гипервариабельной области из антитела реципиента заменены остатками из гипервариабельной области из антитела отличного от человека вида (донорное антитело), такого как мыша, крыса, кролик или отличный от человека примат, имеющие желаемую специфичность, аффинность и/или свойства. В одном варианте осуществления, антитело может представлять собой гуманизированное полноразмерное антитело. В качестве неограничивающего примера, антитело может быть гуманизировано с использованием способов, описанных в публикации патента США № US20130303399, содержание которого включено данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00171] Как применяется в данном документе, термин «вариант антитела» относится к модифицированному антителу (по отношению к нативному или исходному антителу) или биомолекуле, напоминающей нативное или исходное антитело по структуре и/или функции (например, миметику антитела). Варианты антител могут быть изменены по своей аминокислотной последовательности, составу или структуре по сравнению с нативным антителом. Варианты антител могут включать в себя, но не ограничиваются лишь этими: антитела с измененными изотипами (например, IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или IgM), гуманизированные варианты, оптимизированные варианты, мультицифические варианты антител (например, биспецифические варианты) и фрагменты антител.

[00172] В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции, биоконтуры, компоненты биоконтуров, эффекторные модули, включая их ЭОС или полезные грузы согласно данному изобретению, могут быть миметиками антител. Как применяется в данном документе, термин «миметик антитела» относится к любой молекуле, которая имитирует функцию или действие антитела, и которая специфически и с высокой аффинностью связывается с их молекулярными мишенями. В некоторых вариантах осуществления, миметики антител могут представлять собой моноклональные антитела, предназначенные для включения домена типа III фибронектина (Fn3) в качестве каркаса белка (US 6673901; US 6348584). В некоторых вариантах осуществления, миметики антител могут быть такими, как те, что известны в данной области техники, включая, но не ограничиваясь лишь этими: молекулы аффител, аффилины, аффитины, антикарины, авимеры, центрин, DARPINSTM, финомеры и Kunitz, и доменные пептиды. В других вариантах осуществления, миметики антител могут содержать одну или большее количество непептидных областей.

[00173] В одном варианте осуществления, антитело может содержать модифицированную область Fc. В качестве неограничивающего примера, модифицированная область Fc может быть получена способами или может быть любой из областей, описанных в публикации патента США № US20150065690, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00174] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут кодировать мультиспецифичные антитела, которые связывают больше чем один эпитоп. Как применяется в данном документе, термины «мультитело» или «мультиспецифическое антитело» относятся к антителу, в котором две или большее количество переменных областей связываются с разными эпитопами. Эпитопы могут быть на одной или разных мишенях. В одном варианте осуществления, мультиспецифическое антитело может быть получено и оптимизировано способами, описанными в международной публикации патента № WO2011109726 и публикации патента США № US20150252119, содержание каждой из которых включено данный документ посредством ссылки в полном объеме. Данные антитела способны связываться с несколькими антигенами с высокой специфичностью и высокой аффинностью.

[00175] В некоторых вариантах осуществления, мультиспецифическое антитело представляет собой «биспецифическое антитело», которое распознает два разных эпитопа на одном и том же или разных антигенах. В одном аспекте, биспецифические антитела способны связывать два разных антигена. Такие антитела обычно содержат антиген-связывающие области, по меньшей мере, из двух разных антител. Например, биспецифическое моноклональное антитело (BsMAb, BsAb) представляет собой искусственный белок, состоящий из фрагментов двух разных моноклональных антител, что позволяет BsAb связываться с двумя различными типами антигена. Каркасы биспецифичных антител могут включать в себя любые из описанных в Riethmuller, G., 2012. *Cancer Immunity*, 2012, 12:12-18; Marvin et al., *Acta Pharmacologica Sinica*. 2005, 26(6):649-658; и Schaefer et al., *PNAS*. 2011, 108(27): 11187-11192, содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Были разработаны BsMAb нового поколения, называемые «трифункциональными биспецифичными» антителами. Они состоят из двух тяжелых и двух легких цепей, каждая из которых состоит из двух разных антител, где две области Fab («руки») направлены против двух антигенов, а область Fc («нога») содержат две тяжелые цепи и формируют третий сайт связывания.

[00176] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы могут кодировать антитела, содержащие один антиген-связывающий домен. Эти молекулы чрезвычайно малы, с молекулярной массой примерно одной десятой от тех, которые наблюдаются для полноразмерных mAb. Другие антитела могут включать в себя «нанотела», полученные из антиген-связывающих переменных областей тяжелой цепи (VNHs) тяжелых цепей антител, обнаруженных у верблюдов и лам, в которых отсутствуют легкие цепи (Nelson, A. L., *MAbs*.2010. Jan-Feb; 2(1):77-83).

[00177] В некоторых вариантах осуществления, антитело может быть «миниатюризированным». Среди лучших примеров миниатюризации mAb - небольшие модульные иммунофармацевтические препараты (SMIP) от Trubion Pharmaceuticals. Эти молекулы, которые могут быть моновалентными или бивалентными, представляют собой рекомбинантные одноцепочечные молекулы, содержащие один VL, один антиген-связывающий домен VH, и один или два константных «эффекторных» домена, которые все связаны линкерными доменами. Предположительно, такая молекула может обладать преимуществами повышенного проникновения в ткани или опухоли, обеспечиваемого фрагментами, при сохранении иммунных эффекторных функций, обеспечиваемых константными доменами. По меньшей мере три «миниатюрных» SMIP вошли в фазу клинической разработки. TRU-015, анти-CD20 SMIP, разработанный в сотрудничестве с Wyeth, является наиболее продвинутым проектом, который перешел в Фазу 2 для лечения ревматоидного артрита (РА). Более ранние попытки при системной красной волчанке (СКВ) и В-лимфоцитарных лимфомах были в конечном итоге прекращены. Trubion и Facet Biotechnology сотрудничают в разработке TRU-016,

анти-CD37 SMIP, для лечения ХЛЛ и других лимфоидных новообразований, проект, который достиг Фазы 2. Wyeth имеет лицензию на анти-CD20 SMIP SBI-087 для лечения аутоиммунных заболеваний, включая РА, СКВ и, возможно, рассеянный склероз, хотя эти проекты остаются на самых ранних этапах клинических испытаний. (Nelson, A. L., MAbs, 2010. Jan-Feb; 2(1):77–83).

[00178] Один пример миниатюризованных антител называется «унителом», в котором шарнирная область была удалена из молекул IgG4. В то время как молекулы IgG4 являются нестабильными и в них могут обмениваться гетеродимеры легкой-тяжелой цепи друг с другом, делеция шарнирной области полностью предотвращает спаривание тяжелой цепи с тяжелой цепью, оставляя высокоспецифичные моновалентные гетеродимеры легкой/тяжелой цепи, сохраняя при этом область Fc для обеспечения стабильности и времени полужизни *in vivo*. Эта конфигурация может минимизировать риск иммунной активации или онкогенного роста, так как IgG4 плохо взаимодействует с FcR, а моновалентные унитела не способствуют образованию внутриклеточного сигнального комплекса (смотрите, например, Nelson, A. L., MAbs, 2010. Jan-Feb; 2(1):77–83).

[00179] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут кодировать однодоменные антитела (sdAbs или нанотела), которые представляют собой фрагмент антитела, состоящий из одного мономерного переменного домена антитела. Как и целое антитело, оно способно избирательно связываться со специфическим антигеном. В одном аспекте, sdAb может представлять собой «Ig верблюда» или «верблюжье VHH». Как применяется в данном документе, термин «Ig верблюда» относится к наименьшей из известных антиген-связывающих единиц антитела с только тяжелой цепью (Koch-No Ite, et al, *FASEB J.*, 2007, 21: 3490-3498). «Антитело из тяжелой цепи» или «антитело верблюда» относится к антителу, которое содержит два домена VH и не содержит легких цепей (Riechmann L. et al, *J. Immunol. Methods*, 1999, 231: 25-38; международная публикация патента № WO1994/04678 и WO1994/025591; и патент США №6005079). В другом аспекте, sdAb может представлять собой «новый иммуноглобулиновый рецептор антигена» (IgNAR). Как применяется в данном документе, термин «новый иммуноглобулиновый рецептор антигена» относится к классу антител из иммунного репертуара акулы, которые состоят из гомодимеров одного переменного домена нового рецептора антигена (VNAR) и пяти константных доменов нового рецептора антигена (CNAR). IgNAR представляют собой одни из самых маленьких известных каркасных белков на основе иммуноглобулина, и являются очень стабильными и обладают эффективными характеристиками связывания. Присущая стабильность может быть приписана как (i) лежащему в основе каркасу Ig, который содержит значительное количество заряженных и гидрофильных экспонированных на поверхности остатков по сравнению с обычными доменами VH и VL антител, обнаруженными в мышиных антителах; так и (ii) особенностям, стабилизирующим структуру, в петлях определяющей комплементарность области (CDR), включая межпетлевые дисульфидные мостики, и структуры внутриветлевых водородных связей.

[00180] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут кодировать интратела. Интратела представляют собой форму антитела, которая не секретируется из клетки, в которой оно продуцируется, а вместо этого нацеливается на один или большее количество внутриклеточных белков. Интратела экспрессируются и функционируют внутриклеточно, и могут использоваться для воздействия на множество клеточных процессов, включая, но не ограничиваясь лишь этими: внутриклеточный транспорт, транскрипцию, трансляцию, метаболические процессы, пролиферативный сигналинг и деление клеток. В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные

в данном документе, включают в себя основанную на интрателях терапию. В некоторых таких вариантах осуществления, последовательности варибельного домена и/или последовательности CDR, раскрытые в данном документе, включены в одну или большее количество конструкций для внутриклеточной терапии. Например, интрателя могут нацеливаться на один или большее количество гликированных внутриклеточных белков, или могут модулировать взаимодействие между одним или большим количеством гликированных внутриклеточных белков и альтернативным белком.

[00181] Внутриклеточная экспрессия интрател в различных компартментах клеток млекопитающих позволяет блокировать или модулировать функцию эндогенных молекул (Biossa, et al., *EMBO J.* 1990, 9: 101-108; Colby et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004, 101: 17616-17621). Интрателя могут изменять укладку белков, взаимодействия белок-белок, белок-ДНК, белок-РНК и модификацию белков. Они могут вызывать фенотипический нокаут и действовать как нейтрализующие агенты путем прямого связывания с антигеном-мишенью, путем изменения его внутриклеточного трафика или ингибирования его объединения с партнерами по связыванию. Обладая высокой специфичностью и аффинностью к антигенам-мишеням, интрателя обладают преимуществами в блокирование определенных взаимодействий связывания конкретной молекулы-мишени, в тоже время не затрагивая другие.

[00182] Последовательности из донорных антител могут быть использованы для разработки интрател. Интрателя часто рекомбинантно экспрессируются внутри клетки в виде однодоменных фрагментов, таких как выделенные домены VH и VL, или в виде одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv) антитела. Например, интрателя часто экспрессируются в виде единого полипептида с образованием одноцепочечного антитела, содержащего варибельные домены тяжелой и легкой цепей, соединенных гибким линкерным полипептидом. В интрателях обычно отсутствуют дисульфидные связи, и они способны модулировать экспрессию или активность генов-мишеней посредством их активности специфического связывания. Одноцепочечные интрателя часто экспрессируются из рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты и конструируются так, чтобы удерживаться внутри клетки (например, удерживаться в цитоплазме, эндоплазматической сети или периплазме). Интрателя могут быть получены с использованием способов, известных в данной области техники, таких как раскрытые и проанализированные в: (Marasco et al., *PNAS*, 1993, 90: 7889-7893; Chen et al., *Hum. Gene Ther.* 1994, 5:595-601; Chen et al., 1994, *PNAS*, 91: 5932-5936; Maciejewski et al., 1995, *Nature Med.*, 1: 667-673; Marasco, 1995, *Immunotech*, 1: 1-19; Mhashilkar, et al., 1995, *EMBO J.* 14: 1542-51; Chen et al., 1996, *Hum. Gene Therap.*, 7: 1515-1525; Marasco, *Gene Ther.* 4:11-15, 1997; Rondon and Marasco, 1997, *Annu. Rev. Microbiol.* 51:257-283; Cohen, et al., 1998, *Oncogene* 17:2445-56; Proba et al., 1998, *J. Mol. Biol.* 275:245-253; Cohen et al., 1998, *Oncogene* 17:2445-2456; Hassanzadeh, et al., 1998, *FEBS Lett.* 437:81-6; Richardson et al., 1998, *Gene Ther.* 5:635-44; Ohage and Steipe, 1999, *J. Mol. Biol.* 291:1119-1128; Ohage et al., 1999, *J. Mol. Biol.* 291:1129-1134; Wirtz and Steipe, 1999, *Protein Sci.* 8:2245-2250; Zhu et al., 1999, *J. Immunol. Methods* 231:207-222; Arafat et al., 2000, *Cancer Gene Ther.* 7:1250-6; der Maur et al., 2002, *J. Biol. Chem.* 277:45075-85; Mhashilkar et al., 2002, *Gene Ther.* 9:307-19; и Wheeler et al., 2003, *FASEB J.* 17: 1733-5; и источниках, цитируемых в них).

[00183] В некоторых аспектах, полезные грузы согласно изобретению могут кодировать биосинтетические антитела, как описано в патенте США № 5091513, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Такое антитело может содержать одну или большее количество последовательностей аминокислот, составляющих область, которая ведет себя как сайт связывания биосинтетического антитела (BABS). Сайты содержат 1) нековалентно связанные или

дисульфид-связанные синтетические димеры VH и VL, 2) одноцепочечные VH-VL или VL-VH, причем VH и VL соединены полипептидным линкером, или 3) отдельные домены VH или VL. Связывающие домены содержат соединенные области CDR и FR, которые могут быть получены из отдельных иммуноглобулинов. Биосинтетические антитела могут также содержать другие полипептидные последовательности, которые функционируют, например, в качестве фермента, токсина, сайта связывания или сайта связывания с иммобилизационной средой или радиоактивным атомом. Раскрываются способы получения биосинтетических антител для конструирования BABS, обладающего любой специфичностью, которая может быть установлена получением антител *in vivo*, и получения их аналогов.

[00184] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы могут кодировать антитела с акцепторными каркасами антител, описанными в патенте США № 8399625. Такие акцепторные каркасы антител могут особенно хорошо подходить для встраивания CDR из представляющего интерес антитела.

[00185] В одном варианте осуществления, антитело может представлять собой активный в зависимости от условий биологический белок. Антитело может быть использовано для получения активного в зависимости от условий биологического белка, который обратимо или необратимо инактивируется в нормальных физиологических условиях дикого типа, а также предложены такие активные в зависимости от условий биологические белки и применения таких активных в зависимости от условий биологических белков. Такие способы и активные в зависимости от условий белки описаны, например, в международных публикациях № WO2015175375 и WO2016036916 и публикации патента США № US20140378660, содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Приготовление антител

[00186] Приготовление антител, будь то моноклональных или поликлональных, известно в данной области техники. Методы получения антител хорошо известны в данной области техники и описаны, например в Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Harlow and Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 и "Therapeutic Antibody Engineering: Current and Future Advances Driving the Strongest Growth Area in the Pharmaceutical Industry" Woodhead Publishing, 2012.

[00187] Антитела и фрагменты и их варианты, как описано в данном документе, могут быть получены с использованием рекомбинантных полинуклеотидов. В одном варианте осуществления, полинуклеотиды имеют модульную конструкцию для кодирования по меньшей мере одного из антител, фрагментов или их вариантов. В качестве неограничивающего примера, полинуклеотидная конструкция может кодировать любую из следующих конструкций: (1) тяжелая цепь антитела, (2) легкая цепь антитела, (3) тяжелая и легкая цепь антитела, (4) тяжелая цепь и легкая цепь, разделенные линкером, (5) домены VH1, CH1, CH2, CH3, линкер и легкая цепь, или (6) домены VH1, CH1, CH2, CH3, область VL и легкая цепь. Любая из этих конструкций также может содержать необязательные линкеры между любым доменом и/или областью. Полинуклеотиды согласно данному изобретению могут быть сконструированы для получения любого стандартного класса иммуноглобулинов с использованием антитела, описанного в данном документе, или любых его составных частей в качестве исходной молекулы.

[00188] Фрагменты рекомбинантных антител также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с использованием методик, хорошо известных в данной области техники и описанных, например, в Clackson et al., 1991, Nature 352: 624-628; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-597. Фрагменты рекомбинантных антител могут быть получены из больших фаговых библиотек антител, полученных

рекомбинацией в бактериях (Sblattero and Bradbury, 2000, Nature Biotechnology 18:75-80; содержание которого включено данный документ посредством ссылки в полном объеме).

Антитела, используемые для иммунотерапии

[00189] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут быть антителами, фрагментами и их вариантами, которые специфичны к опухоль-специфическим антигенам (ОСА) и ассоциированным с опухолью антигенам (АОА). Антитела циркулируют по всему телу, пока не обнаружат и не прикрепятся к ОСА/АОА. После прикрепления они рекрутируют другие компоненты иммунной системы, увеличивая АЗКОЦ (антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность) и АЗКОФ (антитело-зависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз) для разрушения опухолевых клеток. Как применяется в данном документе, термин «опухолеспецифический антиген (ОСА)» обозначает антигенное вещество, продуцируемое в опухолевых клетках, которое может вызывать противоопухолевый иммунный ответ в организме хозяина. В одном варианте осуществления, ОСА может представлять собой опухолевый неоантиген. Антитело, специфическое к опухолевому антигену, опосредует комплемент-зависимый цитотоксический ответ против опухолевых клеток, экспрессирующих этот же антиген.

[00190] В некоторых вариантах осуществления, опухолеспецифичные антигены (ОСА), ассоциированные с опухолью антигены (АОА), патоген-ассоциированные антигены или их фрагменты могут быть экспрессированы в виде пептида или в виде интактного белка или его части. Интактный белок или его часть могут быть нативными или мутагенизированными. Антигены, ассоциированные с раковыми заболеваниями или вирус-индуцированными раковыми заболеваниями, как описано в данном документе, хорошо известны в данной области техники. Такой ОСА или АОА может быть ранее ассоциирован с раком или может быть идентифицирован любым способом, известным в данной области техники.

[00191] В одном варианте осуществления, антиген представляет собой CD19, белок поверхности В-лимфоцитов, экспрессируемый в процессе развития В-лимфоцитов. CD19 представляет собой хорошо известную молекулу поверхности В-лимфоцитов, которая при активации рецептора В-лимфоцитов усиливает передачу сигналов В-клеточным антигенным-рецептором и увеличение популяций В-лимфоцитов. CD19 широко экспрессируется как в нормальных, так и неопластических В-лимфоцитах. Злокачественные новообразования, происходящие от В-лимфоцитов, такие как хронический лимфолейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз и многие неходжкинские лимфомы, часто сохраняют экспрессию CD19. Эта почти универсальная экспрессия и специфичность для одной клеточной линии сделали CD19 привлекательной мишенью для иммунотерапии. Человеческий CD19 имеет 14 экзонов, причем экзон 1-4 кодирует внеклеточную часть CD19, экзон 5 кодирует трансмембранную часть CD19, а экзоны 6-14 кодируют цитоплазматический хвост.

[00192] В одном варианте осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут представлять собой антитела, фрагменты и их варианты, которые специфичны к антигену CD19.

[00193] В одном варианте осуществления, полезный груз согласно данному изобретению может представлять собой антитело FMC63, фрагмент антитела варианта. FMC63 представляет собой клон мышино-го моноклонального антитела IgG2a, специфичного к антигену CD19, который взаимодействует с антигеном CD19 на клетках линии В-лимфоцитов. Эпитоп CD19, распознаваемый антителом FMC63, находится в экзоне 2 (Sotillo et al. (2015) Cancer Discov;5(12):1282-95; содержание которого включено посредством ссылки в полном объеме). В некоторых вариантах осуществления, полезный груз согласно

изобретению может представлять собой другие клоны моноклональных антител к CD19, включая, но не ограничиваясь лишь этими: 4G7, SJ25C1, CVID3/429, CVID3/155, HIB19, и J3-119.

[00194] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут содержать вариабельную тяжелую цепь и вариабельную легкую цепь, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из последовательностей, представленных в Таблице 4.

Таблица 4: Последовательности вариабельной тяжелой и легкой цепей

Мишень	Цепь антитела	SEQ ID NO	Источник
CD19	VH	49	SEQ ID NO: 28 в WO2016168773A3
CD19	VH	50	SEQ ID NO: 29 в WO2016168773A3
CD19	VH	51	SEQ ID NO: 32 в WO2016168773A3
CD19	VH	52	SEQ ID NO: 33 в WO2016168773A3
CD19	VH	53	SEQ ID NO: 34 в WO2016168773A3
CD19	VH	54	SEQ ID NO: 35 в WO2016168773A3
CD19	VH	55	SEQ ID NO: 51 в WO2016187349A1
CD19	VH	56	SEQ ID NO: 20 в US20160039942
CD19	VH	57	SEQ ID NO: 1 в WO2014184143
CD19	VH	58	SEQ ID NO: 5 в US20160145337A1
CD19	VH	59	SEQ ID NO: 15 в US20160319020
CD19	VH	60	SEQ ID NO: 166 в US20160152723
CD19	VH	61	SEQ ID NO: 167 в US20160152723
CD19	VH	62	SEQ ID NO: 168 в US20160152723
CD19	VH	63	SEQ ID NO: 17 в EP3057991A1
CD19	VH	64	SEQ ID NO: 172 в US20160152723
CD19	VH	65	SEQ ID NO: 176 в US20160152723
CD19	VH	66	SEQ ID NO: 177 в US20160152723
CD19	VH	67	SEQ ID NO: 181 в US20160152723
CD19	VH	68	SEQ ID NO: 183 в US20160152723
CD19	VH	69	SEQ ID NO: 184 в US20160152723
CD19	VH	70	SEQ ID NO: 185 в US20160152723
CD19	VH	71	SEQ ID NO: 62 в US20160152723
CD19	VH	72	SEQ ID NO: 62 в WO2016097231
CD19	VH	73	SEQ ID NO: 12 в WO2016134284
CD19	VH	74	SEQ ID NO: 111 в US20160333114A1
CD19	VH	75	SEQ ID NO: 113 в US20160333114A1
CD19	VH	76	SEQ ID NO: 33 в EP3057994A1
CD19	VH	77	SEQ ID NO: 34 в EP3057994A1
CD19	VH	78	SEQ ID NO: 35 в EP3057994A1
CD19	VH	79	SEQ ID NO: 53 в WO2016120216
CD19	VH	80	SEQ ID NO: 55 в WO2016120216

CD19	VK	81	SEQ ID NO: 13 B US20160319020
CD19	VK	82	SEQ ID NO: 6 B US20160319020
CD19	VL	83	SEQ ID NO: 27 B WO2016168773A3
CD19	VL	84	SEQ ID NO: 31 B WO2016168773A3
CD19	VL	85	SEQ ID NO: 49 B WO2016187349A1
CD19	VL	86	SEQ ID NO: 11 B WO2016134284
CD19	VL	87	SEQ ID NO: 194 B US20140134142A1
CD19	VL	88	SEQ ID NO: 54 B WO2016120216
CD19	VL	89	SEQ ID NO: 56 B WO2016120216
CD19	VL	90	SEQ ID NO: 13 B US20160152723
CD19	VL	91	SEQ ID NO: 14 B US20160152723
CD19	VL	92	SEQ ID NO: 15 B US20160152723
CD19	VL	93	SEQ ID NO: 16 B US20160152723
CD19	VL	94	SEQ ID NO: 17 B US20160152723
CD19	VL	95	SEQ ID NO: 186 B US20160152723
CD19	VL	96	SEQ ID NO: 187 B US20160152723
CD19	VL	97	SEQ ID NO: 188 B US20160152723
CD19	VL	98	SEQ ID NO: 189 B US20160152723
CD19	VL	99	SEQ ID NO: 192 B US20160152723
CD19	VL	100	SEQ ID NO: 196 B US20160152723
CD19	VL	101	SEQ ID NO: 197 B US20160152723
CD19	VL	102	SEQ ID NO: 198 B US20160152723
CD19	VL	103	SEQ ID NO: 199 B US20160152723
CD19	VL	104	SEQ ID NO: 200 B US20160152723
CD19	VL	105	SEQ ID NO: 201 B US20160152723
CD19	VL	106	SEQ ID NO: 202 B US20160152723
CD19	VL	107	SEQ ID NO: 203 B US20160152723
CD19	VL	108	SEQ ID NO: 204 B US20160152723
CD19	VL	109	SEQ ID NO: 205 B US20160152723
CD19	VL	110	SEQ ID NO: 22 B US20160039942
CD19	VL	111	SEQ ID NO: 63 B WO2016097231
CD19	VL	112	SEQ ID NO: 64 B US20160152723
CD19	VL	113	SEQ ID NO: 66 B US20160152723
CD19	VL	114	SEQ ID NO: 67 B US20160152723
CD19	VL	115	SEQ ID NO: 68 B US20160152723
CD19	VL	116	SEQ ID NO: 69 B US20160152723
CD19	VL	117	SEQ ID NO: 70 B US20160152723
CD19	VL	118	SEQ ID NO: 71 B US20160152723
CD19	VL	119	SEQ ID NO: 91 B US20160152723
CD19	VL	120	SEQ ID NO: 3 B US20160145337A1

CD19	VL	121	SEQ ID NO: 112 в US20160333114A1
CD19	VL	122	SEQ ID NO: 114 в US20160333114A1

[00195] Опухолеспецифический антиген (OCA) может быть опухолевым неоантигеном. Неоантиген представляет собой мутированный антиген, который экспрессируется только опухолевыми клетками из-за генетических мутаций или изменений в транскрипции, которые изменяют кодирующие белки последовательности, и, следовательно, создают новые чужеродные антигены. Генетические изменения являются результатом генетической замены, вставки, делеции или любых других генетических изменений нативного родственного белка (то есть молекулы, которая экспрессируется в нормальных клетках). В контексте CD19, описаны неоантигены, например вариант транскрипта CD19, в котором отсутствует экзон 2 или экзон 5-6 или оба (смотрите международную публикацию патента № WO2016061368; содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Поскольку FMC63-связываемый эпитоп находится в экзоне 2, неоантиген CD19 без экзона 2 не распознается антителом FMC63. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно изобретению могут включать в себя антитела, отличающиеся от FMC63, или их фрагменты. Как применяется в данном документе, термин «отличный от FMC63» относится к антителу или его фрагменту, которое является иммунологически специфическим и связывается с эпитопом антигена CD19, который отличается или не похож на эпитоп антигена CD19, который связывается с FMC63. В некоторых случаях, антитела согласно изобретению могут включать в себя антитела к CD19, фрагменты или варианты антител, которые распознают неоантигены CD19, включая неоантиген CD19, в котором отсутствует экзон 2. В одном варианте осуществления, антитело или его фрагмент иммунологически специфичны к CD19, кодируемому экзоном 1, 3 и/или 4. В одном примере, антитело или его фрагмент специфичны к эпитопу, который связывает часть CD19, кодируемую экзоном 1, и часть CD19, кодируемую экзоном 3.

[00196] Химерные антигенные рецепторы (ХАР)

[00197] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут представлять собой химерные антигенные рецепторы (ХАР), которые при трансдукции в иммунные клетки (например, Т-лимфоциты и NK-клетки) могут перенаправлять иммунные клетки на мишень (например, опухолевые клетки), которая экспрессирует молекулу, распознаваемую внеклеточным нацеливающим фрагментом ХАР.

[00198] Как применяется в данном документе, термин «химерный антигенный рецептор (ХАР)» относится к синтетическому рецептору, который имитирует ТКР на поверхности Т-лимфоцитов. В целом как правило, ХАР состоит из внеклеточного нацеливающего домена, трансмембранного домена/области и домена внутриклеточного сигналинга/активации. В стандартном рецепторе ХАР компоненты: внеклеточный нацеливающий домен, трансмембранный домен и домен внутриклеточного сигналинга/активации линейно конструируют в виде единого гибридного белка. Внеклеточная область содержит нацеливающий домен/фрагмент (например, scFv), который распознает специфический опухолевый антиген или другие молекулы поверхности опухолевых клеток. Внутриклеточная область может содержать сигнальный домен комплекса ТКР (например, сигнальную область CD3 ζ) и/или один или большее количество ко-стимулирующих сигнальных доменов, таких как CD28, 4-1BB (CD137) и OX-40 (CD134). Например, «ХАР первого поколения» имеет только сигнальный домен CD3 ζ . В целях увеличения устойчивости и пролиферации Т-лимфоцитов добавляют ко-стимулирующие внутриклеточные домены, в результате чего

получают ХАР второго поколения, имеющие сигнальный домен CD3 ζ плюс один ко-стимулирующий сигнальный домен, и ХАР третьего поколения, имеющие сигнальный домен CD3 ζ плюс два или большее количество ко-стимулирующих сигнальных доменов. ХАР, когда экспрессируется Т-лимфоцитом, наделяет Т-лимфоцит антигенной специфичностью, определяемой внеклеточной нацеливающей частью ХАР. В последнее время также желательно добавить один или большее количество элементов, таких как гены хоминга и самоуничтожения, для разработки более действенной и безопасной архитектуры ХАР, так называемого ХАР четвертого поколения.

[00199] В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный нацеливающий домен соединен через шарнир (также называемый доменом промежутка или спейсером) и трансмембранные области с внутриклеточным сигнальным доменом. Шарнир соединяет внеклеточный нацеливающий домен с трансмембранным доменом, который проходит через клеточную мембрану и соединяется с внутриклеточным сигнальным доменом. Возможно, потребуется изменить шарнир, чтобы оптимизировать активность трансформированных ХАР клеток в отношении раковых клеток из-за размера белка-мишени, с которым связывается нацеливающая часть, а также размера и сродства самого нацеливающего домена. При распознавании и связывании нацеливающего фрагмента с клеткой-мишенью внутриклеточный сигнальный домен приводит к генерации сигнала активации к Т-лимфоциту ХАР, который дополнительно усиливается «вторым сигналом» от одного или большего количества внутриклеточных ко-стимулирующих доменов. Т-лимфоцит ХАР, будучи активированным, может уничтожить клетку-мишень.

[00200] В некоторых вариантах осуществления, ХАР согласно данному изобретению может быть разделен на две части, каждая часть связана с доменом димеризации, так что входящий сигнал, который запускает димеризацию, способствует сборке интактного функционального рецептора. Wu и Lim недавно сообщили о разделении ХАР, в котором внеклеточный связывающий CD19 домен и внутриклеточный сигнальный элемент разделены и соединены с доменом FKBP и доменом FRB* (T2089L мутант связывающего рапамицин FKBP), который гетеродимеризуется в присутствии аналога AP21967 рапамицина. Разделенный рецептор собирается в присутствии AP21967 и вместе с специфическим связыванием антигена активирует Т-лимфоциты (Wu et al., *Science*, 2015, 625(6258): aab4077).

[00201] В некоторых вариантах осуществления, ХАР согласно данному изобретению может быть сконструирован как индуцибельный ХАР. Sakemura et. al. недавно сообщили о включении индуцибельной системы Tet-On в конструкцию ХАР CD19. ХАР CD19 активируется только в присутствии доксициклина (Dox). Sakemura сообщил, что Tet-CD19ХАР Т-лимфоциты в присутствии Dox были эквивалентно цитотоксичны по отношению к клеточным линиям CD19⁺ и имели эквивалентное продуцирование цитокинов и пролиферацию при стимуляции CD19 по сравнению с обычными Т-лимфоцитами ХАР CD19 (Sakemura et al., *Cancer Immuno. Res.*, 2016, Jun 21, Epub до подачи в печать). В одном примере, данный Tet-ХАР может быть полезным грузом эффекторного модуля под управлением ЭОС (например, ДД) согласно изобретению. Двойные системы обеспечивают большую гибкость для включения и выключения экспрессии ХАР в трансдуцированных Т-лимфоцитах.

[00202] Согласно данному изобретению, полезный груз согласно данному изобретению может представлять собой ХАР первого поколения, или ХАР второго поколения, или ХАР третьего поколения, или ХАР четвертого поколения. Иллюстративные варианты эффекторных модулей вариантов осуществления, содержащих конструкции ХАР, показаны на Фиг. 13-18. В некоторых вариантах осуществления, полезный груз согласно данному изобретению может представлять собой полную конструкцию ХАР, состоящую из

внуклеточного домена, шарнирного и трансмембранного домена, и области внутриклеточного сигналинга. В других вариантах осуществления, полезный груз согласно данному изобретению может представлять собой компонент полной конструкции ХАР, содержащей внуклеточный нацеливающий фрагмент, шарнирную область, трансмембранный домен, внутриклеточный сигнальный домен, один или большее количество ко-стимулирующих доменов, и другие дополнительные элементы которые улучшают архитектуру и функциональность ХАР, включая, помимо прочего, лидерную последовательность, элемент хоминга и защитный переключатель, или комбинацию таких компонентов.

[00203] ХАР, регулируемые с помощью биоконтуров и композиций согласно данному изобретению, являются настраиваемыми и, таким образом, предлагают несколько преимуществ. Механизм обратимого включения-выключения позволяет контролировать острую токсичность, вызванную чрезмерным делением ХАР-Т-лимфоцитов. Пульсирующая экспрессия ХАР с использованием ЭОС согласно данному изобретению может быть достигнута заикливанием уровня лиганда. Регуляция ХАР с помощью лиганда может быть эффективной при компенсирующем избегании опухоли иммунной системы, вызванном потерей антигена, позволяя избежать функционального истощения, вызванного тоническим сигналингом из-за хронического воздействия антигена, и улучшая устойчивость клеток, экспрессирующих ХАР, *in vivo*.

[00204] В некоторых вариантах осуществления, биоконтуры и композиции согласно изобретению могут быть использованы для уменьшения экспрессии ХАР, чтобы ограничить токсичность при поражении цели в ткани, вызванную синдромом лизиса опухоли. Регуляция в сторону уменьшения экспрессии ХАР согласно данному изобретению после противоопухолевого воздействия может предотвратить (1) токсичность при поражении цели вне опухоли, вызванную экспрессией антигена в нормальной ткани, (2) антиген-независимую активацию *in vivo*.

[00205] В одном варианте осуществления, выбор ХАР с более низкой аффинностью может обеспечить больший сигналинг Т-лимфоцитов и меньшую токсичность.

Внуклеточный нацеливающий домен/фрагмент

[00206] В соответствии с изобретением, внуклеточный нацеливающий фрагмент ХАР может представлять собой любой агент, который распознает и связывается с данной молекулой-мишенью, например, неоантигеном на опухолевых клетках, с высокой специфичностью и аффинностью. Нацеливающий фрагмент может представлять собой: антитело и его варианты, которое специфически связывается с молекулой-мишенью на опухолевых клетках, или пептидный аптамер, выбранный из пула случайных последовательностей на основании его способности связываться с молекулой-мишенью на опухолевых клетках, или его вариант или фрагмент, который может связываться с молекулой-мишенью на опухолевых клетках, или домен распознавания антигена из нативного рецептора Т-лимфоцитов (ТКР) (например, внуклеточный домен CD4 для распознавания ВИЧ-инфицированных клеток), или экзотические компоненты распознавания, такие как связанный цитокин, что приводит к распознаванию клеток-мишеней, несущих цитокиновый рецептор, или естественный лиганд рецептора.

[00207] В некоторых вариантах осуществления, нацеливающий домен ХАР может представлять собой NAR Ig, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab)'₂, фрагмент F(ab)'₃, Fv, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), bis-scFv, (scFv)₂, минитело, диатело, триатело, тетраатело, дисульфид-стабилизированный белок Fv (dsFv), унитело, нанотело или антиген-связывающую область, полученную из антитела, которое специфически распознает молекулу-мишень, например опухолеспецифический антиген (OCA). В одном варианте осуществления, нацеливающий фрагмент представляет собой антитело scFv.

Домен scFv, когда он экспрессируется на поверхности Т-лимфоцита ХАР и затем связывается с белком-мишенью на раковой клетке, способен удерживать Т-лимфоцит ХАР в непосредственной близости от раковой клетки и запускать активацию Т-лимфоцита. А scFv может быть получен с использованием обычных методик рекомбинантных ДНК и обсуждается в данном изобретении.

[00208] В одном варианте осуществления, нацеливающий фрагмент ХАР может распознавать CD19. CD19 представляет собой хорошо известную молекулу поверхности В-лимфоцитов, которая при активации рецептора В-лимфоцитов усиливает передачу сигналов В-клеточным антигенным-рецептором и увеличение популяций В-лимфоцитов. CD19 широко экспрессируется как в нормальных, так и неопластических В-лимфоцитах. Злокачественные новообразования, происходящие от В-лимфоцитов, такие как хронический лимфолейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз и многие неходжкинские лимфомы, часто сохраняют экспрессию CD19. Эта почти универсальная экспрессия и специфичность для одной клеточной линии сделали CD19 привлекательной мишенью для иммунотерапии. Человеческий CD19 имеет 14 экзонов, причем экзон 1-4 кодирует внеклеточную часть CD19, экзон 5 кодирует трансмембранную часть CD19, а экзоны 6-14 кодируют цитоплазматический хвост. В одном варианте осуществления, нацеливающий фрагмент может содержать scFv, полученные из переменных областей антитела FMC63. FMC63 представляет собой клон мышиного моноклонального антитела IgG2a, специфичный к антигену CD19, который взаимодействует с антигеном CD19 на клетках линии В. Эпитоп CD19, распознаваемый антителом FMC63, находится в экзоне 2 (Sotillo et al. (2015) *Cancer Discov*;5(12):1282-95; содержание которого включено посредством ссылки в полном объеме). В некоторых вариантах осуществления, нацеливающий фрагмент ХАР может быть получен из переменных областей других клонов моноклональных антител к CD19, включая, но не ограничиваясь лишь этими: 4G7, SJ25C1, CVID3/429, CVID3/155, H1B19, и J3-119.

[00209] В некоторых вариантах осуществления, нацеливающий фрагмент ХАР может распознавать опухолеспецифический антиген (ОСА), например раковый неоантиген, который экспрессируется только опухолевыми клетками из-за генетических мутаций или изменений в транскрипции, которые изменяют последовательности, кодирующие белки, следовательно, создавая новые, чужеродные антигены. Генетические изменения являются результатом генетической замены, вставки, делеции или любых других генетических изменений нативного родственного белка (то есть молекулы, которая экспрессируется в нормальных клетках). В контексте CD19, ОСА могут включать в себя вариант транскрипта человеческого CD19, в котором отсутствует экзон 2 или экзон 5-6 или оба (смотрите международную публикацию патента № WO2016061368; содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Поскольку FMC63-связываемый эпитоп находится в экзоне 2, CD19 без экзона 2 не распознается антителом FMC63. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, нацеливающий фрагмент ХАР может представлять собой scFV, отличный от FMC63. Как применяется в данном документе, термин «отличный от FMC63» относится к антителу, scFv или его фрагменту, который является иммунологически специфическим и связывается с эпитопом антигена CD19, который отличается или не похож на эпитоп антигена CD19, который связывается с FMC63. В некоторых случаях, нацеливающий фрагмент может распознавать антиген CD19 без экзона 2. В одном варианте осуществления, нацеливающий фрагмент распознает фрагмент CD19, кодируемый экзонами 1, 3 и/или 4. В одном примере, нацеливающий фрагмент распознает эпитоп, который соединяет часть CD19, кодируемую экзонами 1, и часть CD19, кодируемую экзонами 3.

[00210] В некоторых вариантах осуществления, нацеливающие фрагменты согласно данному изобретению могут представлять собой scFv, содержащие аминокислотные последовательности, указанные в Таблице 5.

Таблица 5: последовательности scFv

Мишень	Описание	SEQ ID NO	Источник
CD19	scFv	123	SEQ ID NO: 53 в EP3083671A1
CD19	scFv	124	SEQ ID NO: 54 в EP3083671A1
CD19	scFv	125	SEQ ID NO: 1 в WO2015157252
CD19	scFv	126	SEQ ID NO: 10 в WO2015157252
CD19	scFv	127	SEQ ID NO: 10 в WO2016033570
CD19	scFv	128	SEQ ID NO: 11 в WO2015157252
CD19	scFv	129	SEQ ID NO: 12 в WO2015157252
CD19	scFv	130	SEQ ID NO: 2 в WO2015157252
CD19	scFv	131	SEQ ID NO: 2 в WO2016033570
CD19	scFv	132	SEQ ID NO: 206 в WO2016033570
CD19	scFv	133	SEQ ID NO: 207 в WO2016033570
CD19	scFv	134	SEQ ID NO: 208 в WO2016033570
CD19	scFv	135	SEQ ID NO: 209 в WO2016033570
CD19	scFv	136	SEQ ID NO: 210 в WO2016033570
CD19	scFv	137	SEQ ID NO: 211 в WO2016033570
CD19	scFv	138	SEQ ID NO: 213 в WO2016033570
CD19	scFv	139	SEQ ID NO: 214 в WO2016033570
CD19	scFv	140	SEQ ID NO: 215 в WO2016033570
CD19	scFv	141	SEQ ID NO: 216 в WO2016033570
CD19	scFv	142	SEQ ID NO: 217 в WO2016033570
CD19	scFv	143	SEQ ID NO: 218 в WO2016033570
CD19	scFv	144	SEQ ID NO: 219 в WO2016033570
CD19	scFv	145	SEQ ID NO: 220 в WO2016033570
CD19	scFv	146	SEQ ID NO: 221 в WO2016033570
CD19	scFv	147	SEQ ID NO: 222 в WO2016033570
CD19	scFv	148	SEQ ID NO: 223 в WO2016033570
CD19	scFv	149	SEQ ID NO: 224 в WO2016033570
CD19	scFv	150	SEQ ID NO: 225 в WO2016033570
CD19	scFv	151	SEQ ID NO: 3 в WO2015157252
CD19	scFv	152	SEQ ID NO: 4 в WO2015157252
CD19	scFv	153	SEQ ID NO: 4 в WO2016033570
CD19	scFv	154	SEQ ID NO: 45 в WO2016033570
CD19	scFv	155	SEQ ID NO: 47 в WO2016033570
CD19	scFv	156	SEQ ID NO: 49 в WO2016033570

CD19	scFv	157	SEQ ID NO: 5 B WO2015155341A1
CD19	scFv	158	SEQ ID NO: 5 B WO2015157252
CD19	scFv	159	SEQ ID NO: 51 B WO2016033570
CD19	scFv	160	SEQ ID NO: 53 B WO2016033570
CD19	scFv	161	SEQ ID NO: 55 B WO2016033570
CD19	scFv	162	SEQ ID NO: 57 B WO2016033570
CD19	scFv	163	SEQ ID NO: 59 B WO2015157252
CD19	scFv	164	SEQ ID NO: 59 B WO2016033570
CD19	scFv	165	SEQ ID NO: 6 B WO2015157252
CD19	scFv	166	SEQ ID NO: 6 B WO2016033570
CD19	scFv	167	SEQ ID NO: 7 B WO2014184143
CD19	scFv	168	SEQ ID NO: 7 B WO2015157252
CD19	scFv	169	SEQ ID NO: 8 B WO2015157252
CD19	scFv	170	SEQ ID NO: 8 B WO2016033570
CD19	scFv	171	SEQ ID NO: 87 B WO2016033570
CD19	scFv	172	SEQ ID NO: 9 B WO2015157252
CD19	scFv	173	SEQ ID NO: 9 B WO2016139487
CD19	scFv	174	SEQ ID NO: 10 B US20160152723
CD19	scFv	175	SEQ ID NO: 2 B US20160152723
CD19	scFv	176	SEQ ID NO: 206 B US20160152723
CD19	scFv	177	SEQ ID NO: 207 B US20160152723
CD19	scFv	178	SEQ ID NO: 208 B US20160152723
CD19	scFv	179	SEQ ID NO: 209 B US20160152723
CD19	scFv	180	SEQ ID NO: 210 B US20160152723
CD19	scFv	181	SEQ ID NO: 211 B US20160152723
CD19	scFv	182	SEQ ID NO: 212 B US20160152723
CD19	scFv	183	SEQ ID NO: 213 B US20160152723
CD19	scFv	184	SEQ ID NO: 214 B US20160152723
CD19	scFv	185	SEQ ID NO: 215 B US20160152723
CD19	scFv	186	SEQ ID NO: 216 B US20160152723
CD19	scFv	187	SEQ ID NO: 217 B US20160152723
CD19	scFv	188	SEQ ID NO: 218 B US20160152723
CD19	scFv	189	SEQ ID NO: 219 B US20160152723
CD19	scFv	190	SEQ ID NO: 220 B US20160152723
CD19	scFv	191	SEQ ID NO: 221 B US20160152723
CD19	scFv	192	SEQ ID NO: 222 B US20160152723
CD19	scFv	193	SEQ ID NO: 223 B US20160152723
CD19	scFv	194	SEQ ID NO: 224 B US20160152723
CD19	scFv	195	SEQ ID NO: 225 B US20160152723
CD19	scFv	196	SEQ ID NO: 32 B EP3083691A2

CD19	scFv	197	SEQ ID NO: 35 B EP3083691A2
CD19	scFv	198	SEQ ID NO: 38 B EP3083691A2
CD19	scFv	199	SEQ ID NO: 4 B US20160152723
CD19	scFv	200	SEQ ID NO: 45 B US20160152723
CD19	scFv	201	SEQ ID NO: 47 B US20160152723
CD19	scFv	202	SEQ ID NO: 49 B US20160152723
CD19	scFv	203	SEQ ID NO: 51 B US20160152723
CD19	scFv	204	SEQ ID NO: 53 B US20160152723
CD19	scFv	205	SEQ ID NO: 55 B US20160152723
CD19	scFv	206	SEQ ID NO: 57 B US20160152723
CD19	scFv	207	SEQ ID NO: 59 B US20160152723
CD19	scFv	208	SEQ ID NO: 6 B US20160152723
CD19	scFv	209	SEQ ID NO: 8 B US20160152723
CD19	scFv	210	SEQ ID NO: 87 B US20160152723
CD19	scFv	211	SEQ ID NO: 89 B US20160152723
CD19	scFv	212	SEQ ID NO: 39 B WO2016109410
CD19	scFv	213	SEQ ID NO: 37 B EP3083671A1
CD19	scFv	214	SEQ ID NO: 174 B WO2016115482
CD19	scFv	215	SEQ ID NO: 20 B WO2012079000
CD19	scFv	216	SEQ ID NO: 32 B WO2015092024
CD19	scFv	217	SEQ ID NO: 33 B WO2015092024A2
CD19	scFv	218	SEQ ID NO: 35 B WO2015092024A2
CD19	scFv	219	SEQ ID NO: 38 B WO2015092024A2
CD19	scFv	220	SEQ ID NO: 40 B WO2016109410
CD19	scFv	221	SEQ ID NO: 41 B WO2016109410
CD19	scFv	222	SEQ ID NO: 42 B WO2016109410
CD19	scFv	223	SEQ ID NO: 43 B WO2016109410
CD19	scFv	224	SEQ ID NO: 44 B WO2016109410
CD19	scFv	225	SEQ ID NO: 45 B WO2016109410
CD19	scFv	226	SEQ ID NO: 46 B WO2016109410
CD19	scFv	227	SEQ ID NO: 47 B WO2016109410
CD19	scFv	228	SEQ ID NO: 48 B WO2016109410
CD19	scFv	229	SEQ ID NO: 49 B WO2016109410
CD19	scFv	230	SEQ ID NO: 5 B WO2015155341A1
CD19	scFv	231	SEQ ID NO: 50 B WO2016109410
CD19	scFv	232	SEQ ID NO: 51 B WO2016109410
CD19	scFv	233	SEQ ID NO: 7 B US20160145337A1
CD19	scFv	234	SEQ ID NO: 9 B US20160145337A1
CD19	scFv	235	SEQ ID NO: 20 B US9499629B2
CD19	scFv	236	SEQ ID NO: 6 B WO2015155341A1

CD19	scFv	237	SEQ ID NO: 73 в WO2016164580
CD19	scFv	238	SEQ ID NO: 10 US20160152723
CD19	scFv	239	SEQ ID NO: 2 в US20160152723
CD19	scFv	240	SEQ ID NO: 206 в US20160152723
CD19	scFv	241	SEQ ID NO: 207 в US20160152723
CD19	scFv	242	SEQ ID NO: 209 в US20160152723
CD19	scFv	243	SEQ ID NO: 210 в US20160152723
CD19	scFv	244	SEQ ID NO: 212 в US20160152723
CD19	scFv	245	SEQ ID NO: 216 в US20160152723
CD19	scFv	246	SEQ ID NO: 218 в US20160152723
CD19	scFv	247	SEQ ID NO: 219 в US20160152723
CD19	scFv	248	SEQ ID NO: 220 в US20160152723
CD19	scFv	249	SEQ ID NO: 221 в US20160152723
CD19	scFv	250	SEQ ID NO: 222 в US20160152723
CD19	scFv	251	SEQ ID NO: 223 в US20160152723
CD19	scFv	252	SEQ ID NO: 224 в US20160152723
CD19	scFv	253	SEQ ID NO: 225 в US20160152723
CD19	scFv	254	SEQ ID NO: 4 в US20160152723
CD19	scFv	255	SEQ ID NO: 45 в US20160152723
CD19	scFv	256	SEQ ID NO: 47 в US20160152723
CD19	scFv	257	SEQ ID NO: 49 в US20160152723
CD19	scFv	258	SEQ ID NO: 51 в US20160152723
CD19	scFv	259	SEQ ID NO: 53 в US20160152723
CD19	scFv	260	SEQ ID NO: 55 в US20160152723
CD19	scFv	261	SEQ ID NO: 57 в US20160152723
CD19	scFv	262	SEQ ID NO: 59 в US20160152723
CD19	scFv	263	SEQ ID NO: 6 в US20160152723
CD19	scFv	264	SEQ ID NO: 8 в US20160152723
CD19	scFv	265	SEQ ID NO: 87 в US20160152723
CD19	scFv	266	SEQ ID NO: 89 в US20160152723
CD19	scFv	267	SEQ ID NO: 5 в WO2016055551

Внутриклеточные сигнальные домены

[00211] Внутриклеточный домен гибридного полипептида ХАР после связывания с его молекулой-мишенью передает сигнал иммунной эффекторной клетке, активируя по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций иммунных эффекторных клеток, включая цитолитическую активность (например, секрецию цитокинов) или вспомогательную активность. Следовательно, внутриклеточный домен содержит «внутриклеточный сигнальный домен» Т-клеточного рецептора (ТКР).

[00212] В некоторых аспектах, может использоваться весь внутриклеточный сигнальный домен. В других аспектах, усеченная часть внутриклеточного сигнального домена может использоваться вместо целой цепи, если она передает сигнал эффекторной функции.

[00213] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен согласно данному изобретению может содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные тирозин-содержащие активационные мотивы (ИТАМ). Примеры ИТАМ-содержащих цитоплазматических сигнальных последовательностей включают в себя последовательности, полученные из CD3-дзета ТКР, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В одном примере, внутриклеточный сигнальный домен представляет собой сигнальный домен CD3 дзета (CD3 ζ).

[00214] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная область согласно данному изобретению дополнительно содержит один или большее количество ко-стимулирующих сигнальных доменов, которые обеспечивают дополнительные сигналы для иммунных эффекторных клеток. Эти ко-стимулирующие сигнальные домены в комбинации с сигнальным доменом могут дополнительно улучшить деление, активацию, функцию запоминания, устойчивость и эффективность уничтожения опухолей сконструированными иммунными клетками ХАР (например, Т-лимфоцитами ХАР). В некоторых случаях, ко-стимулирующая сигнальная область содержит 1, 2, 3 или 4 цитоплазматических домена одной или большего количества внутриклеточных сигнальных и/или ко-стимулирующих молекул. Ко-стимулирующий сигнальный домен может быть внутриклеточным/цитоплазматическим доменом ко-стимулирующей молекулы, включая, но не ограничиваясь лишь этими: CD2, CD7, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, ICOS (CD278), GITR (рецептор фактора некроза опухолей, индуцированный глюкокортикоидами), LFA-1 (антиген-1, связанный с функцией лимфоцитов), LIGHT, NKG2C, B7-H3. В одном примере, ко-стимулирующий сигнальный домен получен из цитоплазматического домена CD28. В другом примере, ко-стимулирующий сигнальный домен получен из цитоплазматического домена 4-1BB (CD137). В другом примере, ко-стимулирующий сигнальный домен может представлять собой внутриклеточный домен GITR, как описано в патенте США № 9175308; содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00215] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная область согласно данному изобретению может содержать функциональный сигнальный домен из белка, выбранного из группы, состоящей из: молекулы ГКГС класса I, белка рецептора ФНО, иммуноглобулин-подобного белка, рецептора цитокинов, интегрина, сигнального белка активации лимфоцитов (SLAM), например CD48, CD229, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME, CD2F-10, SLAMF6, SLAMF7, активирующего рецептора NK-клеток, BTLA, рецептора лиганда Toll, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, ИЛ2R бета, ИЛ2R гамма, ИЛ7R альфа, ИЛ15Ra, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, NKD2C SLP76, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, CD270 (HVEM), GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда, который специфически связывается с CD83, DAP 10, TRIM, ZAP70, иммуноглобулин-подобных рецепторов клеток киллеров (KIR), таких как KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2, KIR3DL3, и KIR2DP1; лектин-родственных рецепторов NK-клеток, таких как Ly49, Ly49A и Ly49C.

[00216] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен согласно данному изобретению может содержать сигнальные домены, полученные из JAK-STAT. В других вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен согласно данному изобретению может содержать сигнальные домены, полученные из DAP-12 (белок 12, ассоциированный с клеточной гибелью) (Topfer et al., *Immunol.*, 2015, 194: 3201-3212; и Wang et al., *Cancer Immunol.*, 2015, 3: 815-826). DAP-12 является ключевым рецептором трансдукции сигнала в NK-клетках. Активирующие сигналы, опосредованные DAP-12, играют важную роль в иницировании реакций цитотоксичности NK-клеток в отношении определенных опухолевых клеток и клеток, инфицированных вирусом. Цитоплазматический домен DAP12 содержит иммунорецепторный тирозин-содержащий активационный мотив (ITAM). Соответственно, ХАР, содержащий полученный из DAP12 сигнальный домен, может использоваться для адаптивного переноса NK-клеток.

[00217] В некоторых вариантах осуществления, Т-лимфоциты, сконструированные с двумя или большим количеством ХАР, содержащих различные ко-стимулирующие домены и регулируемые различными ДД, могут использоваться для обеспечения кинетического контроля нисходящего сигналинга.

[00218] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен согласно данному изобретению может содержать аминокислотные последовательности из Таблицы 6.

Таблица 6: Внутриклеточные сигнальные и ко-стимулирующие домены

Описание	Аминокислотная последовательность	Аминокислотный SEQ ID
ко-стимулирующий домен 2B4	WRRKRKEKQSETSPKEFLTIIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFF GGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQSRKSGSRKRN HSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPAPRLSRKELENFDFVYS	268
ко-стимулирующий домен CD27	HQRRKYRSNKGESPVPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYR KPEPACSP	269
ко-стимулирующий домен CD272 (BTLA1)	RRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQ VLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGVYA SLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS	270
ко-стимулирующий домен CD272 (BTLA1)	CCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQ NSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPG IVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS	271
ко-стимулирующий CD28	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV	272
ко-стимулирующий домен CD28	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC EL	273
ко-стимулирующий домен CD28	FWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDF AAYRS	274
ко-стимулирующий домен CD28	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY RS	275
ко-стимулирующий	RSKRSRGGHSDYIVINMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA	276

домен CD28	YRS	
ко-стимулирующая сигнальная область CD28	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSC KYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQQLQVY SKTGFNCDGKLGNESVTFYLNLYVNQTDIYFCKIEVMYP PPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPGPSKPFWVLVVVG GVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPG PTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	277
ко-стимулирующий домен CD30	RRACRKIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLR SGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLESPLQD ASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKADTVIVG TVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPL GSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK	278
ко-стимулирующий домен CD30	RRACRKIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLR SGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLESPLQD ASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKADTVIVG TVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPL GSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK	279
ко-стимулирующий домен GITR	HIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFP EEERGE RSAEEKGRLGDLWV	280
ко-стимулирующий домен HVEM	CVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPP DVTTVAVEETIPSFTGRSPNH	281
ко-стимулирующий домен ICOS	TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL	282
ко-стимулирующий сигнальный домен ICOS	CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL	283
ко-стимулирующая область LAG-3	HLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEP EPEPEPEPEPEQL	284
ко-стимулирующий домен OX40	ALYLLRRDQRLPPDAH KPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLA KI	285
ко-стимулирующий домен OX40	RRDQRLPPDAH KPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI	286
внутриклеточный домен 4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTIQEEDGCSCRFPEEEEGGCE L	287
сигнальный домен 4- 1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGY EL	288
внутриклеточный домен 4-1BB-CD3Zeta	TGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG	289

	HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
эндодоменный гибрид 4-1BB-Z	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	290
внутриклеточный домен CD127	KRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSNPESFLDC QIHRVDDIQARDEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQS PNCPSDEVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSL DCRESGKNGPHVYQDLLLSLGTNTSTLPPFSLQSGILTLN PVAQQQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	291
внутриклеточный домен CD137	RFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCEL	292
внутриклеточный домен CD148	RKKRKDAKNNEVSFSQIKPKKSKLIRVENFEAYFKKQQAD SNCGFAEEYEDLKLVGISQPKYAAELAENRGKNRYNNVL PYDISRVKLSVQTHSTDDYINANYMPGYHKKDFIATQGP LPNTLKDFWRMVWEKNVYAIIMLTKEVEQGRTKCEEYW PSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSSEHP LRQFHFTSWPDHGVDPDTTDLINFRYLVRDYMKQSPPEPI LVHCSAGVGRGTGTFIAIDRLIYQIENENTVDVYGIVYDLR MHRPLMVQTEDQYVFLNQCVLDIVRSQKDSKVDLIYQNT TAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA	293
внутриклеточный домен CD27	QRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRK PEPACSP	294
внутриклеточный домен CD28	FAAYRS	295
сигнальная цепь CD28	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	296
сигнальный домен CD28	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY RS	297
сигнальный домен CD28	SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR S	298
сигнальный домен CD28	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFW VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN MTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	299
сигнальный домен CD28, 4-1BB, и/или CD3ζ	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY RSRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	300
CD28/CD3C	AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSK	301

	PFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	
внутриклеточный домен CD28-0XZ	RSKRSRLLHSDYNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	302
внутриклеточный домен CD28-4-1BB	MFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	303
внутриклеточный домен CD28-4-1BB	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFW VLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	304
внутриклеточный домен CD28-CD3 Zeta	RSKRSRLLHSDYNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	305
внутриклеточный домен CD28-CD3Zeta	KRSRLLHSDYNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	306
внутриклеточный сигнальный домен дельта цепи CD3	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDVRFVNCNTSIT WVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDK ESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLALGV FCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYS HLGGNWARNK	307
внутриклеточный сигнальный домен дельта цепи CD3	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDVRFVNCNTSIT WVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDK ESTVQVHYRTADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLG GNWARNK	308
внутриклеточный сигнальный домен дельта цепи CD3	DQVYQPLRDRDDAQYSHLGGN	309
внутриклеточный домен CD3 дельта	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDVRFVNCNTSIT WVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDK ESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLALGV FCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYS HLGGNWARNK	310
внутриклеточный	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDVRFVNCNTSIT	311

домен CD3 дельта	WVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDK ESTVQVHYRTADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLG GNWARNK	
внутриклеточный домен CD3 дельта	DQVYQPLRDRDDAQYSHLGGN	312
внутриклеточный домен CD3 эпсилон	MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQDGNEEMGGITQTPYKV SISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGEDDDKNIGSDE DHLSSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVC ENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYWSKNRKAK AKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPYRKGQRD LYSGLNQRI	313
внутриклеточный домен CD3 эпсилон	NPDYEPYRKGQRDLYSGLNQR	314
внутриклеточный домен CD3 гамма	MEQGKGLAVLILAII LLQGT LAQSIKGNHLVKVYDYQEDG SVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLG SNAK DPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATISGF LFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVRSRASDKQTLLPNDQ LYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN,	315
внутриклеточный домен CD3 гамма	DQLYQPLKDREDDQYSHLQGN	316
внутриклеточный домен CD3 гамма	DQLYQPLKDREDDQYSHLQGN	317
внутриклеточный домен CD3 гамма	MEQGKGLAVLILAII LLQGT LAQSIKGNHLVKVYDYQEDG SVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLG SNAK DPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATISGF LFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVRSRASDKQTLLPNDQ LYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN	318
внутриклеточный домен CD3 дзета	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFI YGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR	319
внутриклеточный домен CD3 дзета	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFI YGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	320
внутриклеточный домен CD3 дзета	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFI YGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL	321

	HMQALPPR	
внутриклеточный домен CD3 дзета	NQLYNELNLGRREEYDVLDKR	322
домен 2 CD3 дзета (NM_000734.3)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	323
внутриклеточный домен CD3 дзета	DGLYQGLSTATKDTYDALHMQ	324
внутриклеточный домен CD3 дзета	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	325
внутриклеточный домен CD3 дзета	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	326
внутриклеточный домен CD3 дзета	RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	327
внутриклеточный домен CD3 дзета	RVKFSRSADAPAYQQGEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR	328
внутриклеточный домен CD3 дзета	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEVDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	329
внутриклеточный домен CD3 дзета	MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLVGIVLTL LVCRLKIQVRKAITSYEKSRVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL YNELQKDKMAEAVSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR	330
внутриклеточный домен CD3 дзета	LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	331
внутриклеточный домен CD3 дзета	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY	332
внутриклеточный домен CD3 дзета	LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	333
внутриклеточный домен CD3 дзета	RRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	334
внутриклеточный домен CD3 дзета	NQLYNELNLGRREEYDVLDKR	335

внутриклеточный домен CD3 дзета	EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK	336
внутриклеточный домен CD3 дзета	DGLYQGLSTATKDTYDALHMQ	337
внутриклеточный домен CD3 дзета	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	338
внутриклеточный домен CD3 дзета	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	339
внутриклеточный домен CD3 дзета	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP	340
внутриклеточный домен CD3 дзета	DPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKQRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR	341
внутриклеточный домен CD3 дзета	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFI YGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR	342
внутриклеточный домен CD40	RSRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI	343
внутриклеточный домен CD79A	MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVP ASLMVSLGEDAHFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTWP PEFLGPGEDPNGTLIIQNVNKS HGGIYVCRVQEGNESYQQ SCGTYLRVRQPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCAVVP GTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCS MYEDISRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLEKP	344
внутриклеточный домен CD79A	MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVP ASLMVSLGEDAHFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTWP PEFLGPGEDPNEPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCAV VPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDC SMYEDISRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLEKP	345
внутриклеточный домен CD79A	MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVP ASLMVSLGEDAHFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTWP PEFLGPGEDPNGTLIIQNVNKS HGGIYVCRVQEGNESYQQ SCGTYLRVRQPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCAVVP GTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCS MYEDISRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLEKP	346

внутриклеточный домен CD79A	ENLYEGLNLDDCSMYEDISRG	347
внутриклеточный домен CD8	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHR NR	348
внутриклеточный домен CD8	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHR NR	349
внутриклеточный домен CD8a	PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDI	350
внутриклеточный домен CTLA4	AVSLSKMLKKRSPLTTGVFVKMAPTEAECEKQFQPYFIPI N	351
внутриклеточный домен CTLA4	AVSLSKMLKKRSPLTTGVYMNMTPRRPECEKQFQPYAPP RDFAAYRS	352
внутриклеточный домен DAP10	RPRRSPAQDGKVVYINMPGRG	353
внутриклеточный домен DAP12	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSP GVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAAT RKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK	354
внутриклеточный домен DAP12	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSP GVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATR KQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK	355
внутриклеточный домен DAP12	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDL VLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRQRITETESPY QELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK	356
внутриклеточный домен DAP12	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDL VLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRQRITETESPYQ ELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK	357
внутриклеточный домен DAP12	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSP GVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAAT RKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK	358
внутриклеточный домен DAP12	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSP GVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATR KQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK;	359
внутриклеточный домен DAP12	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDL VLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRQRITETESPY QELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK	360
внутриклеточный домен DAP12	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDL VLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRQRITETESPYQ ELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK	361
внутриклеточный	ESPYQELQGQRSDVYSDLNTQ	362

домен DAP12		
внутриклеточный домен DAP12	ESPYQELQGQRSDVYSDLNTQ	363
внутриклеточный домен G1TR	RSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFPEEERGERSAEE KGRLGDLWV	364
внутриклеточный домен ICOS	TKKKYSSSVHDPNGEFMFMRVNTAKKSRLTDVTL	365
внутриклеточный домен ИЛ15Ra	KSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLNCSHHL	366
внутриклеточный домен OX40-CD3 дзета	RRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	367
внутриклеточный домен ZAP70	MPDPA AHL PFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCL RSLGGYVLSLVH D VRFHHFPIERQLNGTYAIAGGKAHCGP AELCEFYSRDPDGLPCNLRKPCNRPSGLEPQPGVFDCLRD AMVRDYVRQTWKLEGEALEQAIISQAPQVEKLIATTAHE RMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQT DGKFLLRPRKEQGT YALSLIYGKTVYHYLISQDKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEY LKLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLP AHPSTLT HPQRRIDTLNSDGYTPEPARITSPDKPRPMPMDTSVYESPY SDPEELKDKKLFLKRDNLLIADIELGCGNFGSVRQGVYRM RKKQIDVAIKVLKQGTEKADTEEMMREAQIMHQLDNPIY VRLIGVCQAEALMLVMEMAGGGPLHKFLVGKREEIPVSN VAELLHQVSMGMKYLEEKNFVHRDLAARNVLLVNRHYA KISDFGLSKALGADDSYYTARSAGKWPLKWYAPECINFR KFSSRSDVWSYGVMTWEALSYGQKPYKKMKGPVMAFI EQGKRMECPPECPELYALMSDCWIYKWEDRPDFTLVEQ RMRACYYS LASKVEGPPGSTQKAEACA	368
внутриклеточный домен CD28	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLS C KYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQQLQVY SKTGFNC DGKLGNESVT FYLQNLVYNQTDIYFCKIEVMYP PPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVG GVLACYSLLVTVAFIIFWVR	369
внутриклеточный домен 4-1BB	MGN SCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNN RNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSST SNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKD CCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVC GPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLF LLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG	370
внутриклеточный	MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTL	371

домен гамма цепи Fc эпсилон рецептора I	LYCRLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKH EKPPQ	
внутриклеточный домен гамма цепи Fc эпсилон рецептора I	DGVYTGLSTRNQETYETLKHE	372
внутриклеточный домен гамма цепи Fc эпсилон рецептора I	DPKLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQVRKAAITSYEKSD GVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ	373
внутриклеточный домен гамма цепи Fc эпсилон рецептора I	DGVYTGLSTRNQETYETLKHE	374

Трансмембранные домены

[00219] В некоторых вариантах осуществления, ХАР согласно данному изобретению может содержать трансмембранный домен. Как применяется в данном документе, термин «трансмембранный домен (ТМ)» в широком смысле относится к аминокислотной последовательности длиной около 15 остатков, которая пронизывает плазматическую мембрану. Более предпочтительно, трансмембранный домен содержит, по меньшей мере, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 или 45 аминокислотных остатков и пронизывает плазматическую мембрану. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен согласно данному изобретению может быть получен либо из природного, либо из синтетического источника. Трансмембранный домен ХАР может быть получен из любого природного мембран-связанного или трансмембранного белка. Например, трансмембранная область может быть получена из (т. е. содержать, по меньшей мере, трансмембранную область(ти)) альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3 эпсилон, CD4, CD5, CD8, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152 или CD154.

[00220] В альтернативном варианте, трансмембранный домен согласно данному изобретению может быть синтетическим. В некоторых аспектах, синтетическая последовательность может содержать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин.

[00221] В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен согласно данному изобретению может быть выбран из группы, состоящей из трансмембранного домена CD8 α , трансмембранного домена CD4, трансмембранного домена CD28, трансмембранного домена CTLA-4, трансмембранного домена PD-1 и область Fc IgG₄ человека. В качестве неограничивающих примеров, трансмембранный домен может представлять собой трансмембранный домен CTLA-4, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-5 международной публикации патента № WO2014/100385; и трансмембранный домен PD-1, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6-8 международной публикации патента № WO2014100385; содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00222] В некоторых вариантах осуществления, ХАР согласно данному изобретению может содержать необязательную шарнирную область (также называемую спейсером). Шарнирная последовательность представляет собой короткую аминокислотную последовательность, которая обеспечивает подвижность внеклеточного нацеливающего домена, которая отдаляет нацеливающей связывающий домен от поверхности эффекторных клеток, чтобы обеспечить надлежащий контакт клетка/клетка, связывание

мишени и активацию эффекторных клеток (Patel et al., *Gene Therapy*, 1999; 6: 412-419). Шарнирная последовательность может быть расположена между нацеливающим фрагментом и трансмембранным доменом. Шарнирная последовательность может быть любой подходящей последовательностью, добытой или полученной из любой подходящей молекулы. Шарнирная последовательность может быть получена из всей или части шарнирной области иммуноглобулина (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), то есть последовательности, которая находится между доменами CH1 и CH2 иммуноглобулина, например шарнира Fc IgG4, внеклеточных областей мембранных белков типа 1, таких как CD8 α , CD4, CD28 и CD7, которая может быть последовательностью дикого типа или ее производным. Некоторые шарнирные области содержат домен CH3 иммуноглобулина, или как домен CH3, так и домен CH2. В некоторых вариантах осуществления, шарнирная область может быть модифицирована из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, что включает в себя замену одного или большего количества аминокислотных остатков, например, 1, 2, 3, 4 или 5 остатков, аминокислотным остатком, отличающимся от того, который присутствует в неизменной шарнирной области. В Таблице 7 предложены различные трансмембранные области, которые можно использовать в описанных в данном документе ХАР.

Таблица 7: Трансмембранные домены

Трансмембранный домен	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Трансмембранный домен CD8	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDI	375
Трансмембранный домен 2B4	FLVIIVILSALFLGTLACFCV	424
Трансмембранный домен 4-1BB	IISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGR	376
Трансмембранный домен 4-1BB	IISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVV	377
Трансмембранный домен CD134 (OX40)	VAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL	378
Трансмембранный и внутриклеточный домен CD148	AVFGCIFGALVIVTVGGFIFWRKKRKDAKNNEVSFSQIKPK KSKLIRVENFEAYFKKQQADSNCGFAEEYEDLKLVGISQPK YAAELAENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQTHSTDDYINA NYMPGYHKKDFIATQGPLPNTLKDFWRMVWEKNVYAI MLTKCVEQGRTKCEEYWPSKQAQDYGDITVAMTSEIVLPE VVTIRDFTVKNIQTSSEHPLRQFHFTSWPDHGVDPDITDLLIN FRYLVRDYMKQSPPEPILVHCSAGVGRTGTFAIDRLIYQI ENENTVDVYGIVYDLRMHRPLMVQTEDQYVFLNQCVDI VRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA	379
Трансмембранный домен CD148	AVFGCIFGALVIVTVGGFIFW	380
Трансмембранный домен CD2	KEITNALETWGALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSK KKIAQFRKEKETFEKDTYKLFKNGTLKIKHLKTDDQDIYK VSIYDTKGKNVLEKIFDLKIQERVSKPKISWTCINTTLTCEV	381

	MNGTDPELNLYQDGKHLKLSQRVITHKWTTSLSAKFKCTA GNKVSKESSVEPVSCPEKGLD	
Трансмембранный и внутриклеточный домен CD28	IEVMYPPPYLDNEKSNGTITHVKGKHLCPSPFPGPSKPFW VLVVVGGLACYSLLVTVAHIFWVRSKRSRLLHSDYMN TPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	382
Трансмембранный домен CD28	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV	383
Трансмембранный домен CD28	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWV LVVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV	384
Трансмембранный домен CD28	IFWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRR	385
Трансмембранный домен CD28	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM NMTPRRPGPTRKHYQP YAPPRDFAAYRS	386
Трансмембранный домен CD28	MFWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV	387
Трансмембранный домен CD28	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAHFHFWV	388
Трансмембранный домен CD28	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM NMTPRRPGPTRKHYQAYAAARDFAAYRS	425
Трансмембранный домен CD28	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWV LWVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT RRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	897
Трансмембранный домен CD28	MFWVLVVVGGLACYSGGVTVAFIIFWV	389
Трансмембранный домен CD28	WVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV	390
Трансмембранный домен CD28	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVR	898
Трансмембранный домен CD28	PFWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY MNMTTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	391
Трансмембранный домен CD28 и внутриклеточный домен CD28 и CD3 дзета	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	392
Трансмембранный домен CD28 и внутриклеточный домен CD28, OX40 и CD3 дзета	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKP PGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR	393

Трансмембранный домен CD28 и внутриклеточный домен CD3 дзета	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	394
Трансмембранный CD28-сигнальный домен CD3 дзета («28z»)	AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	395
Трансмембранный домен CD3 дзета	LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV	396
Трансмембранный домен CD3 дзета	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFL	397
Трансмембранный домен CD3 дзета	LCYLLDGILFIYGVILTALFL	398
Трансмембранный домен CD4	ALIVLGGVAGLLFIGLGIFFCVRC	399
Трансмембранный домен CD4	MALIVLGGVAGLLFIGLGIFF	400
Трансмембранный и внутриклеточный домен CD45	ALIAFLAFLIIVTSIALLVVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQELVERDDEKQLMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRLFLAEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFNQKNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVDDFWRMIWEQKATVIVMVTRCEEGRNRNKCAEYWPSMEEGTRAFGDVVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNKKEKATGREVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLKLRRRVNAFSNFFSGPIWHCSAGVGRTGTYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVKLRRQRCLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETEVLSELHPYLHNMMKKRDPPSEPSPLAEAFQRLPSYRSWRTQHIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPLKHELEMSKESEHDSDESSDDSDSEEPSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQRKVKVIVMLTELKHGDQEICAQYWGEKGQTYGDIEVDLKD TDKSSTYTLRVFELRHSKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISMIQWKQKLPQKNSSEGKHHKSTPLLIHCRDGSQQTGIFCALLNLLES AETEEWDIFQWKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIASTYPAQNGQVKKNHVEDKIEFDNEVDKVKQDANCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNGPASPALNQGS	401
Трансмембранный домен CD62L	PLFIPVAVMVTAFSGLAFIWL A	402
Трансмембранный домен	ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA	403

CD7		
Трансмембранный домен CD8	MALPVTALLLPLALLLHAARP	404
Трансмембранный домен CD8 и внутриклеточный домен CD28	AAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCN HRNRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFA AYRSRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	405
Трансмембранный домен CD8-сигнальный домен CD137 (4-1BB) и сигнальный домен CD3 дзета («BBz»)	AAATTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	406
Трансмембранный домен CD8a	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN	407
Трансмембранный домен CD8a	IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	408
Трансмембранный домен CD8a	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	409
Трансмембранный домен CD8a	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCR	410
Трансмембранный домен CD8a	PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCN	411
Трансмембранный домен CD8a	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLVCR	412
Трансмембранный домен CD8a	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT	413
Трансмембранный домен CD8a	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY	414
Трансмембранный домен CD8a (NP 001139345.1)	TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAWTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRR	899
Трансмембранный домен CD8b	LGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC	900
Трансмембранный домен DAP10	ILLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCARR	901
Трансмембранный домен E α R	APVGLVARLADESGHVVLRLWPPPETPMTSHIRYEVDVSA GNGAGSVQRVEILEGRTECVLSNLRGRTRYTFVRARMAE	415

	PSFGGFWSAWSEPVSLTTPSD	
Трансмембранный домен FcERI a	FFIPLLVVILFAVDTGLFISTQQQVTFLLIKIRTRKGFRLNP HPKPNPKNN	416
Трансмембранный домен FcERI a-	MAPAMESPTLLCVALLFFAPDGVLAVPQKPKVSLNPPWNR IFKGENVTLCNGNNFFEVSSTKWFHNGSLSEETNSSLNIV NAKFEDSGEYKQCQHQVNESEPVYLEVFSDWLLLQASAEV VMEGQPLFLRCHGWRNWDVYKVIYYKDGEALKYWYENH NISITNATVEDSGTYCTGKVVQLDYESEPLNITVIKAPRE KYWLQFFIPLLVVILFAVDTGLFISTQQQVTFLLIKIRTRKG FRLLNPHPKPNPKNN	417
Трансмембранная область FcERI b-	MDTESNRRANLALPQEPSSVPAFEVLEISPQEVSSGRLLKSA SSPPLHTWLTVLKKEQEF LGVTQILTAMICLCFGTVVCSVL DISHIEGDIFSSFKAGYPFWGAIFFSISGMLSISERRNATYLV RGS LGANTASSIAGGTGITILINLKSLAYIHHSCKFFETK CFMASFSTEIVVMMLFLTILGLGSAVSLTICGAGEELKGNK VPEDRVYEELNIYSATYSELEDPGEMSPPIDL	418
Трансмембранная область FcERI g-	MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLL YCRLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEK PPQ	419
Трансмембранный домен FcERIa	DIFIPLLVVILFAVDTGLFISTQQQVTFLLIKIRTRKGFRLLN PHPKPNPKNNR	420
Трансмембранный домен GITR	PLGWLTVVLLAVAACVLLLTSAQLGLHIWQL	421
Трансмембранный домен Her2	SIISAVVGILLVVVLGVVFGILII	422
Трансмембранный домен Her2	CHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPS GVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGC PAEQRASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILI	423
Трансмембранный домен ICOS	FWLPIGCAAFVVVCILGCILI	902
Трансмембранный домен IgG1	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD	903
Трансмембранный домен LAG-3	LLFLILGVLSLLLLVTGAFGF	904
Трансмембранный домен OX40	VAAILGLGLVLGLLGPLAILL	905
Трансмембранный домен	VGWGGLLGSLVLLVWVLAVI	906

PD-1		
Трансмембранный домен	FWALVVVAGVLFNCYGLLVTVALCVIWT	907

[00223] Последовательности шарнирной области, полезные в данном изобретении, предложены в Таблице 8А.

Таблица 8А: Шарнирные области

Шарнирный домен	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Шарнир	DKTHT	426
Шарнир	CPPC	427
Шарнир	CPEPKSCDTPPPCPR	428
Шарнир	ELKTPLGDTTHT	429
Шарнир	KSCDKTHTCP	430
Шарнир	KCCVDCP	431
Шарнир	KYGPPCP	432
Шарнир C233P	VEPKSPDKTHTCPPCP	433
Шарнир C233S	LDPKSSDKTHTCPPCP	434
Шарнир CD28	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP	435
Шарнир CD8a	GGAVHTRGLDFA	436
Шарнир CD8a	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACD	437
Шарнир CD8a	AKPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACD	438
Шарнир CD8a	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACD	439
Шарнир CD8a	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACD	440
Шарнир CD8a	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT	441
Шарнир CD8a	PAKPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIY	442
Шарнир CD8a	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	443
Шарнир CD8a	TTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACD	444
Шарнир CD8a	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIY	445
Шарнир Delta5	LDKTHTCPPCP	446
Шарнир E α R	APVGLVARLADESGHVVLRLWPPPETPMTSHIRYEVDVS AGNGAGSVQRVEILEGRTECVLSNLRGRTRYTFVRARM	447

	AEPSFGGFWSAWSEPVSLTTPSD	
Шарнир FCRII α	GLAVSTISSFFPPGYQ	448
Шарнир Fc γ RIII α	GLAVSTISSFFPPGYQ	449
Шарнир	RWPESPKAQASSVPTAQPPQAEGSLAKATTAPATTRNTGR GGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAV QDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGV EEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPS LPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCE VSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFW AWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVS YVTDH	450
Шарнир	YVTVSSQDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGKKDPK	451
Шарнир	KPTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFA	452
Шарнир	LEPKSCDKTHTCPPCP	453
Шарнир	KPTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LD	454
Шарнир	EPKSCDKTHTCPPCP	455
Шарнир	ELKTPLGDTHTCPRCP	456
Шарнир	EPKSCDTPPPCPRCP	457
Шарнир	ESKYGPPCPSCP	458
Шарнир	ERKCCVECPCP	459
Шарнир (CH2- CH3)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	460
Шарнир (CH3)	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	461
Шарнир IgD	RWPESPKAQASSVPTAQPPQAEGSLAKATTAPATTRNTGR GGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAV QDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGV	462

	EEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPS LPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCE VSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFW AWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVS YVTDH	
Шарнир IgD	RWPESPKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGR GGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAV QDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGV EEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLHPSL PPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEV SGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWA WSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSY VTDH	463
Шарнир IgD	RWPESPKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGR GGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAV QDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGV EEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPS LPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCE VSGFSPPNILLMVLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFW AWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVS YVTDH	464
Шарнир IgD	ESPKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEE KKKEKEKEEQEERETKTP	465
Шарнир IgD	RWPESPKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGR GGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAV QDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGV EEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPS LPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCE VSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFW AWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVS YVTDH	466
Шарнир IgD	RWPESPKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGR GGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAV QDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGV EEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPS LPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCE VSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFW AWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVS YVTDH	467
Шарнир IgD	RWPESPKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGR GGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAV	468

	QDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGV EEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPS LPPQRLMALREPAAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCE VSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFW AWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVS YVTDH	
Шарнир IgD	RWPESPKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGR GGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAV QDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGV EEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPS LPPQRLMALREPAAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCE VSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFW AWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVS YVTDH	469
Шарнирный домен IgG1 (CH2CH3)	AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIART PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVUTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD	470
Шарнирный домен IgG1 (CH2CH3)	AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIART PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD	471
Шарнир IgG1	AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK	472
Шарнир IgG1	EPKSCDKTHTCPPCP	473
Шарнир IgG1	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD	474
Шарнир IgG1	SVFLFPPKPKDTL	475
Шарнир IgG1	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	476

Шарнир IgG1	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPK	477
Шарнир IgG1	VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	478
Шарнир IgG1 (домен CH2CH3)	DPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIA RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKK	479
Шарнир IgG2	ERKCCVECP	480
Шарнир IgG3	ELKTPLGDTTHTCPRCP	481
Шарнир IgG3	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPC PRCPEPKSCDTPPPCPRCP	482
IgG4 (CH2 и CH3)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKM	483
IgG4 (CH2 и CH3)	ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKM	484
Шарнир IgG4	SPNMVPHAHHAQ	485
Шарнир IgG4	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	486
Шарнир IgG4	ESKYGPPCPPCPGGGSSGGSGGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT	487

	QKSLSLSLGK	
Шарнир IgG4	ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHQAATKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFVPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK	488
Шарнир IgG4	ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHQAATKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFVPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK	489
Шарнир IgG4	ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAATKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGKM	490
Шарнир IgG4	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	491
Шарнир IgG4	ESKYGPPCPCP	492
Шарнир IgG4	ESKYGPPCPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK	493
Шарнир IgG4	ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAATKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK	494
Шарнир IgG4	ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAATKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK	495
Шарнир IgG4	ESKYGPPCPCP	496
Шарнир IgG4	YGPPCPCP	497
Шарнир IgG4	KYGPPCPCP	498
Шарнир IgG4	EVVKYGPPCPCP	499
Шарнир IgG4	ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT	500

	CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDLRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	
Шарнир линкер IgG4	ESKYGPPCPPCPGGGSSGGGSG	501
Шарнир IgG1	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTIPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	502
Шарнир IgG1	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTIPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	503
Шарнир IgG1	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	504

[00224] Последовательности шарнирной и трансмембранной областей, используемые в данном изобретении, представлены в Таблице 8В.

Таблица 8В: Шарнирная и Трансмембранная области

Шарнирный домен	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Трансмембранная шарнирная CD8a	TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	505
Трансмембранная шарнирная CD8a	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAWYQQK PGNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKDYTLISITSLQTE DVATYYCQYQWSTPFTFGSGTKLEIKGGGSGGGGSGGG GSQVQLKESGPGLVAPSQSLITSTVSGFSLSRYSVHWVR QPPGKGLEWLGMIWGGGSTDYNSALKSRLSISKDNSKSQ VFLKMNSLQTDITAMYYCARNEGDTTAGTWFAWYWGQG TLVTVSS	506
Трансмембранная	ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS	507

шарнирная CD8a		LRPEACRPAAGGAVHTRGLD	
Трансмембранная и шарнирная CD8a		TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY	508
Трансмембранная и шарнирная CD8a		KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY	509

[00225] В некоторых вариантах осуществления, ХАР согласно данному изобретению может содержать один или большее количество линкеров между любыми доменами ХАР. Линкер может иметь длину от 1 до 30 аминокислот. В связи с этим, линкер может быть 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот в длину. В других вариантах осуществления, линкер может быть гибким.

[00226] В некоторых вариантах осуществления, компоненты, включающие в себя нацеливающий фрагмент, трансмембранный домен и внутриклеточные сигнальные домены согласно данному изобретению, могут быть сконструированы в виде единого гибридного полипептида. Гибридный полипептид может быть полезный грузом эффекторного модуля согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления, в эффекторный модуль может быть включен больше чем один гибридный полипептид ХАР, например, два, три или большее количество ХАР могут быть включены в эффекторный модуль под управлением единственного ЭОС (например, ДД). Типичные эффекторные модули, содержащие полезный груз ХАР, показаны на Фиг. 2-6.

[00227] В некоторых вариантах осуществления, последовательности ХАР могут быть выбраны из Таблицы 9.

Таблица 9: Последовательности ХАР

Описание	SEQ ID NO	Источник
ХАР CD19	510	SEQ ID NO: 12 в US9499629B2
ХАР CD19	511	SEQ ID NO: 24 в US20160333108A1
ХАР CD19	512	SEQ ID NO: 25 в US20160333108A1
ХАР CD19	513	SEQ ID NO: 26 в US20160333108A1
ХАР CD19	514	SEQ ID NO: 27 в US20160333108A1
ХАР CD19	515	SEQ ID NO: 1 в EP2997134A4
ХАР CD19	516	SEQ ID NO: 19 в EP3071687A1
ХАР CD19	517	SEQ ID NO: 20 в EP3071687A1
ХАР CD19	518	SEQ ID NO: 181 в WO2016168773A3
ХАР CD19	519	SEQ ID NO: 2 в WO2015157399A9
ХАР CD19	520	SEQ ID NO: 56 в WO2016174409A1
ХАР CD19	521	SEQ ID NO: 62 в WO2016174409A1
ХАР CD19	522	SEQ ID NO: 145 в WO2016179319A1
ХАР CD19	523	SEQ ID NO: 293 в US20160311907A1
ХАР CD19	524	SEQ ID NO: 294 в US20160311907A1
ХАР CD19	525	SEQ ID NO: 295 в US20160311907A1

XAP CD19	526	SEQ ID NO: 296 B US20160311907A1
XAP CD19	527	SEQ ID NO: 297 B US20160311907A1
XAP CD19	528	SEQ ID NO: 298 B US20160311907A1
XAP CD19	529	SEQ ID NO: 73 B WO2013176915A1
XAP CD19	530	SEQ ID NO: 73 B WO2013176916A1
XAP CD19	531	SEQ ID NO: 73 B US20130315884A1
XAP CD19	532	SEQ ID NO: 73 B US20140134142A1
XAP CD19	533	SEQ ID NO: 73 B US20150017136A1
XAP CD19	534	SEQ ID NO: 73 B US20150203817A1
XAP CD19	535	SEQ ID NO: 73 B US20160120905A1
XAP CD19	536	SEQ ID NO: 73 B US20160120906A1
XAP CD19	537	SEQ ID NO: 8 B WO2015124715
XAP CD19	538	SEQ ID NO: 5 B WO2015124715
XAP CD19	539	SEQ ID NO: 73 B WO2014184744
XAP CD19	540	SEQ ID NO: 73 B WO2014184741
XAP CD19	541	SEQ ID NO: 14 B US20160145337A1
XAP CD19	542	SEQ ID NO: 15 B US20160145337A1
XAP CD19	543	SEQ ID NO: 14 B WO2014184143
XAP CD19	544	SEQ ID NO: 15 B WO2014184143
XAP CD19	545	SEQ ID NO: 15 B WO2015075175
XAP CD19	546	SEQ ID NO: 16 B WO2015075175
XAP CD19	547	SEQ ID NO: 16 B US20160145337A1
XAP CD19	548	SEQ ID NO: 16 B WO2014184143
XAP CD19	549	SEQ ID NO: 12 B WO2012079000
XAP CD19	550	SEQ ID NO: 31 B WO2016164580
XAP CD19	551	SEQ ID NO: 32 B WO2016164580
XAP CD19	552	SEQ ID NO: 33 B WO2016164580
XAP CD19	553	SEQ ID NO: 34 B WO2016164580
XAP CD19	554	SEQ ID NO: 35 B WO2016164580
XAP CD19	555	SEQ ID NO: 36 B WO2016164580
XAP CD19	556	SEQ ID NO: 37 B WO2016164580
XAP CD19	557	SEQ ID NO: 38 B WO2016164580
XAP CD19	558	SEQ ID NO: 39 B WO2016164580
XAP CD19	559	SEQ ID NO: 40 B WO2016164580
XAP CD19	560	SEQ ID NO: 41 B WO2016164580
XAP CD19	561	SEQ ID NO: 42 B WO2016164580
XAP CD19	562	SEQ ID NO: 58 B WO2016164580
XAP CD19	563	SEQ ID NO: 14 B US20160296563A1
XAP CD19	564	SEQ ID NO: 15 B US20160296563A1
XAP CD19	565	SEQ ID NO: 31 B WO2015157252

XAP CD19	566	SEQ ID NO: 32 B WO2015157252
XAP CD19	567	SEQ ID NO: 33 B WO2015157252
XAP CD19	568	SEQ ID NO: 34 B WO2015157252
XAP CD19	569	SEQ ID NO: 35 B WO2015157252
XAP CD19	570	SEQ ID NO: 36 B WO2015157252
XAP CD19	571	SEQ ID NO: 37 B WO2015157252
XAP CD19	572	SEQ ID NO: 38 B WO2015157252
XAP CD19	573	SEQ ID NO: 39 B WO2015157252
XAP CD19	574	SEQ ID NO: 40 B WO2015157252
XAP CD19	575	SEQ ID NO: 41 B WO2015157252
XAP CD19	576	SEQ ID NO: 42 B WO2015157252
XAP CD19	577	SEQ ID NO: 14 B WO2016139487
XAP CD19	578	SEQ ID NO: 15 B WO2016139487
XAP CD19	579	SEQ ID NO: 53 B US20160250258A1
XAP CD19	580	SEQ ID NO: 54 B US20160250258A1
XAP CD19	581	SEQ ID NO: 55 B US20160250258A1
XAP CD19	582	SEQ ID NO: 56 B US20160250258A1
XAP CD19	583	SEQ ID NO: 57 B US20160250258A1
XAP CD19	584	SEQ ID NO: 58 B US20160250258A1
XAP CD19	585	SEQ ID NO: 1 B WO2015187528
XAP CD19	586	SEQ ID NO: 2 B WO2015187528
XAP CD19	587	SEQ ID NO: 3 B WO2015187528
XAP CD19	588	SEQ ID NO: 4 B WO2015187528
XAP CD19	589	SEQ ID NO: 5 B WO2015187528
XAP CD19	590	SEQ ID NO: 6 B WO2015187528
XAP CD19	591	SEQ ID NO: 7 B WO2015187528
XAP CD19	592	SEQ ID NO: 8 B WO2015187528
XAP CD19	593	SEQ ID NO: 9 B WO2015187528
XAP CD19	594	SEQ ID NO: 10 B WO2015187528
XAP CD19	595	SEQ ID NO: 11 B WO2015187528
XAP CD19	596	SEQ ID NO: 12 B WO2015187528
XAP CD19	597	SEQ ID NO: 13 B WO2015187528
XAP CD19	598	SEQ ID NO: 31 B WO2015157252
XAP CD19	599	SEQ ID NO: 32 B WO2015157252
XAP CD19	600	SEQ ID NO: 33 B WO2015157252
XAP CD19	601	SEQ ID NO: 34 B WO2015157252
XAP CD19	602	SEQ ID NO: 35 B WO2015157252
XAP CD19	603	SEQ ID NO: 36 B WO2015157252
XAP CD19	604	SEQ ID NO: 37 B WO2015157252
XAP CD19	605	SEQ ID NO: 38 B WO2015157252

XAP CD19	606	SEQ ID NO: 39 в WO2015157252
XAP CD19	607	SEQ ID NO: 40 в WO2015157252
XAP CD19	608	SEQ ID NO: 41 в WO2015157252
XAP CD19	609	SEQ ID NO: 42 в WO2015157252
XAP CD19	610	SEQ ID NO: 58 в WO2015157252
XAP CD19	611	SEQ ID NO: 31 в WO2014153270
XAP CD19	612	SEQ ID NO: 32 в WO2014153270
XAP CD19	613	SEQ ID NO: 33 в WO2014153270
XAP CD19	614	SEQ ID NO: 34 в WO2014153270
XAP CD19	615	SEQ ID NO: 35 в WO2014153270
XAP CD19	616	SEQ ID NO: 36 в WO2014153270
XAP CD19	617	SEQ ID NO: 37 в WO2014153270
XAP CD19	618	SEQ ID NO: 38 в WO2014153270
XAP CD19	619	SEQ ID NO: 39 в WO2014153270
XAP CD19	620	SEQ ID NO: 40 в WO2014153270
XAP CD19	621	SEQ ID NO: 41 в WO2014153270
XAP CD19	622	SEQ ID NO: 42 в WO2014153270
XAP CD19 (третьего поколения)	623	SEQ ID NO: 13 в WO2016139487

[00228] В одном варианте осуществления данного изобретения, полезный груз согласно данному изобретению представляет собой CD19 специфический XAP, нацеленный на разные В-лимфоциты. В контексте изобретения, эффекторный модуль может содержать ДД hDNFR, ДД ecDNFR или ДД FKBP, функционально связанный с гибридной конструкцией XAP CD19. В некоторых случаях, промотор, используемый для управления экспрессией эффекторного модуля в векторе, может быть промотором ЦМВ или EF1a. Можно сравнивать эффективность промотора в управлении экспрессией одной и той же конструкции. Например, можно сравнивать две конструкции, которые отличаются только их промотором, промотором ЦМВ (в ОТ-CD19N-001) или EF1a (в ОТ-CD19N-017). Аминокислотные последовательности конструкций XAP CD19 и их компонентов представлены в Таблице 10a и Таблице 10b. Аминокислотные последовательности в Таблице 10a и/или Таблице 10b могут содержать стоп-кодон, который в таблице обозначен «*» в конце аминокислотной последовательности.

Таблица 10А: Последовательности компонентов XAP CD19

Описание	Аминокислотная последовательность	Аминокислотный SEQ ID NO	Нуклеотидный SEQ ID NO
scFv CD19	DIQMTQTTSSLSASLGDRVITSCRASQDISKYLNW YQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTD YSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEI TGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSL	624	626, 650-654

	SVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIW GSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQT DDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVS S		
Шарнир--TM CD8 α	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	625	627, 655, 982-984
Шарнир CD8 α	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACD	440	656-660
сигнальный домен CD3 дзета	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR	339	661-665, 986
внутриклеточный сигнальный домен 4- 1BB (41BB)	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCEL	273	666-670, 985
Трансмембранный домен CD8 α	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	409	990, 992
Лидер CD8 α	MALPVTALLLPLALLHAARP	628	671-675
сигнальная последовательность p40	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVA	719	736-744
p40	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEE DGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVK SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVVRGDNKEYEYSV ECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTS SFFIRDIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT WSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTS ATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	723	632-634, 752-761
p35	RNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVSNMLQKA RQTLEFYPTCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELT KNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSI YEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNM AVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKL CILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	724	762-771, 1012
ИЛ15	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILAN NSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTS	785	794-797, 1001
ИЛ15Ra	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKR	803	812-813,

	KAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPAL VHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPS SNNTAATTAAIVPGSQLMPSPSTGTTEISSHESS HGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTT VAISTSTVLLCGLSAVSLLACYLKSRQTPPLASVE MEAMEALPVTWGTSSRDEDLNCSHHL		1003
mCherry (M1L)	LSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIE GEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQ FMYGSKAYVKHPADIPDYLLKLSFPEGFKWERVM NFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFP DGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQR LKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNI KLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK	1029	1030
IRES	-	-	999
Линкер (GGSGG)	GGSGG	629	676-680
Линкер (SG)	SG	-	AGTGGA
Линкер ((G4S)3)	GGGGSGGGGSGGGGS	720	910-915
Линкер (GGSG)	GGSG	822	823
Линкер	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	1031	1032
Линкер (SG3-(SG4)3-SG3-SLQ)	SGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQ	802	811, 916-920, 1002
Модифицированный Фурин	ESRRVRRNKRSK	630	681-683
ВамHI	-	-	GGATCC
Спейсер	-	-	1000
Тэг HA	YPYDVPDYA	1024	1025-1027
FKBP (F36V, L106P)	GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGK KVDSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMS VGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVE LLKPE	11	684-686, 987, 989
FKBP (E31G, F36V, R71G, K105E)	GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLGDG KKVDSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGVAQM SVGQGAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDV ELLELE	12	688-691, 994, 1013, 1028
ecDHFR (аминокислота 2-159 ДТ) (R12Y, Y100I)	ISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRN TLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNILSSQPGTDD RVTWVKSVDIAAECGDVPEIMVIGGGRVIEQFLP KAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSE FHDADAQNSHSYCFEILERR	9	692, 772, 814, 687, 988, 991
ecDHFR (аминокислота 2-159)	ISLIAALAVDHVIGMENAMPWNLPADLAWFKRN TLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNILSSQPGTDD	10	798, 815, 993

ДТ) (R12H, E129K)	RVTWVKSVD EAIACGDVPEIMVIGGGRVYEQFL PKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYKPDDWESVFS EFHDADAQNSHSYCFEILERR		
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRYF QRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLK GRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVT RIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQE EKGIKYKFEVYEKND	895	694, 995
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Y122I, A125F)	VGSLNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRYF QRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLK GRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVIKEFMNHPGHLKLFVT RIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQE EKGIKYKFEVYEKND	890	696, 973, 974, 996
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Q36K, Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRYF KRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLK GRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVT RIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQE EKGIKYKFEVYEKND	981	698, 997
hDHFR (Q36F, N65F, Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRYF FRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKFRPLKG RINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPE LANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRI MQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEK GIKYKFEVYEKND	891	700, 975, 976, 998
Описание	Аминокислотная последовательность	Аминокислотный SEQ ID NO	Нуклеотидный SEQ ID NO
scFv CD19	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW YQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTD YSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEI TGGGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSL SVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIW GSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQT DDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVS S	624	626, 650- 654
Шарнир--ТМ CD8α	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	625	627, 655, 982-984

Шарнир CD8a	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACD	440	656-660
сигнальный домен CD3 дзета	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR	339	661-665, 986
внутриклеточный сигнальный домен 4- 1BB (41BB)	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCEL	273	666-670, 985
Трансмембранный домен CD8a	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	409	990, 992
Лидер CD8 α	MALPVTALLPLALLHAARP	628	671-675
сигнальная последовательность p40	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVA	719	736-744
p40	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEE DGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWTISTDLTFSVK SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSV ECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTS SFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT WSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTS ATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCS	723	632-634, 752-761
p35	RNLPVATPDPMFPLHHSQNLLRAVSNNMLQKA RQTLEFYPTCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELT KNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSI YEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNML AVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKL CILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	724	762-771, 1012
ИЛ15	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLES GDASIHTVENLIILAN NSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTS	785	794-797, 1001
ИЛ15Ra	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKR KAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPAL VHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPS SNNTAATTAAIVPGSQLMPKSPSTGTTEISSHESS HGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTT VAISTSTVLLCGLSAVSLLACYLKSRTPLASVE MEAMEALPVTWGTSSRDEDLNCSHHL	803	812-813, 1003

mCherry (M1L)	LSKGEEDNMAIIEKFMRFKVHMEGSVNGHEFEIE GEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQ FMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVM NFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPS DGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQR LKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNI KLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK	1029	1030
IRES	-	-	999
Линкер (GGSGG)	GGSGG	629	676-680
Линкер (SG)	SG	-	AGTGGA
Линкер ((G4S)3)	GGGSGGGGSGGGGS	720	910-915
Линкер (GGSG)	GGSG	822	823
Линкер	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	1031	1032
Линкер (SG3-(SG4)3-SG3-SLQ)	SGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQ	802	811, 916-920, 1002
Модифицированный Фурин	ESRRVRRNKRSK	630	681-683
BamHI	-	-	GGATCC
Спейсер	-	-	1000
Тэг HA	YPYDVPDYA	1024	1025-1027
FKBP (F36V, L106P)	GVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLLEDGK KVDSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMS VGQRAKL TISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVE LLKPE	11	684-686, 987, 989
FKBP (E31G, F36V, R71G, K105E)	GVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLGDG KKVDSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGVAQM SVGQGAKL TISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDV ELLELE	12	688-691, 994, 1013, 1028
ecDHFR (аминокислота 2-159 ДТ) (R12Y, Y100I)	ISLIAALAVDYGIGMENAMPWNLPADLAWFKRN TLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNILSSQPGTDD RVTWVKSVDEAIAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLP KAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSE FHDADAQNSHSYCFEILERR	9	692, 772, 814, 687, 988, 991
ecDHFR (аминокислота 2-159 ДТ) (R12H, E129K)	ISLIAALAVDHVIGMENAMPWNLPADLAWFKRN TLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNILSSQPGTDD RVTWVKSVDEAIAACGDVPEIMVIGGGRVYEQFL PKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYKPDDWESVFS EFHDADAQNSHSYCFEILERR	10	798, 815, 993
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRYF QRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLK GRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP	895	694, 995

	ELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVT RIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQE EKGIKYKFEVYEKND		
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Y122I, A125F)	VGSLNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRYF QRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLK GRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVIKEFMNHPGHLKLFVT RIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQE EKGIKYKFEVYEKND	890	696, 973, 974, 996
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Q36K, Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRYF KRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLK GRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVT RIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQE EKGIKYKFEVYEKND	981	698, 997
hDHFR (Q36F, N65F, Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRYF FRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKFRPLKG RINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPE LANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVT RIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEK GIKYKFEVYEKND	891	700, 975, 976, 998

Таблица 10b: Последовательности XAP CD19

Описание	Аминокислотная последовательность	Аминокислотный SEQ ID NO	Нуклеотидный SEQ ID NO
OT-CD19 CAR-001 (OT-CD19c-001) (лидер CD8a -CD19 scFV - CD8a-Tm -41BB - CD3-дзета - стоп- кодон)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDQMTQTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSETTYNSALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDETAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVVSSTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL RVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRG RDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHM	635	701

	QALPPR*		
ОТ-CD19 CAR-002 (ОТ-CD19c-002) (лидер CD8a - CD19 scFV -FKBP (F36V, L106P) -CD8a-Tm - 41BB -CD3-дзета - стоп-кодон)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDQMTQTTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKLEWLGVWGSSETTYNSALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVSSGVQVETISPGDG RTFPRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSDRNKP FKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPD YAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKPETTTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLY IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV KFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR*	636	702
ОТ-CD19 CAR-003 (ОТ-CD19c-003) (лидер CD8a - CD19 scFV -ecDHFR - CD8a- Tm - 41BB - CD3-дзета - стоп-кодон)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDQMTQTTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKLEWLGVWGSSETTYNSALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVSSISLIAALAVDYVI GMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRHT WESIGRPLPGRKNILSSQPGTDDRVTWVKSVDIA IAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHID AEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHS YCFEILERRTTTTAPRPPTPTAPTASQPLSLRPEACR PAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS LVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*	637	703

OT-CD19 CAR-004 (OT-CD19c-004) (лидер CD8a - CD19 scFV - шарнир CD8a - FKBP (F36V, L106P) - трансмембранный домен CD8a - 41BB - CD3-дзета - стоп- кодон)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDQMTQTTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN SALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVVSSTTTAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDGV QVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKV DSSDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVG QRAKL TISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELL KPEIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL R VKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR*	638	704
OT-CD19 CAR-005 (OT-CD19c-005) (лидер CD8a - CD19 scFV - шарнир CD8a - ecDHFR (аминокислота 2-159 ДТ) (R12Y, Y100I) - трансмембранный домен CD8a -41BB - CD3-дзета - стоп- кодон)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDQMTQTTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN SALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVVSSTTTAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDISLI AALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLN KPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNILSSQPGTDDR V TWVKSVD EAIACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPK AQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEF HDADAQNSHSYCFEILERRIYIWAPLAGTCGVLLL SLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*	639	705
OT-CD19c-006 (лидер CD8a -CD19 scFV - CD8a-Tm - 41BB -	MALPVTALLLPLALLLHAARPDQMTQTTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA	640	706

CD3-дзета -линкер (GGSGG) - ссDHFR (аминокислота 2-159 ДТ) (R12H, E129K) - стоп-кодон)	TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN SALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVVSSTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPRGSGGSLIAALAVDHVIGMENAMPWNL PADLAWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRK NILSSQPGTDDRVTWVKSVD EAIACGDVPEIMV IGGGRVYEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD YKPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERR*		
OT-CD19c-007 (лидер CD8a - CD19 scFV- CD8a-Tm - 41BB - CD3-дзета - линкер (GGSGG) -FKBP (E31G, F36V, R71G, K105E) -стоп-кодон)	MALPVTALLLPLALLLHAARPD IQMTQTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN SALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVVSSTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPRGSGGGGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCV VHYTGMLGDGKKVDSSRDRNKP FKFMLGKQEV I RGWEEGVAQMSVGQGA KLTISPDYAYGATGHPG IIPPHATLVFDVELLELE*	641	707
OT-CD19c-008 (лидер CD8a - CD19 scFV - CD8a-Tm -41BB - CD3- дзета - линкер (GGSGG) - hDHFR (аминокислоты 2-187	MALPVTALLLPLALLLHAARPD IQMTQTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN SALKS	642	708

ДТ; Y122I) - стоп- кодон)	RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVVSSTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPRGSGGVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLP WPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKT WFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRS LDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVIKEAM NHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLP EYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND*		
ОТ-CD19c-009 (лидер CD8a - CD19 scFV - CD8a-Tm - 41BB -CD3- дзета -линкер (GGSGG) - hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Y122I, A125F) - стоп-кодон)	MALPVTALLLPLALLHAARPDIQMTQTTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVWIGSETTYNSALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVVSSTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPRGSGGVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLP WPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKT WFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRS LDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVIKEFM NHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLP EYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND*	643	709
ОТ-CD19c-010 (лидер CD8a - CD19 scFV - CD8a-Tm - 41BB -CD3- дзета - линкер (GGSGG) -hDHFR (аминокислоты 2-187	MALPVTALLLPLALLHAARPDIQMTQTTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVWIGSETTYNSALKS	644	710

ДТ; Q36K, Y122I) - стоп-кодон)	RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVVSSTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPRGSGGVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLP WPPLRNEFRYFKRMTTSSVEGKQNLVIMGKKT WFSIPEKNRPLKGRINLVLRELKEPPQGAHFLSRS LDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVIKEAM NHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLP EYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND*		
ОТ-CD19с-011 (лидер CD8а -CD19 scFV - CD8а-Tm - 41BB -CD3- дзета - линкер (GGSGG) - hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Q36K, N65F, Y122I) - стоп-кодон)	MALPVTALLPLALLHAARPDIQMTQTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVWIGSETTYNSALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVVSSTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPRGSGGVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLP WPPLRNEFRYFFRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKFRPLKGRINLVLRELKEPPQGAHFLSRL DDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMN HPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPE YPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND*	645	711
ОТ-CD19n-012 (лидер CD8а - линкер (SG)- FKBP (F36V, L106P) - сайт фурина -CD19 scFV - CD8а-Tm - 41BB -CD3-дзета -	MALPVTALLPLALLHAARPSGGVQVETISPGDG RTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDKNP FKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPD YAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKPEESRRVRR NKRSKDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDIS KYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSG	646	712

СТОП-КОДОН)	SGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG GGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGL VAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLE WLGVIWGSETTYYN SALKSR LTIKD NSKSQVFLK MNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQG TSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*		
OT-CD19n-013 (лидер CD8a - линкер (SG)- ecDHFR (аминокислота 2-159 ДТ) (R12Y, Y100I) - сайт фурина - CD19 scFV -CD8a-Tm - 41BB - CD3-дзета - стоп- кодон)	MALPVTALLLPLALLLHAARPSGISLIAALAVDYVI GMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRHT WESIGRPLPGRKNILSSQPGTDDRVTWVKSVD EA IAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHID AEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHS YCFEILERRESRRVRRNKR SKDIQMTQTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYL N WYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGG TKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN SALKS RLTIKD NSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKH YYGGSYAMDYWGQGT S VTVSSTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR*	647	713
OT-CD19n-014 (лидер CD8a - линкер (SG)- hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Y122I, A125F) - сайт фурина - CD19 scFV - CD8a-Tm -41BB -CD3-дзета -	MALPVTALLLPLALLLHAARPSGVGSLNCIVAVSQ NMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGK QNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKE PPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV GGSSVIKEFMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEI DLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKN DESRRVRRNKR SKDIQMTQTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISKYL N WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS	648	714

СТОП-КОДОН)	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQG NTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVK LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDN SKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYA MDYWQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGT CGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR *		
ОТ-CD19n-015 (лидер CD8a - линкер (SG)- hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Q36K, Y122I) - сайт фурина - CD19 scFV - CD8a-Тm - 41BB - CD3-дзета - СТОП-КОДОН)	MALPVTALLLPLALLHAARPSGVGSLNCIVAVSQ NMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFKRMTTSSVEGK QNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKE PPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV GGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPE IDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKN DESRRVRRNKRSKDIQMTQTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQG NTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVK LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDN SKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYA MDYWQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGT CGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR *	649	715
ОТ-CD19-056 (лидер CD8a - CD19 scFV - CD8a-Тm - 41BB -CD3- дзета - линкер (GGSGG) - hDHFR (аминокислоты 2-187	MALPVTALLLPLALLHAARPDQMTQTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKS	1005	1022

ДТ Y122I) - стоп- кодон)	RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVVSSTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPRGSGGVGSLNCIVA VSQNMGIGKNGDLP WPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKT WFSIPEKNRPLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRS LDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVIKEAM NHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLP EYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND*		
OT-CD19-057 (лидер CD8a -CD19 scFV - CD8a-Tm - 41BB - CD3-дзета - BamHI (GS)- стоп-кодон)	MALPVTALLLPLALLHAARPDIQMTQTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSETTYNSALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVVSSTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPRGS*	1006	1023
OT-CD19-058 (лидер CD8a -CD19 scFV - CD8a-Tm - 41BB -CD3- дзета - p2A - BamHI (GS)- стоп-кодон)	MALPVTALLLPLALLHAARPDIQMTQTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSETTYNSALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVVSSTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS	1007	1033

	ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPRGATNFSLLKQAGDVEENPGPGS*		
ОТ-CD19-059 (лидер CD8a - HA Tag - CD19 scFV - CD8a-Tm - 41BB - CD3-дзета - BamHI (GS)- стоп- кодон)	MALPVTALLLPLALLLHAARPYDPDYADIQM TQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQK PDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGG GSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTC TVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVWSET TYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTA IYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTSSTTTP APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPRGs*	1008	1034
ОТ-CD19-060 (лидер CD8a - CD19 scFV- CD8a-Tm- 41BB - CD3- дзета - линкер (SG)- фурин - BamHI (GS)- стоп-кодон)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDQMTQTTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKLEWLGVWSETTYYNSALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVTSSTTTPAPRPPTPAP TASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPRSGESRRVRNRKRSKGS*	1009	1035
ОТ-CD19-063 (лидер CD8a - CD19 scFV - CD8a-Tm - 41BB - CD3-дзета - стоп-	MALPVTALLLPLALLLHAARPDQMTQTTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD	1010	1036

кодон)	YGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSSETTYNSALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGSTVTVSSTTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR*		
ОТ-CD19-064 (лидер CD8a - CD19 scFV - CD8a-Tm - 41BB - CD3-дзета - линкер (TR)- тэг HA - FKBP (E31G, F36V, R71G, K105E) – стоп-IRES- mCherry)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDQMTQTTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSSETTYNSALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGSTVTVSSTTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPRTRYPYDVPDYAGVQVETISPGDGRTFPK RGQTCVVHYTGMLGDGKKVDSSDRNKPFFKML GKQEVIRGWEEGVAQMSVGQGAKL TISPDYAYG ATGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*MHRSA A A A T*I PPPPPLSLPPP*RYWPKPLGIRPVCVCLYVIFHHIAV FWQCEGPETWPCLLDEHS*GSFPSRQRNARSVEC REGSSSSGSFLKTNNVCSDPLQAAEPPTWRQVPLR PKATCIRYTCKGGTTPVPRCELDSCGKSQMA LLK RIQQGAEGCPEGTPLYGI*SGASVHMLYMCLVEV KKT SRPPEPRGRGFPLKNTMIWPQP**ARARRIT WPSSRSSCASRCTWRAP*TATSSRSRARARAAPTR APRPPS*R*PRVAPCPSPGTSCPLSSCTAPRPT*STP PTSPTT*SCSPRASSGSA**TSRTAAW*P*PRTPPC RTASSSTR*SCAAPTSPPTAP*CRRRPWAGRPPPSG CTPRTAP*RARSSRG*S*RTAATTTLSRPPTPRRS PCSCPAPTTSTSSWTSPPTTRTTPSWNSTNAPRAA	1215-1231	1037

	TPPAAWTSCTS*		
ОТ-CD19-066 (лидер CD8a - CD19 scFV - CD8a-Tm - 41BB -CD3- дзета - линкер (GS)- пептид P2A -mCherry (MIL) - стоп-кодон)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSAS LGDRVITISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVVSSTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEE DNMAIIEFMRFKVHMEGVSNGHEFEIEGEGEGR PYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSK AYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGG VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQ KKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDG GHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSH NEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK*	1015	1039
ОТ-CAR19-ИЛ15-001 (лидер CD8a - CD19 scFV -CD8a-Tm - 41BB - CD3-дзета - линкер (GS)- P2A - ИЛ15 - линкер (SG3-(SG4)3- SG3-SLQ) - ИЛ15Ra - стоп-кодон)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSAS LGDRVITISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVVSSTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPNWVNI SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMK CFLLELQVISLESGDASIHTVENLIILANNSLSSNG	1016	1040

	NVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSLQITCPPMS VEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLT ECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAAP STVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATT AAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTT AKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTV LLCGLSAVSLLACYLKSQRTPPLASVEMEAMEAL PVTWGTSSRDEDLNCSSHL*		
OT-CAR19-ИЛ15-002 (лидер CD8a -CD19 scFV -CD8a-Tm -41BB - CD3-дзета - линкер (GS)- P2A - линкер (MLLLVTSLLLCELP PAFLIP) (SEQ ID NO: 1031) - ИЛ15 - линкер (SG3-(SG4)3-SG3- SLQ) - ИЛ15Ra - стоп- кодон)	MALPVTALLLPLALLHAARPDQMTQTTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSSETTYNSALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDETAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVVSSTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPENMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMLLLVT SLLLCELPHPAFLIPNWVNVISDLKKIEDLIQSMH IDATLYTESDVHPCKVTAMKCFLELQVISLESG DASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEL EEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGSGGGGGSGG GGSGGGSGGGSLQITCPPMSVEHADIWVKSYSL YSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVA HWTTPSLKCIRDPALVHQRPAAPSTVTTAGVTPQP ESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPS KSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASAS HQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLA CYLKSQRTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDE DLNCSSHL*	1017	1041
OT-CD19-ИЛ15-006 (лидер CD8a -CD19 scFV - CD8a-Tm - 41BB - CD3-дзета -	MALPVTALLLPLALLHAARPDQMTQTTSSLSAS LGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGSGG	1018	1042

линкер (GS)- P2A - лидер IgE - ИЛ15 - линкер (SG3-(SG4)3- SG3-SLQ) - ИЛ15Ra - стоп-кодон)	GGGSEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMDWTW ILFLVAAATRVHSNWNVISDLKKIEDLIQSMHID ATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDA SIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEE KNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLS RERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWT TPSLKCIRD PALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLS PSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSPSKSPS TGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTASASHQPP GVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL LACYLK SRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDL ENC SHHL*		

[00229] Конструкции, раскрытые в Таблице 10, которые транскрипционно контролируются промотором ЦМБ, в некоторых случаях могут быть помещены под транскрипционный контроль другого промотора для тестирования роли промоторов в экспрессии XAP CD19. В одном варианте осуществления, промотор ЦМБ может быть заменен промотором EF1a. В одном варианте осуществления, промотор ЦМБ конструкции OT-CD19-001 может быть заменен для получения конструкции OT-CD19N-017 с промотором EF1a. В другом варианте осуществления, промотор ЦМБ XAP CD19, конструкции OT-CD19 CAR-002, может быть заменен для получения конструкции OT-CD19N-018 с промотором EF1a. В другом варианте осуществления, промотор ЦМБ XAP CD19, конструкции OT-CD19 CAR-003, может быть заменен для получения конструкции OT-CD19N-019 с промотором EF1a. В другом варианте осуществления, промотор ЦМБ XAP CD19, конструкции OT-CD19 CAR-004, может быть заменен для получения конструкции OT-CD19N-020 с промотором EF1a. В другом варианте осуществления, промотор ЦМБ XAP CD19, конструкции OT-CD19 CAR-005, может быть заменен для получения конструкции OT-CD19N-021 с промотором EF1a. В другом варианте осуществления, промотор ЦМБ XAP CD19, конструкции OT-CD19 CAR-006, может быть заменен для получения конструкции OT-CD19N-022 с промотором EF1a. В другом варианте осуществления, промотор ЦМБ XAP CD19, конструкции OT-CD19 CAR-007, может быть заменен для получения конструкции OT-CD19N-023 с промотором EF1a. В другом варианте осуществления, промотор ЦМБ XAP CD19, конструкции OT-CD19 CAR-008, может быть заменен для получения конструкции OT-CD19N-024 с

промотором EF1a. В другом варианте осуществления, промотор ЦМВ ХАР CD19, конструкции OT-CD19 CAR-009, может быть заменен для получения конструкции OT-CD19N-025 с промотором EF1a.

[00230] В одном варианте осуществления, конструкция ХАР содержит scFV CD19 (например, CAT13.1E10 или FMC63), спейсерный или трансмембранный домен CD8 α и эндодомен 4-1BB и CD3 ζ . Эти конструкции с CAT13.1E10 могут иметь повышенную пролиферацию после стимуляции *in vitro*, повышенную цитотоксичность в отношении мишеней CD19+ и повышенное взаимодействие эффекторов и мишеней по сравнению с конструкциями с FMC63.

[00231] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению регулируются с использованием каталитических доменов убиквитинлигаз E3. Каталитические домены E3-лигаз могут быть слиты с антителом или фрагментом антитела. Полезный грузы сливают с антигеном, распознаваемым антителом или фрагментом антитела, который сливают с каталитическим доменом лигаз E3. E3-лигазы, используемые в данном изобретении, включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: кольцевую E3-лигазу, HECT E3-лигазы и RBR E3-лигазы. Любой из способов, который приведен Kanner SA et al. (2017) eLife; 6: e29744 может быть полезным в данном изобретении (содержание которого включено посредством ссылки в полном объеме).

[00232] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы, описанные в данном документе, могут регулироваться конструкциями E3 убиквитинлигаз. Конструкции E3-лигаз могут содержать каталитический домен E3-лигаз, слитых с ЭОС, и антитело или фрагмент антитела. Полезные грузы сливают с антигеном, распознаваемым антителом или фрагментом антитела, который присоединен к каталитическому домену лигаз E3. В отсутствие стимула, соответствующего ЭОС, конструкции убиквитинлигаз E3 дестабилизируются, что, в свою очередь, делает возможной экспрессию полезных грузов, слитых с антигеном. В присутствии лиганда, соответствующего ЭОС, конструкции убиквитинлигаз E3 стабилизируются и становятся доступными для связывания с антигеном, слитым с полезными грузами. Связывание E3-лигазных конструкций с антигенами дает сигнал к деградации белка. Конструкции убиквитинлигаз E3 могут быть использованы для регуляции любого полезного груза, описанного в данном документе, при условии, что полезный груз слит с антигеном, распознаваемым антителом, или фрагментом антитела в конструкции убиквитинлигаз E3. В некоторых вариантах осуществления, полезный груз представляет собой химерный антигенный рецептор. Конструкции убиквитинлигаз E3 могут быть использованы для проектирования логических элементов. В одном варианте осуществления, конструкции убиквитинлигаз E3 могут использоваться для получения логического элемента NOT, в котором один лиганд индуцирует экспрессию полезного груза, а другой ингибирует экспрессию полезного груза. В некоторых вариантах осуществления, логический элемент NOT можно получить, используя конструкции убиквитинлигаз E3 и путем слияния гибридного белка полезного груза-антигена с вторым ЭОС, который отличается от ЭОС в конструкции убиквитин-лигазы E3.

[00233] В некоторых вариантах осуществления, полезный груз согласно изобретению может представлять собой любую из ко-стимулирующих молекул и/или внутриклеточных доменов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления, в данном изобретении может быть использована одна или большее количество ко-стимулирующих молекул, каждая из которых находится под контролем разных ЭОС. ЭОС-регулируемые ко-стимулирующие молекулы также могут экспрессироваться в сочетании с ХАР первого поколения, ХАР второго поколения, ХАР третьего поколения, четвертого поколения, или любой другой конструкцией ХАР, описанной в данном документе.

Тандемный ХАР (ТанХАР)

[00234] В некоторых вариантах осуществления, ХАР согласно данному изобретению может представлять собой тандемный химерный антигенный рецептор (ТанХАР), который способен нацеливаться на два, три, четыре или большее количество специфичных для опухоли антигенов. В некоторых аспектах, ХАР представляет собой биспецифический ТанХАР, содержащий два нацеливающих домена, которые распознают два разных ОСА на опухолевых клетках. Биспецифический ХАР может быть дополнительно определен как содержащий внеклеточную область, содержащую нацеливающий домен (например, домен распознавания антигена), специфичный к первому опухолевому антигену, и нацеливающий домен (например, домен распознавания антигена), специфичный к второму опухолевому антигену. В других аспектах, ХАР является мультиспецифическим ТанХАР, который содержит три или большее количество нацеливающих доменов, скомпонованных в тандемной форме. Область между нацеливающими доменами в ТанХАР может составлять от 5 до 30 аминокислот, например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30 аминокислот.

Разделенные ХАР

[00235] В некоторых вариантах осуществления, компоненты, включающие в себя нацеливающий фрагмент, трансмембранный домен и внутриклеточные сигнальные домены согласно данному изобретению, могут быть разделены на две или большее количество частей, и таким образом требуется множество входных сигналов для инициации сборки целого функционального рецептора. В одном варианте осуществления, может быть сконструирована разделенная синтетическая ХАР система, в которой сборка активированного рецептора ХАР зависит от связывания лиганда с ЭОС (например, небольшой молекулой) и специфического антигена с нацеливающим фрагментом. В качестве неограничивающего примера, разделенный ХАР состоит из двух частей, которые собираются в зависимости от малой молекулы; одна часть элемента рецептора имеет внеклеточный антиген-связывающий домен (например, scFv), а другая часть имеет внутриклеточные сигнальные домены, такие как внутриклеточный домен CD3 ζ .

[00236] В других аспектах, разделенные части системы ХАР могут быть дополнительно модифицированы для усиления сигнала. В одном примере, вторая часть цитоплазматического фрагмента может быть заякорена к плазматической мембране путем внесения в конструкцию трансмембранного домена (например, трансмембранного домена CD8 α). Дополнительный внеклеточный домен также может быть добавлен к второй части системы ХАР, например, внеклеточный домен, который обеспечивает гомодимеризацию. Эти модификации могут увеличивать выходную активность рецептора, то есть активацию Т-лимфоцитов.

[00237] В некоторых аспектах, две части системы разделенного ХАР содержат гетеродимеризационные домены, которые в зависимости от условий взаимодействуют при связывании гетеродимеризующей малой молекулы. Как таковые, рецепторные компоненты собираются в присутствии малой молекулы, чтобы сформировать целостную систему, которая затем может быть активирована путем взаимодействия с антигеном. Любые известные гетеродимеризующиеся компоненты могут быть включены в систему с разделным ХАР. Также могут быть использованы другие зависимые от малой молекулы гетеродимеризационные домены, включая, но не ограничиваясь лишь этими: систему димеризации, индуцированную гиббереллином (GID1-GAI), индуцированную триметоприм-SLF димеризацию eCDHFR и FKBP (Czlapinski et al., *J Am Chem Soc.*, 2008, 130(40): 13186-13187) и индуцированную АВА (абсцизовая кислота) димеризацию доменов PP2C и PYL (Cutler et al., *Annu Rev Plant Biol.* 2010, 61: 651-679). Двойное регулирование с использованием индуцибельной сборки (например, лиганд-зависимая димеризация) и

деградации (например, индуцирована дестабилизирующим доменом деградация ХАР) системы разделенного ХАР может обеспечить большую гибкость для контроля активности модифицированных ХАР Т-лимфоцитов.

Переключаемый ХАР

[00238] В некоторых вариантах осуществления, ХАР согласно изобретению может быть переключаемым ХАР. Juillerat et al. (Juillerat et al., *Sci. Rep.*, 2016, 6: 18950; содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме) недавно сообщили о контролируемых ХАР, которые могут быть временно включены в ответ на стимул (например, малой молекулой). В данной конструкции ХАР, система непосредственно интегрирована в шарнирный домен, который отделяет домен scFv от домена клеточной мембраны в ХАР. Такая система позволяет разделять или комбинировать различные ключевые функции ХАР, такие как активация и костимуляция в пределах различных цепей рецепторного комплекса, имитируя сложность нативной архитектуры ТКР. Данная интегрированная система может изменять взаимодействие scFv и антигена между состояниями включения/выключения, контролируемыми отсутствием/наличием стимула.

Обратимый ХАР

[00239] В других вариантах осуществления, ХАР согласно изобретению может быть системой обратимого ХАР. В этой архитектуре ХАР, домен ЛВР (лиганд-вызванная деградация) внедрен в систему ХАР. Путем добавления лиганда домена ЛВР временно может быть уменьшена активность ХАР. Комбинация ЛВР и ДД-опосредованной регуляции обеспечивает настраиваемый контроль постоянно активированных Т-лимфоцитов ХАР, тем самым снижая опосредованную ХАР тканевую токсичность.

Зависимая от условий активация ХАР

[00240] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно изобретению могут представлять собой химерный антигенный рецептор, активация которого зависит от условий, который экспрессируется только в активированной иммунной клетке. Экспрессия ХАР может быть сопряжена с регуляторной областью зависимой от условий активации, которая относится к одной или большому количеству нуклеотидных последовательностей, которые индуцируют транскрипцию и/или экспрессию последовательности, например, ХАР под ее контролем. Такие регуляторные области зависимой от условий активации могут быть промоторами генов, которые активируются во время активации иммунной эффекторной клетки, например промотор ИЛ2 или сайты связывания NFAT. В некоторых вариантах осуществления, активация иммунной клетки может быть достигнута с помощью конститутивно экспрессируемого ХАР (международная публикация № WO2016126608; содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

Цитокины, хемокины и другие растворимые факторы

[00241] В соответствии с данным изобретением, ХАР согласно данному изобретению могут использоваться совместно с другими полезными грузами согласно данному изобретению, которые могут представлять собой цитокины, хемокины, факторы роста и растворимые белки, продуцируемые иммунными клетками, раковыми клетками и клетками других типов, которые действуют как химические коммуникаторы между клетками и тканями в организме. Эти белки обеспечивают широкий спектр физиологических функций, от воздействия на рост, дифференциацию, миграцию и выживание клеток до ряда эффекторных активностей. Например, активированные Т-лимфоциты продуцируют различные цитокины для цитотоксической функции, чтобы устранять опухолевые клетки.

[00242] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут представлять собой цитокины, их фрагменты, варианты, аналоги и производные, включая, но не ограничиваясь лишь этими: интерлейкины, факторы некроза опухолей (ФНО), интерфероны (ИФН), TGF бета и хемокины. В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут представлять собой цитокины, которые стимулируют иммунные ответы. В других вариантах осуществления, полезные грузы согласно изобретению могут быть антагонистами цитокинов, которые отрицательно влияют на противораковые иммунные ответы.

[00243] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут представлять собой цитокиновые рецепторы, рекомбинантные рецепторы, их варианты, аналоги и производные; или сигнальные компоненты цитокинов.

[00244] В некоторых вариантах осуществления, цитокины согласно данному изобретению можно использовать для улучшения экспансии, выживаемости, устойчивости и активности иммунных клеток, например CD8+T_{ЕМ}, клеток естественных киллеров и клеток инфильтрирующихся в опухоль лимфоцитов (TIL), используемых для иммунотерапии. В других вариантах осуществления, Т-лимфоциты, сконструированные с двумя или большим количеством ДД, регулируемых цитокинами, используются для обеспечения кинетического контроля активации Т-лимфоцитов и ремоделирования микроокружения опухоли. В одном аспекте, согласно данному изобретению предложены биоконтуры и композиции для минимизации токсичности, связанной с терапией цитокинами. Несмотря на успехи в уменьшении опухолевой нагрузки, системная терапия цитокинами часто приводит к развитию серьезных побочных эффектов, ограничивающих дозу. Два фактора способствуют наблюдаемой токсичности (а) плейотропизм, при котором цитокины воздействуют на разные типы клеток и иногда оказывают противоположное действие на одни и те же клетки в зависимости от контекста (b) цитокины имеют короткое время полужизни в сыворотке и, следовательно, должны вводиться в высоких дозах, чтобы получить терапевтический эффект, что усугубляет плейотропные эффекты. В одном аспекте, цитокины согласно данному изобретению могут быть использованы для модуляции экспрессии цитокинов в случае неблагоприятных эффектов. В некоторых вариантах осуществления, цитокины согласно данному изобретению могут быть сконструированы так, чтобы иметь увеличенное время жизни или повышенную специфичность, чтобы минимизировать токсичность.

[00245] В некоторых вариантах осуществления, полезный груз согласно данному изобретению может представлять собой интерлейкиновый (ИЛ) цитокин. Интерлейкины (ИЛ) представляют собой класс гликопротеинов, продуцируемых лейкоцитами для регуляции иммунных реакций. Как применяется в данном документе, термин «интерлейкин (ИЛ)» относится к полипептиду интерлейкина из любого вида или источника, и включает в себя полноразмерный белок, а также фрагменты или части белка. В некоторых аспектах, полезный груз-интерлейкин выбирают из: ИЛ1, ИЛ1-альфа (также называется гемопоэтин-1), ИЛ1-бета (катаболин), ИЛ1-дельта, ИЛ1-епсилон, ИЛ1-эта, ИЛ1-дзета, членов семейства интерлейкинов-1 с 1 по 11 (с ИЛ1F1 по ИЛ1F11), гомологов с 1 по 4 интерлейкина-1 (с ИЛ1Н1 по ИЛ1Н4), родственного ИЛ1 белка с 1 по 3 (с ИЛ1RP1 по ИЛ1RP3), ИЛ2, ИЛ3, ИЛ4, ИЛ5, ИЛ6, ИЛ7, ИЛ8, ИЛ9, ИЛ10, ИЛ10С, ИЛ10D, ИЛ11, ИЛ11а, ИЛ11b, ИЛ12, ИЛ13, ИЛ14, ИЛ15, ИЛ16, ИЛ17, ИЛ17А, ИЛ17В, ИЛ17С, ИЛ17Е, ИЛ17F, ИЛ18, ИЛ19, ИЛ20, подобного ИЛ20 (ИЛ20L), ИЛ21, ИЛ22, ИЛ23, ИЛ23А, ИЛ23-р19, ИЛ23-р40, ИЛ24, ИЛ25, ИЛ26, ИЛ27, ИЛ28А, ИЛ28В, ИЛ29, ИЛ30, ИЛ31, ИЛ32, ИЛ33, ИЛ34, ИЛ35, ИЛ36-альфа, ИЛ36-бета, ИЛ36-гамма, ИЛ36RN, ИЛ37, ИЛ37а, ИЛ37b, ИЛ37с, ИЛ37d, ИЛ37е и ИД38. В других аспектах, полезный

груз согласно данному изобретению может представлять собой рецептор интерлейкина, выбранный из CD121a, CDw121b, ИЛ2R α /CD25, ИЛ2R β /CD122, ИЛ2R γ /CD132, CDw131, CD124, CD131, CDw125, CD126, CD130, CD127, CDw210, ИЛ8RA, ИЛ11R α , CD212, CD213 α 1, CD213 α 2, ИЛ14R, ИЛ15R α , CDw217, ИЛ18R α , ИЛ18R β , ИЛ20R α , и ИЛ20R β .

[00246] В одном варианте осуществления, полезный груз согласно изобретению может содержать ИЛ12. ИЛ12 представляет собой гетеродимерный белок из двух субъединиц (p35, p40), который секретируется антиген-презентирующими клетками, такими как макрофаги и дендритные клетки. ИЛ12 является цитокином типа 1, который действует на клетки естественные киллеры (NK), макрофаги, CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты, и CD4⁺ Т-хелперы через путь STAT4, чтобы индуцировать продуцирование ИФН- γ в этих эффекторных иммунных клетках (рассмотрено Trinchieri G, *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(2): 133–146). ИЛ12 может стимулировать цитотоксическую активность NK-клеток и CD8⁺ Т-лимфоцитов, поэтому обладает противоопухолевой функцией. Внутривенная инъекция рекомбинантного ИЛ12 показала умеренную клиническую эффективность у нескольких пациентов с прогрессирующей меланомой и почечно-клеточной карциномой (Gollob et al., *Clin. Cancer Res.* 2000; 6(5):1678–1692). ИЛ12 использовали в качестве адъюванта для усиления цитотоксического иммунитета с использованием антигенной вакцины против меланомы или с использованием активированных пептидом мононуклеарных клеток периферической крови; и для стимулирования активности NK-клеток при раке молочной железы с лечением трастузумабом. Локальная доставка ИЛ12 в микроокружение опухоли способствует регрессии опухоли в нескольких опухолевых моделях. Все эти исследования показывают, что локально повышенный уровень ИЛ12 может способствовать противоопухолевому иммунитету. Одним из основных препятствий системного или местного введения рекомбинантного белка ИЛ12, или с помощью векторов на основе онколитических вирусов, являются серьезные побочные эффекты, когда ИЛ12 вводят в большом количестве. Разработка системы, которая строго контролирует уровень ИЛ12, может обеспечить безопасное использование ИЛ12 при лечении рака.

[00247] В данной области техники является понятным, что определенная номенклатура гена и/или белка для одного и того же гена или белка может включать или исключать знаки пунктуации, такие как тире «-», или символы, такие как греческие буквы. Независимо от того, они включены или исключены в данном документе, значение не должно изменяться, как это будет понятно специалисту в данной области техники. Например, ИЛ2, ИЛ2 и ИЛ2 относятся к одному и тому же интерлейкину. Аналогично, ФНОальфа, ФНО α , ФНО-альфа, ФНО- α , ФНО альфа и ФНО α все относятся к одному и тому же белку.

[00248] В одном аспекте, эффекторный модуль согласно изобретению может представлять собой гибридный полипептид ДД-ИЛ12. Этот регулируемый гибридный полипептид ДД-ИЛ12 может быть прямо использован в качестве иммунотерапевтического агента или может быть трансдуцирован в иммунную эффекторную клетку (Т-лимфоциты и клетки ТИЛ) для получения модифицированных Т-лимфоцитов с большей способностью к росту и выживанию *in vivo* для адаптивного переноса клеток. Необходимость жестких схем предварительной адаптации в современных адаптивных клеточных терапиях может быть минимизирована с использованием регулируемого ИЛ12. ДД-ИЛ12 может быть использован для модификации микроокружения опухоли и увеличения устойчивости в солидных опухолях, которые в настоящее время рефрактерны к терапии с нацеливанием на опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления, Т-лимфоциты, экспрессирующие ХАР, могут быть снабжены регулируемым ДД ИЛ12 для снижения иммуносупрессии без системной токсичности.

[00249] В некоторых вариантах осуществления, ИЛ12 может представлять собой Flexi ИЛ12, причем обе субъединицы р35 и р40 кодируются одной кДНК, которая продуцирует одноцепочечный полипептид. Одноцепочечный полипептид может быть получен путем помещения субъединицы р35 на N-конец или С-конец одноцепочечного полипептида. Аналогично, субъединица р40 может находиться на N-конец или С-конец одноцепочечного полипептида. В некоторых вариантах осуществления, конструкции ИЛ12 согласно изобретению могут быть помещены под транскрипционный контроль промотора ЦМВ (SEQ ID NO: 716), промотора EF1a (SEQ ID NO: 717, SEQ ID NO: 908) или промотора PGK (SEQ ID NO: 718). Любая часть ИЛ12, которая сохраняет одну или большее количество функций полноразмерного или зрелого ИЛ12, может быть полезной в данном изобретении. В некоторых аспектах, ДД-ИЛ12 содержит аминокислотные последовательности, перечисленные в Таблице 11. Аминокислотные последовательности в Таблице 11 могут содержать стоп-кодон, который в Таблице обозначен «*» в конце аминокислотной последовательности.

Таблица 11: конструкции ДД-ИЛ12

Описание	Промотор	Аминокислотная последовательность	Аминокислотный SEQ ID NO	Нуклеотидный SEQ ID NO
сигнальная последовательность р40	-	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVA	719	736-744
Линкер	-	GGSGG	629	679-680
Линкер	-	GGGGSGGGSGGGGS	720	910-915
Линкер		GS	-	GGATCC
Спейсер		ATNFSLLKQAGDVEENPGP	745	746
Сайт расщепления фурина	-	SARNRQKRS	721	750
Сайт расщепления фурина	-	ARNRQKRS	722	751
Модифицированный Фурин	-	ESRRVRRNKRSK	630	681-683
P2A расщепляемый пептид	-	GATNFSLLKQAGDVEENPGP	925	926
р40	-	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRGDNKEYEYSVECQEDSACP	723	752-761, 632-634

		AAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRD IHKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT WSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFT DKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSE WASVPCS		
p40 (K217N)	-	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTC TPEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQVKEF GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFT CWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG AATLSAERVGRDNKEYEYSVEQEDSACP AAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRD IHKPDPPNNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT WSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFT DKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSE WASVPCS	747	748
p35	-	RNLPVATPDGMPCLHHSQNLLRAVSNM LQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTV EACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASR KTSFMALCLSSIEDLKMYQVEFKTMNA KLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNF NSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNAS	724	762-771, 1012
ecDHFR (аминокислота 2-159 ДТ) (R12Y, Y100I)	-	ISLIAALVDYVIGMENAMPWNLPADLAW FKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNII LSSQPGTDDRVTWVKSVDIAAACGDVPEI MVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEG DTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSY CFEILERR	9	692, 772, 814, 687, 988, 991
FKBP (F36V, L106P)	-	GVQVETISPGDGRTFPGKRGQTCVVHYTGML EDGKKVDSSDRNKPFGKMLGKQEVIRGW EEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHP GIIPPHATLVFDVELLKPE	11	684-686, 987, 989
FKBP (F36V, E31G, R71G, K105E)	-	GVQVETISPGDGRTFPGKRGQTCVVHYTGML GDGKKVDSSDRNKPFGKMLGKQEVIRGW EEGVAQMSVGQAKLTISPDYAYGATGHP GIIPPHATLVFDVELLELE	12	688-691, 994, 1013, 1028
hDHFR (аминокислот ы 2-187 ДТ; Q36F, Y122I,	-	VGSLNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNE FRYFFRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSI PEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSR SLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVI	46	773

A125F)		KEFMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVY EKND		
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; I17V)	-	VGSLNCIVAVSQNMGVGKNGDLPWPPLRN EFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFS IPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLS RSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSS VYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFP EIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFE VYEKND	894	979
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Y122I)	-	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNE FRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSI PEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSR SLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVI KEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVY EKND	895	694, 995
OT-IL12-001 (сигнальная последовательность p40 - FKBP (F36V, L106P) - линкер (GGSGG) - p40 - линкер2 (G4S)3 - p35-стоп-кодон)	ЦМБ	MCHQQLVISWFSVLFLASPLVAGVQVETISP GDGRTFPKRGQTCVVHYTG MLEDGKKVDS SRDRNKP FKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMS VGQRAKL TISPDYAYGATGHPGIIPPHATLV FDVELLKPEGSGGIWELKKDVYVVELDW YPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDSSE VLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVL SHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF LRCEAKNYSGRFTCWWT TISTDLTFSVKS SRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKL KYENYTSSFFIRDIKPDPPKNLQLKPLKNSR QVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQG KSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVR AQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGSGGGGS GGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRA VSNMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDK TSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSC LASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKT MNAKLLMDPKRQIFLDQNM LAVIDELMQA LNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLH AFRIRAVTIDRVMSYLNAS*	727	774
OT-IL12-002 (Met - FKBP	ЦМБ	MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTG MLEDGKKVDS SRDRNKP FKFMLGKQEVIR	728	775

(F36V, L106P) - линкер (GGSGG) - сигнальная последователь ность p40 - p40 - линкер ((G4S)3) - p35 - стоп-кодон)		GWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATG HPGIIPPHATLVFDVELLKPEGSGGMCHQ QLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVE LDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKG GEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLT FSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRD NKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVD AVHKLKYENYTSSFFIRDIIPDPPKNLQLK PLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFC VQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKN ASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGS GGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFCLHHS QNLLRAVSNNMLQKARQTLEFYPTCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRET SFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKM YQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAV IDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKI KLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS*		
OT-IL12-003 (сигнальная последователь ность p40 - FKBP (F36V, L106P)- сайт фурина (SARNRQKRS) - p40- линкер ((G4S)3)- p35 - стоп-кодон)	ЦМВ	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAGVQVETISP GDGRTPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKVDS SRDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMS VGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLV FDVELLKPEARNRQKRSIWELKKDVYVVE LDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKG GEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLT FSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRD NKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVD AVHKLKYENYTSSFFIRDIIPDPPKNLQLK PLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFC VQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKN ASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGS GGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFCLHHS QNLLRAVSNNMLQKARQTLEFYPTCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRET SFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKM YQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAV IDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKI	729	776

		KLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS*		
OT-IL12-004 (сигнальная последовательность p40 - p40 - линкер ((G4S)3) - p35 - сайт фурина (ARNRQKRS) - FKBP (E31G, F36V, R71G, K105E) - стоп-кодон)	ЦМБ	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDV YVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFRLCEAKNYSGRFTCWWLTTIS TDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG GGSGGGGGSGGGSRNLPVATPDPMFPCL HHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS ARNRQKRSGVQVETISPGDGRTFPRGQTC VVHYTGMLGDGKKVDSSDRNKPFFKML GKQEVIRGWEEGVAQMSVGQGAKLTI SPD YAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*	730	777
OT-IL12-005 (сигнальная последовательность p40 - p40 - линкер - ((G4S)3) - p35 - линкер (GGSG) - FKBP (E31G, F36V, R71G, K105E) - стоп-кодон)	ЦМБ	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDV YVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFRLCEAKNYSGRFTCWWLTTIS TDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG GGSGGGGGSGGGSRNLPVATPDPMFPCL HHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	731	778

		GGSGGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHY TGMLGDGKKVDSSDRNKPFFKMLGKQEV IRGWEEGVAQMSVGQGAULTISPDYAYGA TGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*		
OT-IL12-006 (сигнальная последователь ность р40 - р40 – линкер ((G4S)3)- р35 - стоп-кодон)	ЦМВ	MCHQQLVISWFSVLFLASPLVAIWELKKDV YVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTIS TDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG GGSGGGGGSGGGSRNLPVATPDPMFPCL HHSQNLLRAVS NMLQKARQTLEFYPTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS *	732	779
OT-IL12-007 (сигнальная последователь ность р40; ecDHFR (аминокислота 2-159 ДТ) (R12Y, 100I) - сайт фурина (ESRRVRRNK RSK) - р40 – линкер ((G4S)3) - р35)	ЦМВ	MCHQQLVISWFSVLFLASPLVAISLIAALAV DYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNK PVIMGRHTWESIGRPLPGRKNILSSQPGTD DRVTVVKSVD E AIAACGDVPEIMVIGGGR VIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYE PDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERR ESRRVRRNKRSKIWELKKDVYVVELDWYP DAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVL GSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH SLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLR CEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSR GSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEY SVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLK YENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQ VEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKS KREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQ DRYYSSSWSEWASVPCSGGGGGSGGGSGG GGSRNLPVATPDPMFPCLHHSQNLLRAVS	733	780

		NMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTS TVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVEFKT MNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQA LNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLH AFRIRAVTIDRVMSYLNAS		
OT-IL12-008 (сигнальная последователь ность p40; hDHFR (аминокислот ы 2-187 ДВ) (Q36K, Y122I, A125F) - сайт фурина (ESRRVRRNK RSK)- p40 - линкер ((G4S)3) - p35)	ЦМВ	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAVGSLNCIV AVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFFRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPL KGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALK LTEQPELANKVDMVWIVGGSSVIKEFMNHP GHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLL PEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKNDERS RVRRNKRSKIWELKKDVYVVELDWYPDAP GEMVVLTCDTPEEDGITWTLDSSEVLGSG KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSL LLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCE AKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGS SDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSV ECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYE NYTSSFFIRDIKPDPPKNLQKPLKNSRQVE VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKR EKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDR YYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGG SRNLPVATPDGPMFPLHHSQNLLRAVSNM LQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTV EACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASR KTSFMMALCLSSIEDLKMYQVEFKTMNA KLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNF NSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNAS	734	781
OT-IL12-009 (сигнальная последователь ность p40 - p40 – линкер ((G4S)3) - p35 - сайт фурина (ESRRVRRNK RSK) - FKBP (E31G, F36V,	ЦМВ	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDV YVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTIS TDLTFSVKSSRGS SDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQEDSACPAAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPDPPKN LQKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC	735	782

R71G, K105E)- стоп-кодон)		RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG GGSGGGGGSGGGSRNLPVATPDPGMFPCL HHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS ESRRVRRNKRSKGVQVETISPGDGRTFPCR GQTCVVHYTGMLGDGKKVDSSDRNKPFC FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQAKLTI SPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLELE *		
OT-IL12-019 (сигнальная последователь ность p40 - p40- линкер ((G4S)3)- p35- стоп-кодон)	PGK	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDV YVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFRLRCEAKNYSGRFTCWWLTTIS TDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG GGSGGGGGSGGGSRNLPVATPDPGMFPCL HHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS *	732	779
OT-IL12-020 (сигнальная последователь ность p40 - p40- линкер ((G4S)3)- p35- стоп-кодон)	EF1a	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDV YVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFRLRCEAKNYSGRFTCWWLTTIS TDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS	732	779

		LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG GSGGGGGSGGGGSRNLPVATPDPMFPCL HHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS *		
OT-IL12-021 (сигнальная последователь ность p40 - p40- линкер ((G4S)3)- p35- стоп-кодон)	Нет промотора	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDV YVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFRLRCEAKNYSGRFTCWWLTIS TDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG GSGGGGGSGGGGSRNLPVATPDPMFPCL HHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS *	732	779
OT-IL12-022 (сигнальная последователь ность p40 - p40 – линкер - ((G4S)3) - p35 - линкер (GGSG) - FKBP (E31G, F36V, R71G, K105E) - стоп- кодон)	PGK	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDV YVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFRLRCEAKNYSGRFTCWWLTIS TDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG GSGGGGGSGGGGSRNLPVATPDPMFPCL	731	778

		HHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS GGSGGVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHY TGMLGDGKKVDSSDRNKPFFKMLGKQEV IRGWEEGVAQMSVGQGAKLTI SPDYAYGA TGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*		
OT-IL12-023 (сигнальная последователь ность p40 - p40 – линкер - ((G4S)3) - p35 - линкер (GGSG) - FKBP (E31G, F36V, R71G, K105E) - стоп- кодон)	EF1a	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDV YVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTIS TDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG GGSGGGGGSGGGSRNLPVATPDPMFPCL HHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS GGSGGVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHY TGMLGDGKKVDSSDRNKPFFKMLGKQEV IRGWEEGVAQMSVGQGAKLTI SPDYAYGA TGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*	731	778
OT-IL12-024 (сигнальная последователь ность p40 - p40 – линкер - ((G4S)3) - p35 - линкер (GGSG) - FKBP (E31G,	Нет промотора	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDV YVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTIS TDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS	731	778

F36V, R71G, K105E) - стоп-кодон)		LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG GGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCL HHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS GGSGGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHY TGMLGDGKKVDSSDRNKPFFKMLGKQEV IRGWEEGVAQMSVGQGAKL TISPDYAYGA TGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*		
OT-IL12-025 (сигнальная последователь ность p40 - p40 – линкер- ((G4S)3) - p35 - линкер (GGSG) - FKBP (E31G, F36V, R71G, K105E) - стоп- кодон)	PGK	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDV YVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFRLCEAKNYSGRFTCWWLTTIS TDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQEDSACPAAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG GGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCL HHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS GGSGGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHY TGMLGDGKKVDSSDRNKPFFKMLGKQEV IRGWEEGVAQMSVGQGAKL TISPDYAYGA TGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*	731	778
OT-IL12-026 (сигнальная последователь ность p40 - p40 – линкер - ((G4S)3) - p35	EF1a	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDV YVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFRLCEAKNYSGRFTCWWLTTIS TDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER	731	778

- линкер (GGSG) - FKBP (E31G, F36V, R71G, K105E) - стоп-кодон)		VRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG GGSGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCL HHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS GGSGGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHY TGMLGDGKKVDSSDRNKPFFKMLGKQEV IRGWEEGVAQMSVGQGAKLTI SPDYAYGA TGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*		
OT-IL12-027 (сигнальная последовательность p40 - p40 – линкер - ((G4S)3) - p35 - линкер (GGSG) - FKBP (E31G, F36V, R71G, K105E) - стоп-кодон)	Нет промотора	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDV YVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTIS TDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG GGSGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCL HHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS GGSGGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHY TGMLGDGKKVDSSDRNKPFFKMLGKQEV IRGWEEGVAQMSVGQGAKLTI SPDYAYGA TGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*	731	778
OT-IL12-028 (сигнальная последовательность	PGK	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDV YVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT	730	777

ность p40 - p40 - линкер ((G4S)3) - p35 - сайт фурина (ARNRQKRS) - FKBP (E31G, F36V, R71G, K105E) - стоп-кодон)		CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFRLRCEAKNYSGRFTCWWLTTIS TDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG GGSGGGGGSGGGSRNLPVATPDPGMFPCL HHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS ARNRQKRSGVQVETISPGDGRTFPRGQTC VVHYTGMLGDGKKVDSSRDRNKPFFML GKQEVIRGWEEGVAQMSVGQGAKLTI SPD YAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*		
OT-IL12-029 (сигнальная последователь ность p40 - p40 - линкер ((G4S)3) - p35 - сайт фурина (ESRRVRRNK RSK) - FKBP (E31G, F36V, R71G, K105E)- стоп-кодон)	EF1a	MCHQQLVISWFSVLFLASPLVAIWELKKDV YVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTFRLRCEAKNYSGRFTCWWLTTIS TDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG GGSGGGGGSGGGSRNLPVATPDPGMFPCL HHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS ESRRVRRNKRSKGVQVETISPGDGRTFPR GQTCVVHYTGMLGDGKKVDSSRDRNKPFF FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQGAKLTI SPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLELE	735	782

		*		
OT-IL12-030 (сигнальная последовательность p40 - p40 – линкер ((G4S)3) - p35 - сайт фурина (ESRRVRRNK RSK) - FKBP (E31G, F36V, R71G, K105E)- стоп-кодон)	Нет промотора	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDV YVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYT CHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTF LRCEAKNYSGRFTCWWLTTIS TDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER VRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG GGSGGGGGSGGGSRNLPVATPDPMFPCCL HHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS ESRRVRRNKRSKGVQVETISPGDGRTFPPKR GQTCVVHYTGMLGDGKKVDSSRDRNKPFFK FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQGAKLTI SPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLELE *	735	782
OT-IL12-046 (сигнальная последовательность p40 – FKBP (F36V, L106P) – линкер (GGSGG) – p40 – линкер ((G4S)3) – p35 - стоп-кодон)	EF1a	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAGVQVETISP GDGRTFPPKRGQTCVVHYTGMLDGGKKVDS SRDRNKPFFK FMLGKQEVIRGWEEGVAQMS VGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGIIPPHATLV FDVELLKPEGSGGIWELKKDVYVVELDW YPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSE VLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVL SHSLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF LRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSS RGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSR QVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGK SKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQ DRYYSSSWSEWASVPCSGGGGGSGGGSGG GGSRNLPVATPDPMFPCCLHHSQNLLRAVS NMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTS	727	774

		TVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLA SRKTSFMMALCLSSIIYEDLKMYQVEFKTMN AKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNF NSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNAS*		

[00250] В одном варианте осуществления, полезный груз согласно изобретению может содержать ИЛ15. Интерлейкин 15 является мощным иммуностимулирующим цитокином и важным фактором выживания для Т-лимфоцитов и клеток естественных киллеров. Доклинические исследования, сравнивающие ИЛ2 и ИЛ15, показали, что ИЛ15 ассоциирован с меньшей токсичностью, чем ИЛ2. В некоторых вариантах осуществления, эффекторный модуль согласно изобретению может представлять собой гибридный полипептид ДД-ИЛ15. Полипептид ИЛ15 также может быть модифицирован для увеличения его аффинности связывания с рецептором ИЛ15. Например, аспарагин может быть заменен аспарагиновой кислотой в позиции 72 ИЛ15 (SEQ ID NO: 2 публикации патента США US20140134128A1; содержание которого включено посредством ссылки в полном объеме). В некоторых вариантах осуществления, конструкции ИЛ15 согласно изобретению могут быть помещены под транскрипционный контроль промотора ЦМВ (SEQ ID NO: 716), промотора EF1a (SEQ ID NO: 717, SEQ ID NO: 908) или промотора PGK (SEQ ID NO: 718). В некоторых аспектах, ДД-ИЛ15 содержит аминокислотные последовательности, перечисленные в Таблице 12. Аминокислотные последовательности в Таблице 12 могут содержать стоп-кодон, который в таблице обозначен «*» в конце аминокислотной последовательности.

Таблица 12: Конструкции ДД ИЛ15

Описание/ID конструкции	Промотор	Аминокислотная последовательность	Аминокислотный SEQ ID NO	Нуклеотидный SEQ ID NO
Сигнальная последовательность ИЛ2	-	MYRMQLLSICIALSLALVTNS	783	788-791
Лидер IgE	-	MDWTWILFLVAAATRVHS	801	810, 930, 931
Линкер	-	EFSTEF	784	792-793
Линкер	-	GGSGG	629	676-680
Тэг HA	-	YPYDVPDYA	1024	1025-1027
VamHI	-	GS	-	GGATCC
P2A расщепляемый пептид	-	GATNFSLLKQAGDVEENPGP	925	926
mCherry (M1L)	-	LSKGEEDNMAIIEFKMRFKVHMEGSVNG HEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTGGP LPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPD YLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQ	1029	1030

		DSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQ KKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQR LKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPG AYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGR HSTGGMDELYK		
ИЛ15	-	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES DVHPSCCKVTAMKCFLELQVISLESGDAS IHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCCEK EELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS*	785	794-797, 1001
ecDHFR (аминокислота 2- 159 ДТ) (R12Y, Y100I)	-	ISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLA WFKRNTLNKPVMGRHTWESIGRPLPGR KNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAAAG DVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHI DAVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDA DAQNSHSYCFEILERR*	9	692, 772, 814, 687, 988, 991
hDHFR (аминокислоты 2- 187 ДТ; Y122I)	-	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKT WFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQG AHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMV WIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQ DFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDV QEEKGIKYKFEVYEKND	895	694, 995
OT-IL15-001 (сигнальная последовательность ИЛ2 - ИЛ15- стоп-кодон)	ЦМВ	MYRMQLLSIALSLALVTNSNWVNVISD LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKV TAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLI ILANNSLSSNGNVTESGCCEKEELEEKNI KEFLQSFVHIVQMFINTS*	786	799
OT-IL15-002 (сигнальная последовательность ИЛ2 - линкер[EFSTEF]- ecDHFR (аминокислота 2- 159 ДТ, R12Y, 100I)- линкер [GGSGG]- ИЛ15- стоп-кодон)	ЦМВ	MYRMQLLSIALSLALVTNSEFSTEFISLI AALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFK RNTLNKPVMGRHTWESIGRPLPGRKNIIL SSQPGTDDRVTWVKSVDIAAAGDVPE IMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEV EGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDAQAQ NSHSYCFEILERRGGSGGNWVNVISDLKKI EDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAM KCFLELQVISLESGDASIHDTVENLILAN NSLSSNGNVTESGCCEKEELEEKNIKEF LQSFVHIVQMFINTS*	787	800
OT-IL15-062 (лидер IgE – HA Tag – ИЛ15 –	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSYPYDVPDYA NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES DVHPSCCKVTAMKCFLELQVISLESGDAS	631	749

BamHI (GS) – стоп-кодон)		IHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKEC EELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGS*		
OT-IL15-132 (лидер IgE –ИЛ15 – BamHI (GS) – P2A разщепляемый пептид –mCherry (MIL) - стоп- кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVT AMKCFLELQVISLES GDASIHTVENLII LANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEENIK EFLQSFVHIVQMFINTSGSGATNFSLLKQ AGDVEENPGPLSKGEEDNMAIIEFMRF KVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQ TAKLK VTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSK AYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMN FEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL RG TNFPSDGPVMQKKTMGWEASSERMYPE DGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTT YKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDY TIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK*	725	1055
OT-IL15-134 (лидер IgE –ИЛ15 – линкер (GS) – hDHFR (WT 2-187, Y122I) – BamHI (GS) – P2A разщепляемый пептид –mCherry (MIL) - стоп- кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVT AMKCFLELQVISLES GDASIHTVENLII LANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEENIK EFLQSFVHIVQMFINTSGSVGSLNCIVAVS QNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TT TSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLK GRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDAL KLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVIKEAM NHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLE KYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVY EKNDGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIEFMRFKVHMEGSVNGHE FEIEGEGEGRPYEGTQTAKLK VTKGGPLP FAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYL KLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDS SLQDGEFIYKVKL RG TNFPSDGPVMQKKT TMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLD KDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYN VNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHST GGMDELYK*	726	1056
Описание/ID конструкции	Промотор	Аминокислотная последовательность	Аминокислотный SEQ ID NO	Нуклеотидный SEQ ID NO

Сигнальная последовательность ИЛ2	-	MYRMQLLSICIALSLALVTNS	783	788-791
Лидер IgE	-	MDWTWILFLVAAATRVHS	801	810, 930, 931
Линкер	-	EFSTEF	784	792-793
Линкер	-	GGSGG	629	676-680
Тэг HA	-	YPYDVPDYA	1024	1025-1027
BamHI	-	GS	-	GGATCC
P2A расщепляемый пептид	-	GATNFSLLKQAGDVEENPGP	925	926
mCherry (M1L)	-	LSKGEEDNMAIIEFMRFKVHMEGSVNG HEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGP LPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPD YLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQ DSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQ KKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQR LKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKPVLPG AYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAAGR HSTGGMDELYK	1029	1030
ИЛ15	-	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES DVHPSCCKVTAMKCFLELQVISLESGDAS IHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKEC EELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS*	785	794-797, 1001
ecDHFR (аминокислота 2-159 ДТ) (R12Y, Y100I)	-	ISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLA WFKRNTLNKPVMGRHTWESIGRPLPGR KNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAAACG DVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHI DAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDA DAQNSHSYCFEILERR*	9	692, 772, 814, 687, 988, 991
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Y122I)	-	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKT WFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQG AHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMV WIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQ DFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDV QEEKGIKYKFEVYEKND	895	694, 995
OT-IL15-001 (сигнальная последовательность)	ЦМВ	MYRMQLLSICIALSLALVTNSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLI	786	799

ь ИЛ2 - ИЛ15- стоп-кодон)		ILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNI KEFLQSFVHIVQMFINTS*		
ОТ-IL15-002 (сигнальная последовательност ь ИЛ2 - линкер[EFSTEF]- есDHFR (аминокислота 2- 159 ДТ, R12Y, 100I)- линкер [GGSGG]- ИЛ15- стоп-кодон)	ЦМБ	MYRMQLLSIALSLALVTNSEFSTEFISLI AALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFK RNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNIL SSQPGTDDRVTWVKSVDIAAACGDVPE IMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEV EGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQN SHSYCFEILERRGGSGGNWVNVISDLKKI EDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAM KCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILA NNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEF LQSFVHIVQMFINTS*	787	800
ОТ-IL15-062 (лидер IgE – HA Tag – ИЛ15 – BamHI (GS) – стоп-кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSYPYDVPDYA NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES DVHPSCCKVTAMKCFLELQVISLES GDAS IHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKEC EELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGS*	631	749
ОТ-IL15-132 (лидер IgE –ИЛ15 – BamHI (GS) – P2A разщепляемый пептид –mCherry (M1L) - стоп- кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWVNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVT AMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLII LANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTSGSGATNFSLLKQ AGDVEENPGPLSKGEEDNMAIIEFMR KVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQ TAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSK AYVKHPADIPDYLLSFPEGFKWERVMN FEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRG TNFPSDGPVMQKKTMGWEASSERMYPE DGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTT YKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDY TIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK*	725	1055
ОТ-IL15-134 (лидер IgE –ИЛ15 – линкер (GS) – hDHFR (WT 2-187, Y122I) – BamHI (GS) – P2A разщепляемый пептид –mCherry (M1L) - стоп-	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWVNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVT AMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLII LANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTSGSVGSLNCIVAVS QNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLK GRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDAL KLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVIKEAM	726	1056

кодон)		NHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLE KYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVY EKNDGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPLS KGEEDNMAIIEKFMRFKVHMEGSVNGHE FEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTGGPLP FAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYL KLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDS SLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKK TMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKL KDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYN VNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHST GGMDLEYK*		

[00251] Уникальным признаком ИЛ15-опосредованной активации является механизм транс-презентации, в котором ИЛ15 представлен в виде комплекса с альфа-субъединицей рецептора ИЛ15 (ИЛ15Ra), который связывается и активирует мембран-связанный бета/гамма-рецептор ИЛ15 либо в одной и той же клетке или другой клетке. Комплекс ИЛ15/ИЛ15Ra более эффективен в активации сигналинга ИЛ15, чем сам ИЛ15. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, эффекторный модуль согласно изобретению может содержать гибридный полипептид ДД-ИЛ15/ИЛ15Ra. В одном варианте осуществления, полезный груз может представлять собой гибридный полипептид ИЛ15/ИЛ15Ra, описанный в публикации патента США № US20160158285A1 (содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Рецептор альфа ИЛ-15 содержит внеклеточный домен, называемый доменом «суши», который содержит большинство структурных элементов, необходимых для связывания с ИЛ-15. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, полезный груз может представлять собой гибридный полипептид ИЛ15/суши-домена ИЛ15Ra, описанный в публикации патента США № US20090238791A1 (содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

[00252] Регулируемый ИЛ15/ИЛ15Ra может использоваться для стимуляции деления, выживания и активности популяций клеток CD8_{ТЕМ} без воздействия на регуляторные Т-лимфоциты, клетки NK и клетки TIL. В одном варианте осуществления, ДД-ИЛ15/ИЛ15Ra может быть использован для усиления CD19-направленных Т-клеточных терапий при В-лимфоцитарном лейкозе и лимфомах. В одном аспекте, ИЛ15/ИЛ15Ra может быть использован в качестве полезного груза согласно изобретению для снижения потребности в схемах предварительной обработки в современных парадигмах лечения ХАР-Т.

[00253] Эффекторные модули, содержащие ДД-ИЛ15, ДД-ИЛ15/ИЛ15Ra и/или ДД-ИЛ15/суши-домен ИЛ15Ra, могут быть сконструированы так, чтобы секретироваться (используя, например, сигнальную последовательность ИЛ2) или связываться с мембраной (используя, например, сигнальную последовательность IgE или CD8a).

[00254] В некоторых аспектах, ДД-ИЛ15/ИЛ15Ra содержит аминокислотные последовательности, представленные в Таблице 13a, 13b и 13c. Аминокислотные последовательности в Таблицах 13a, 13b и 13c могут содержать стоп-кодон, который в таблице обозначен «*» в конце аминокислотной последовательности.

Таблица 13a: Последовательности конструкций ДД-ИЛ15/ИЛ15Ra

Описание/ID конструкции	Аминокислотная последовательность	Аминокислотный SEQ ID NO	Нуклеотидный SEQ ID NO
Лидер IgE	MDWTWILFLVAAATRVHS	801	810, 930, 931
Лидер ИЛ15RA	MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLLRPPATRG	932	933
Линкер (SG3-(SG4)3-SG3-SLQ)	SGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQ	802	811, 916-920, 1002
Линкер (SG3S)	SGGS	827	828, 844, 909
Линкер (SG3(SG4)5SG3S)	SGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSS	921	923
Линкер	SGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	922	924
Линкер	GS	-	GGTTCC
Линкер	SG	-	AGCGGC
Линкер	GSG	-	GGATCCG GA или GGATCCG GT
Спейсер	-	-	927-929, 1000, TCGCGAATG, TCGCA
ИЛ15	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLIILAN NSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTS*	785	794-797, 1001
ИЛ15Ra	ITCPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRK AGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPAALVH QRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSN NTAATTAIVPGSQLMPSPSTGTTEISSHESHG TPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAI STSTVLLCGLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEA MEALPVTWGTSSRDELENCSHHL*	803	812-813, 1003
ИЛ15Ra (31-205 Uniprot ID: Q13261.1)	ITCPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRK AGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPAALVH QRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSN NTAATTAIVPGSQLMPSPSTGTTEISSHESHG TPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTT	1057	1058

mCherry	MSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIE GEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQF MYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNF EDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGP VMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKL KDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDI TSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK*	1059	1060
mCherry (M1L)	LSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEG EGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFM YGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFE DGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLK DGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDIT SHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK	1029	1030
Тэг HA	YPYDVPDYA	1024	1025-1027
Flag	DYKDDDDK	1232	-
BamHI	GS	-	GGATCC
P2A расщепляемый пептид	GATNFSLLKQAGDVEENPGP	925	926
ecDHFR (аминокислота 2-159 ДТ R12Y, Y100I)	ISLIAALAVDYGIGMENAMPWNLPADLAWFKRNT LNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDR VTWVKSVDEAIAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPK AQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFH DADAQNSHSYCFEILERR*	9	692, 772, 814, 687, 988, 991
ecDHFR (аминокислота 2-159 ДТ R12H, E129K)	ISLIAALAVDHYGIGMENAMPWNLPADLAWFKRNT LNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDDR VTWVKSVDEAIAACGDVPEIMVIGGGRVYEQFLP KAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYKPDDWESVFSEF HDADAQNSHSYCFEILERR*	10	798, 815, 993
FKBP (E31G, F36V, R71G, K105E)	GVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLGDGK KVDSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMS VGQGAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVEL LELE*	12	688-691, 994, 1013, 1028
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Y122I, A125F)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYF QRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKG RINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPPEL ANKVDMVWIVGGSSVIKFMNHPGHLKLFVTRIM QDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGI KYKFEVYEKND*	890	696, 973, 974, 996
hDHFR	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFF	891	700, 975,

(аминокислоты 2-187 ДТ; Q36F, N65F, Y122I)	RM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKFRPLKGR INLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELA NKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQ DFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIK YKFEVYEKND		976, 998
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; K185E)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYF QRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKG RINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPEL ANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRI MQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEK GIKYKFEVYEEND*	889	972
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; E162G, I176F)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYF QRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKG RINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPEL ANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRI MQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPGYPGVLSDVQEEK GFKYKFEVYEKND*	888	970-972
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; N127Y)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYF QRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKG RINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPEL ANKVDMVWIVGGSSVYKEAMYHPGHLKLFVTRI MQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEK GIKYKFEVYEKND	892	977
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; I17V)	VGSLNCIVAVSQNMGVGKNGDLPWPPLRNEFRYF QRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKG RINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPEL ANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRI MQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEK GIKYKFEVYEKND	894	979
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; I17V, Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMGVGKNGDLPWPPLRNEFRYF QRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKG RINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPEL ANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIM QDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGI KYKFEVYEKND	882	969
hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; H131R, E144G)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYF QRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKG RINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPEL ANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGRLKLFVTRI MQDFGSDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEK GIKYKFEVYEKND	893	978

Таблица 13b: Конструкции ДД-ИЛ15/ИЛ15Ra

Описание	Промотор	Аминокислотные последовательности	Аминокислотный SEQ ID NO	Нуклеотидный SEQ ID NO
ОТ-ИЛ15-006 (сигнальная последовательность IgE; ИЛ15; линкер1 (SG3-(SG4)5-SG3); ИЛ15Ra; линкер2 (GGSGG); ecDHFR (R12H, E129K))	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT AMKCFLLELQVISLESGDASIHDVTENLII LANNSSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGSLQITCPPPMSVEHADI WVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSL TECVLNKATNVAHWTPSLKCIRDPAV HQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEP AASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSP STGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTA SASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC GLSAVSLLACYLKSQRQTPPLASVEMEAM EALPVTWGTSSRDEDLNCSHHLSGISLI AALAVDHVIGMENAMPWNLPAWLAWF KRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKN IILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAACGD VPEIMVIGGGRVYEQFLPKAQKLYLTHI DAEVEGDTHFPDYKPDDWESVFSEFHD ADAQNSHSYCFEILERR*	804	816
ОТ-ИЛ15-007 (сигнальная последовательность IgE; ИЛ15; линкер1 (SG3-(SG4)5-SG3); ИЛ15Ra; линкер2 (GGSGG); FKBP (E31G,F36V, R71G, K105E))	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT AMKCFLLELQVISLESGDASIHDVTENLII LANNSSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGSLQITCPPPMSVEHADI WVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSL TECVLNKATNVAHWTPSLKCIRDPAV HQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEP AASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSP STGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTA SASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC GLSAVSLLACYLKSQRQTPPLASVEMEAM EALPVTWGTSSRDEDLNCSHHLSSGGVQ VETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLG	805	817

		DGKKVDSSDRNKPFFKMLGKQEVIRG WEEGVAQMSVGQGAKLTISPDYAYGAT GHPGIIPPHATLVFDVELLELE*		
OT-IL15-008 (сигнальная последовательн ость IgE - ИЛ15- линкер (SG3-(SG4)3- SG3-SLQ)- ИЛ15Ra-стоп- кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT AMKCFLLELQVISLESGDASIHTVENLII LANNSSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGSLQITCPPMSVEHADI WVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSL TECVLNKATNVAHWTPSLKCIRDPALV HQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEP AASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSP STGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTA SASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC GLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEAM EALPVTWGTSSRDEDLENCSSHL*	806	818
OT-IL15-009 (сигнальная последовательн ость IgE - ИЛ15- линкер (SG3-(SG4)3- SG3-SLQ)- ИЛ15Ra- линкер (SG)- ecDHFR (аминокислота 2-159 ДТ; R12Y, Y10I)- стоп-кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT AMKCFLLELQVISLESGDASIHTVENLII LANNSSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGSLQITCPPMSVEHADI WVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSL TECVLNKATNVAHWTPSLKCIRDPALV HQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEP AASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSP STGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTA SASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC GLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEAM EALPVTWGTSSRDEDLENCSSHL SGISLI AALAVDYGIGMENAMPWNLPAWLAWF KRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKN IILSSQPGTDDRVTWVKSVDEAIAACGD VPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHID AEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDAD AQNSHSYCFEILERR*	807	819
OT-IL15-010 (сигнальная последовательн ость IgE -	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT AMKCFLLELQVISLESGDASIHTVENLII LANNSSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIK	808	820

ИЛ15- линкер (SG3-(SG4)3- SG3-SLQ)- ИЛ15Ra- линкер (SG)- hDHFR (Y122I, A125F)-стоп- кодон)		EFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGSLQITCPPMSVEHADI WVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSL TECVLNKATNVAHWTPSLKCIRDPALV HQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEP AASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSP STGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTA SASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC GLSAVSLLACYLKSQRQTPPLASVEMEAM EALPVTWGTSSRDEDLENC SHHLSGVGS LNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEF RYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWF SIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAH FLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV GGSSVIKEFMNHPGHLKLFVTRIMQDFE SDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEE KGIKYKFEVYEKND*		
OT-IL15-011 (сигнальная последовательн ость IgE - ИЛ15- линкер (SG3-(SG4)3- SG3-SLQ)- ИЛ15Ra; линкер (SG)- hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Q36F, N65F, Y122I)- стоп-кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT AMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLII LANNLSNNGNVTESGCKECEEELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGSLQITCPPMSVEHADI WVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSL TECVLNKATNVAHWTPSLKCIRDPALV HQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEP AASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSP STGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTA SASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC GLSAVSLLACYLKSQRQTPPLASVEMEAM EALPVTWGTSSRDEDLENC SHHLSGVGS LNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEF RYFFRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFS IPEKFRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFL SRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVG GSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFES DTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEK GIKYKFEVYEKND*	809	821
OT-IL15-017 (сигнальная последовательн	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT AMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLII	1061	1086

ость IgE - ИЛ15- линкер (SG3-(SG4)3- SG3-SLQ)- ИЛ15Ra- линкер (SG)- hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; K185E)-стоп- кодон)		LANNSSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADI WVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSL TECVLNKATNVAHWTPSLKCIRDPALV HQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEP AASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSPKSP STGTTEISSHESHGTPSQTAKNWELTA SASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC GLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEAM EALPVTWGTSSRDEDLNCSHHL SGVGS LNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEF RYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWF SIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAH FLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDF ESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQE EKGIKYKFEVYEEND*		
ОТ-IL15-018 (сигнальная последовательн ость IgE - ИЛ15- линкер (SG3-(SG4)3- SG3-SLQ)- ИЛ15Ra- линкер (SG)- hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; E162G, I176F)- стоп-кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT AMKCFLLELQVISLESGDASIHDVTENLII LANNSSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADI WVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSL TECVLNKATNVAHWTPSLKCIRDPALV HQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEP AASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSPKSP STGTTEISSHESHGTPSQTAKNWELTA SASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC GLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEAM EALPVTWGTSSRDEDLNCSHHL SGVGS LNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEF RYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWF SIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAH FLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDF ESDTFFPEIDLEKYKLLPGYPGVLSDVQE EKGFKYKFEVYEKND*	1062	1087
ОТ-IL15-038 (лидер IgE -	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT	1063	1088

ИЛ15 – линкер (SG3-(SG4)3- SG3-SLQ) – ИЛ15Ra – линкер (SG) – hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; N127Y)-стоп- кодон)		AMKCFLELQVISLESGDASIHDVTENLII LANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGSLQITCPPMSVEHADI WVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSL TECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPA LV HQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEP AASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSP STGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTA SASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC GLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEAM EALPVTWGTSSRDEDLNCSHHL SGVGS LNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEF RYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWF SIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAH FLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV GGSSVYKEAMYHPGHLKLFVTRIMQDF ESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQE EKGIKYKFEVYEKND*		
OT-IL15-051 (лидер IgE – ИЛ15 – линкер (SG3-(SG4)3- SG3-SLQ) – тэг НА – ИЛ15Ra – стоп-кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT AMKCFLELQVISLESGDASIHDVTENLII LANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGSLQYPYDVPDYAITCPP PMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGF KRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSL KCIRDPA LVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPE SLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPG SQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTT AKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTV AISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSRQTPP LASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLN CSHHL*	1064	1089
OT-IL15-053 (лидер IgE – ИЛ15 – линкер (SG3(SG4)5SG3 S) – ИЛ15Ra – стоп-кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT AMKCFLELQVISLESGDASIHDVTENLII LANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SITCPP MSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFK	1066	1091

		RKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLK CIRDPALVHQRAPPSTVTTAGVTPQPES LSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGS QLMPSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTA KNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAI STSTVLLCGLSAVSLACYLKSRQTPPLA SVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENC HHL*		
OT-IL15-054 (лидер IgE – ИЛ15 – линкер (SG3(SG4)3S) – тэг НА – линкер (SG3S) – ИЛ15Ra – стоп- кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVT AMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLII LANNSSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGG GGSGGGGSPYPDVPDYASGGGSITCPPP MSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFK RKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLK CIRDPALVHQRAPPSTVTTAGVTPQPES LSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGS QLMPSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTA KNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAI STSTVLLCGLSAVSLACYLKSRQTPPLA SVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENC HHL*	1067	1092
OT-IL15-055 (лидер IgE – ИЛ15 – линкер (SG) - ИЛ15Ra – стоп-кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVT AMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLII LANNSSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTSSGITCPPPMMSVEH ADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGT SSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDP ALVHQRAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSG KEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPS KSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWE LTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTV LLCGLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEM EAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL*	1068	1093
OT-IL15-060 (сигнальный пептид ИЛ15Ra – ИЛ15 – линкер (SG3-	EF1a	MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLRPPAT RGNWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYT ESDVHPSCCKVTAMKCFLELQVISLESG DASIHTVENLIILANNSSLSSNGNVTESG CKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINT	1069	1094

(SG4)3-SG3-SLQ) – ИЛ15Ra – стоп-кодон)		SSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTA AIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDE DLENCSHHL*		
OT-IL15-063 (лидер IgE – ИЛ15 – линкер (SG3-(SG4)3-SG3-SLQ) – ИЛ15Ra – BamHI (GS) - стоп-кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLII LANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTA AIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDEDLENCSHHLGS*	1070	1095
OT-IL15-064 и OT-IL15-071 (лидер IgE – ИЛ15 – линкер (SG3-(SG4)3-SG3-SLQ) – ИЛ15Ra – стоп-кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLII LANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTA AIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDEDLENCSHHL*	806	818
OT-IL15-066 (лидер IgE – ИЛ15 – линкер	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLII	807	819

(SG3-(SG4)3-SG3-SLQ) – ИЛ15Ra – линкер (SG) ecDHFR (аминокислота 2-159 ДТ, R12Y, Y100I) – стоп-кодон)		LANNSSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADI WVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSL TECVLNKATNVAHWTPSLKCIRDPA LV HQRPA PPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEP AASSPSSNNTAATTA AIVPGSQLMPSPKSP STGTTEISSHESSHGTPSQT TAKNWELTA SASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC GLSAVSL LACYLKS RQTPPLASVEMEAM EALPVTWGTSSRDEDL ENC SHHLSGISLI AALAVDYVIGMENAMPWNL PADLAWF KRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKN IILSSQPGTDDRVTWVKSVD EAIACGD VPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHID AEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDAD AQNSHSYC FEILERR*		
OT-IL15-067 (лидер IgE – ИЛ15 – линкер (SG3-(SG4)3-SG3-SLQ) – ИЛ15Ra – линкер (SG) – ecDHFR (аминокислота 2-159 ДТ, R12Y, Y100I) – стоп-кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT AMKCFLLELQVISLESGDASIHTVENLII LANNSSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADI WVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSL TECVLNKATNVAHWTPSLKCIRDPA LV HQRPA PPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEP AASSPSSNNTAATTA AIVPGSQLMPSPKSP STGTTEISSHESSHGTPSQT TAKNWELTA SASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC GLSAVSL LACYLKS RQTPPLASVEMEAM EALPVTWGTSSRDEDL ENC SHHLSGISLI AALAVDYVIGMENAMPWNL PADLAWF KRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKN IILSSQPGTDDRVTWVKSVD EAIACGD VPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHID AEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDAD AQNSHSYC FEILERR*	1071	1098
OT-IL15-070 (сигнальный пептид ИЛ15Ra – ИЛ15 –	EF1a	MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPAT RGNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYT ESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESG DASIHTVENLIILANNSSLSSNGNVTESG	1072	1101

линкер (SG3-(SG4)3-SG3-SLQ) – ИЛ15Ra – стоп-кодон)		CKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN SSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQI TCPPMMSVEHADIWVKSYSLSRERYIC NSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW TTPSLKCIRD PALVHQRPAAPPSTVTTAGV TPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTA AIVPGSQLMPSPSTGTTEISSHESHGT PSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGH SDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSR QTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDE DLENC SHHL*		
OT-IL15-072 (лидер IgE – ИЛ15 – линкер (SG3-(SG4)3-SG3-SLQ) – ИЛ15Ra – стоп-кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT AMKCFLELQVISLESGDASIHD TVENLII LANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFIN TSSGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGSLQITCPPMMSVEHADI WVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSL TECVLNKATNVAHW TTPSLKCIRD PALV HQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEP AASSPSSNNTAATTA AIVPGSQLMPSPSP STGTTEISSHESHGT PSQTTAKNWELT ASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC GLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEAM EALPVTWGTSSRDE DLENC SHHL*	806	1096
OT-IL15-089 (лидер IgE – FLAG – ИЛ15 – линкер (SG3-(SG4)3-SG3-SLQ) – тэг HA – ИЛ15Ra – линкер (GSG) – ecDHFR (аминокислота 2-159 ДТ, R12Y, Y100I) – стоп-кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSDYKDDDDK NWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES DVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDA SIHD TVENLIILANNSLSSNGNVTESGCK ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN TSSG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQYPY DVDPYAITCPPMMSVEHADIWVKSYSLY SRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKAT NVAHW TTPSLKCIRD PALVHQRPAAPPST VTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNN TAATTA AIVPGSQLMPSPSTGTTEISSH ESSHGT PSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLA CYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWG TSSRDE DLENC SHHLGSGISLIAALAVDY VIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKP	1074	1102

		VIMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGT DDRVTWVKSVDIAAACGDVPEIMVIGG GRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTH FPDYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYC FEILERR*		
OT-IL15-109 (лидер IgE – ИЛ15 – линкер (SG3-(SG4)3- SG3-SLQ) – ИЛ15Ra – BamHI (GS) - стоп-кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT AMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLII LANNLSNNGNVTESGCKECEELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADI WVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSL TECVLNKATNVAHWTPSLKCIRDPALV HQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEP AASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSP STGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTA SASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC GLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEAM EALPVTWGTSSRDEDLNCSHHLGS*	1070	1095
OT-IL15-110 (лидер IgE – FLAG – ИЛ15 – линкер (SG3- (SG4)3-SG3- SLQ) – тэг HA – ИЛ15Ra – BamHI (GS) - стоп-кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSDYKDDDDK NWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES DVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDA SIHDTVENLIILANNLSNNGNVTESGCK ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQYPY DVPDYAITCPPPMSVEHADIWVKSYSLY SRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKAT NVAHWTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPST VTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNN TAATTAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSH ESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLA CYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWG TSSRDEDLNCSHHLGS*	1075	1103
OT-IL15-114 (лидер IgE – FLAG – ИЛ15 – линкер (SG3- (SG4)3-SG3- SLQ) – тэг HA – ИЛ15Ra –	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSDYKDDDDK NWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES DVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDA SIHDTVENLIILANNLSNNGNVTESGCK ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQYPY DVPDYAITCPPPMSVEHADIWVKSYSLY	1076	1104

линкер (GSG) – hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; K185E) - стоп-кодон)		SRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKAT NVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPST VTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNN TAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSH ESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLA CYLKSQRQTPPLASVEMEAMEALPVTWG TSSRDEDLENC SHHLGSGVGS LNCIVAV SQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNR PLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLD DALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVY KEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFP EIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYK FEVYEEND*		
OT-IL15-115 (лидер IgE – FLAG – ИЛ15 – линкер (SG3-(SG4)3-SG3-SLQ) – HA тэг – ИЛ15Ra – линкер (GSG) – hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; E162G, I176F) - стоп-кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSDYKDDDDK NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES DVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDA SIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCK ECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQYPY DVDPDYAITCPPPMSVEHADIWVKSYSLY SRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKAT NVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPST VTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNN TAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSH ESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLA CYLKSQRQTPPLASVEMEAMEALPVTWG TSSRDEDLENC SHHLGSGVGS LNCIVAV SQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNR PLKGRINLVL SRELKEPPQGAHFLSRSLD DALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVY KEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFP EIDLEKYKLLPGYPGVLSDVQEEKGFKY KFEVYEKND*	1077	1105
OT-IL15-116 (лидер IgE – FLAG – ИЛ15 – линкер (SG3-	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSDYKDDDDK NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES DVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDA SIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCK	1078	1106

(SG4)3-SG3-SLQ) – тэг НА – ИЛ15Ra – линкер (GSG) – hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; H131R, E144G) - стоп-кодон)		ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTESSG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQYPY DVDPYAITCPPMSVEHADIWVKSYSLY SRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKAT NVAHWTTPSLKCIRDPA LVHQRPAAPPST VTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNN TAATTA AIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSH ESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLA CYLKSRTTPPLASVEMEAMEALPVTWG TSSRDEDLENC SHHLGSGVGS LNCIVAV SQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNR PLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLD DALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVY KEAMNHPGRLKLFVTRIMQDFGSDTFFP EIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYK FEVYEKND*		
OT-IL15-117 (лидер IgE – FLAG – ИЛ15 – линкер (SG3-(SG4)3-SG3-SLQ) – тэг НА – ИЛ15Ra – линкер (GSG) – hDHFR(аминокислоты 2-187 ДТ; H17V) - стоп-кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSDYKDDDDK NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES DVHPSCCKVTAMKCFLLELQVISLESGDA SIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTEGCK ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTESSG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQYPY DVDPYAITCPPMSVEHADIWVKSYSLY SRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKAT NVAHWTTPSLKCIRDPA LVHQRPAAPPST VTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNN TAATTA AIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSH ESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLA CYLKSRTTPPLASVEMEAMEALPVTWG TSSRDEDLENC SHHLGSGVGS LNCIVAV SQNMGVGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNR PLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLD DALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVY KEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFP EIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYK FEVYEKND*	1079	1107
OT-IL15-118	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSDYKDDDDK	1080	1108

(лидер IgE – FLAG – ИЛ15 – линкер (SG3-(SG4)3-SG3-SLQ) – тэг HA – ИЛ15Ra – линкер (GSG) – hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ, N127Y) - стоп-кодон)		NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES DVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDA SIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTEGCK ECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQYPY DVDPDYAITCPPPMSVEHADIWVKSYSLY SRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKAT NVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPST VTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNN TAATTAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSH ESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLA CYLKSQRQTPPLASVEMEAMEALPVTWG TSSRDEDLENC SHHLGSGVGS LNCIVAV SQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNR PLKGRINL VLSRELKEPPQGAHFLSRSLD DALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVY KEAMYHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFP EIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYK FEVYEKND*		
OT-IL15-119 (лидер IgE – FLAG – ИЛ15 – линкер (SG3-(SG4)3-SG3-SLQ) – тэг HA – ИЛ15Ra – линкер (GSG) – hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ, I17V, Y122I) - стоп-кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSDYKDDDDK NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES DVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDA SIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTEGCK ECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQYPY DVDPDYAITCPPPMSVEHADIWVKSYSLY SRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKAT NVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPST VTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNN TAATTAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSH ESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLA CYLKSQRQTPPLASVEMEAMEALPVTWG TSSRDEDLENC SHHLGSGVGS LNCIVAV SQNMGVGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNR PLKGRINL VLSRELKEPPQGAHFLSRSLD DALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVIK EAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEI	1081	1109

		DLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKF EVYEKND*		
OT-IL15-128 (лидер IgE – ИЛ15 – линкер (SG3-(SG4)3- SG3-SLQ) – ИЛ15Ra– спейсер – Flagx3 - спейсер - BamHI (GS) – P2A расщепляемый пептид – mCherry (M1L) - стоп-кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT AMKCFLLELQVISLESGDASIHDVTENLII LANNSSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADI WVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSL TECVLNKATNVAHWTPSLKCIRDPALV HQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEP AASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSP STGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTA SASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC GLSAVSLLACYLKSQRQTPPLASVEMEAM EALPVTWGTSSRDEDLNCSHHL SRMD YKDDDDKDYKDDDDKDYKDDDDKSRG SGATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEED NMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEG EGEGRPYEGTQTAKLKVTGGPLPFAW DILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSF PEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQ DGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKT GWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLK DGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYN VNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHST GGMDELYK*	1082	1110
OT-IL15-129 (лидер IgE – ИЛ15 – линкер (SG3-(SG4)3- SG3-SLQ) – ИЛ15Ra–BamHI (GS) – P2A расщепляемый пептид – mCherry (M1L)- стоп-кодон)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT AMKCFLLELQVISLESGDASIHDVTENLII LANNSSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADI WVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSL TECVLNKATNVAHWTPSLKCIRDPALV HQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEP AASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSP STGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTA SASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC GLSAVSLLACYLKSQRQTPPLASVEMEAM EALPVTWGTSSRDEDLNCSHHLGSGAT	1083	1111

		NFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEEDNMAI IKEFMRFK VHMEGSVNGHEFEIEGEGEG RPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSP QFMYGSKAYVKHPADIPDYKLKSFPEGF KWERMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEF IYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEA SSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGH YDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKL DITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMD ELYK*		

Таблица 13с: Конструкции ИЛ15/ИЛ15Ra

Описание конструкц ии	Описание последовате льности	Промот ор	Аминокислотные последовательности	Аминок ислотн ый SEQ ID NO	SEQ ID NO нуклеоти- дной кислоты/ последов- ательность
OT-IL15- 122 (лидер IgE – ИЛ15 – линкер (GS) – hDHFR (аминокисл оты 2-187 ДТ, Y122I) – стоп- кодон – спейсер – IRES – спейсер – mCherry – стоп-кодон)	Полная конструкция	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSN WVNVISDLKKIEDLIQSMHID ATLYTESDVHPSCKVTAMKC FLLELQVISLESGDASIHTVE NLILANNSLSSNGNVTESGC KECEEELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTSGSVGSLNCIVAVSQ NMGIGKNGDLPWPPLRNEFR YFQRM TTTSSVEGKQNLVIM GKKTWFSIPEKNRPLKGRINL VLSRELKEPPQGAHFLSRSLD DALKLTEQPELANKVDMVWI VGGSSVIKEAMNHPGHLKLF VTRIMQDFESDTFFPEIDLEKY KLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEKND*SR*YDSLEIPPL SLPPP*RYWPKPLGIRPVCVC LYVIFHHIAVFWQCEGPETWP CLLDEHS*GSFPSRQRNARSV ECREGSSSSGSFLKTNNVCSD PLQAAEPPTWRQVPLRPKAT CIRYTCKGGTTPVPRCELDSC GKSQMA LLKRIQQGAEGCPE	1114, 1126- 1140	1120

			GTPLYGI*SGASVHMLYMCL VEVKKTSRPPEPRGRGFPLKN TMIIWPQP**ARARRITWPSSR SSCASRCTWRAP*TATSSRSR ARARAAPTRAPRPPS*R*PRV APCSPGTSCPLSSCTAPRPT* STPPTSPTT*SCPSPRASSGSA* *TSRTAAW*P*PRTPPCRTASS STR*SCAAPTSPPTAP*CRRRP WAGRPPPSGCTPRTAP*RARS SRG*S*RTAATTTLSRPPTRP RSPCSCPAPTTSTSSWTSPTT RTTPSWNSTNAPRAATPPAA WTSCTS		
Лидер IgE – ИЛ15 – линкер (GS) – hDHFR (аминокисло ты 2-187 ДТ, Y122I) – стоп-кодон	-	-	MDWTWILFLVAAATRVHSN WVNVISDLKKIEDLIQSMHID ATLYTESDVHPSCKVTAMKC FLLELQVISLESGDASIHDVTE NLILANNSLSSNGNVTESGC KECEEELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTSGSVGSLNCIVAVSQ NMGIGKNGDLPWPPLRNEFR YFQRM TTTSSVEGKQNLVIM GKKTWFSIPEKNRPLKGRINL VLSRELKEPPQGAHFLSRSLD DALKLTEQPELANKVDMVWI VGGSSVIKEAMNHPGHLKLF VTRIMQDFESDTFFPEIDLEKY KLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEKND*	1115	1121
mCherry – стоп-кодон	-	-	MSKGEEDNMAIIEFMRFKV HMEGSVNGHEFEIEGEGEGRP YEGTQTAKLKVTGGPLPFA WDILSPQFMYGSKAYVKHPA DIPDYLKLSFPEGFKWERVM NFEDGGVVTVTQDSSLQDGE FIYKVKLRGTNFPDGPVMQ KKTMGWEASSERMYPEDGA LKGEIKQRLKLDGGHYDAE VKTTYKAKKPVQLPGAYNV NIKLDITSHNEDYTIVEQYER	1116	1122

			AEGRHSTGGMDELYK*		
OT-IL15-123 и OT-IL15-127(лидер IgE – ИЛ15 – BamHI (GS) – стоп-кодон – спейсер – IRES – спейсер – mCherry – стоп-кодон)	Полная конструкция	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSN WVNVISDLKKIEDLIQSMHID ATLYTESDVHPSCKVTAMKC FLLELQVISLESGDASIHD TVE NLILANNSLSSNGNVTESGC KECEELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTSGS*NLDNTTH*RSR PSPSPPPNVTGRSRLE*GRCAF VYMLFSTILPSFGNVRARKPG PVFLT SIPRGLSPLAKGMQGL LNVVKEAVPLEAS*RQTTSVA TLCRQRNPPPGDRCLCGQKP RV*DTPAKAAQPQCHVVS WI VVERVKWLSSSVFNKGLKDA QKVPHCMGSDLGPRCTCFTC V*SRLKKRLGPPNHGDVVFL* KTR**YGHNHDEQGRGG*HG HHQGVHALQGAHGGLRERP RVRDRGRGRGPPLRGHPDRQ AEGDQGWPPALRLGHPVPSV HVRLQGLREAPRRHPRLLEA VLPRGLQVGARDELGRRRRG DRDPGLLPAGRRVHLQGEAA RHQLPLRRPRNAEEDHGLGG LLRADVPRGRRPEGRDQAEA EAEGRRPLRR*GQDHLQGQE ARAAARRLQRQHVGHHLP QRGLHHRGTVRTRRGPP LHR RHGRAVQV	1117, 1141- 1149	1123
	Лидер IgE – ИЛ15 – BamHI (GS) – стоп-кодон	-	MDWTWILFLVAAATRVHSN WVNVISDLKKIEDLIQSMHID ATLYTESDVHPSCKVTAMKC FLLELQVISLESGDASIHD TVE NLILANNSLSSNGNVTESGC KECEELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTSGS*	1118	1124
	mCherry – стоп-кодон	-	MSKGEEDNMAIIEFMRFKV HMEGSVNGHEFEIEGEGEGRP YEGTQTAKLKVTGGPLPFA WDILSPQFMYGSKAYVKHPA	1119	1125

			DIPDYLKLSFPEGFKWERVM NFEDGGVVTVTQDSSLQDGE FIYKVKLRGTNFSPDGPVMQ KKTMGWEASSERMYPEDGA LKGEIKQRLKLDGGHYDAE VKTTYKAKKPVQLPGAYNV NIKLDITSHNEDYTIVEQYER AEGRHSTGGMDELYK*		

[00255] В одном варианте осуществления, полезный груз согласно данному изобретению может содержать ИЛ18. ИЛ18 является провоспалительным и иммунорегуляторным цитокином, который способствует выработке ИФН- γ Т-лимфоцитами и NK-клетками. ИЛ18 принадлежит к семейству ИЛ1. Секретируемый ИЛ18 связывается с гетеродимерным рецепторным комплексом, состоящим из α и β -цепей ИЛ18R α и инициирует передачу сигнала. ИЛ18 действует совместно с другими цитокинами для модуляции функций иммунной системы, включая индукцию продуцирования ИФН- γ , ответы Th1 и активацию NK-клеток в ответ на продукты патогена. ИЛ18 продемонстрировал противораковые эффекты в нескольких опухолях. Введение рекомбинантного белка ИЛ18 или трансгена ИЛ18 индуцирует регрессию меланомы или саркомы посредством активации ответов, опосредованных CD4⁺ Т-лимфоцитами и/или NK-клетками (рассмотрено Srivastava et al., *Curr. Med. Chem.*, 2010, 17: 3353–3357). Комбинация ИЛ18 с другими цитокинами, такими как ИЛ12 или ко-стимулирующими молекулами (например, CD80), усиливает противоопухолевые эффекты ИЛ18. Например, гены ИЛ18 и ИЛ12A/В или CD80 были успешно интегрированы в геном онколитических вирусов с целью запуска синергических, опосредованных Т-лимфоцитами, противоопухолевых иммунных ответов (Choi et al., *Gene Ther.*, 2011, 18: 898-909). Гибридные белки ИЛ2/ИЛ18 также демонстрируют улучшенные противоопухолевые свойства относительно каждого цитокина по отдельности, и низкую токсичность в доклинических моделях (Acres et al., *Cancer Res.*, 2005, 65:9536–9546).

[00256] ИЛ18 отдельно или в комбинации с ИЛ12 и ИЛ15 активирует NK-клетки. Доклинические исследования показали, что адаптивно перенесенные предварительно аткивированные ИЛ12, ИЛ15 и ИЛ18 NK-клетки демонстрируют усиленную эффекторную функцию против развившихся опухолей *in vivo* (Ni et al., *J Exp Med.* 2012, 209: 2351–2365; и Romee et al., *Blood.* 2012,120:4751–4760). NK-клетки человека, активированные ИЛ12/ИЛ15/ИЛ18, также продемонстрировали признаки, подобные запоминанию, и секретируют больше ИФН- γ в ответ на цитокины (например, низкую концентрацию ИЛ2). В одном варианте осуществления, эффекторный модуль согласно данному изобретению может представлять собой гибридный полипептид ДД-ИЛ18.

[00257] В одном варианте осуществления, полезный груз согласно данному изобретению может содержать ИЛ21. ИЛ21 является другим плеiotропным цитокином типа I, который вырабатывается главным образом Т-лимфоцитами и Т-клетками-естественными киллерами (NKT). ИЛ21 оказывает различное воздействие на различные типы клеток, включая, но не ограничиваясь лишь этими: CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты, В-лимфоциты, макрофаги, моноциты и дендритные клетки (ДК). Функциональный рецептор для ИЛ21 состоит из рецептора ИЛ21 (ИЛ21R) и общей для цитокиновых рецепторов гамма-цепи, которая также является субъединицей рецепторов для ИЛ2, ИЛ4, ИЛ7, ИЛ9 и ИЛ15. Исследования предоставляют

убедительные доказательства того, что ИЛ21 является перспективным иммунотерапевтическим агентом для иммунотерапии рака. ИЛ21 способствует созреванию, повышает цитотоксичность и индуцирует выработку ИФН- γ и перфорина NK-клетками. Эти эффекторные функции ингибируют рост меланомы B16 (Kasaian et al., *Immunity*. 2002, 16(4):559–569; and Brady et al., *J Immunol*. 2004, 172(4):2048–2058). ИЛ21 вместе с ИЛ15 увеличивает количество антиген-специфических CD8⁺ Т-лимфоцитов и их эффекторную функцию, что приводит к регрессии опухоли (Zeng et al., *J Exp Med*. 2005, 201(1):139–148). ИЛ21 также может быть использован для обновления множества иммунных эффекторных клеток в микроокружении опухоли. ИЛ21 может также прямо вызывать апоптоз при определенных типах лимфомы, таких как диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, лимфома клеток зоны мантии и хронический лимфолейкоз, посредством активации сигнального пути STAT3 или STAT1. ИЛ21, один или в комбинации с анти-CD20 mAb (ритуксимаб), может активировать цитотоксические эффекты, зависящие от NK-клеток. Интересно, что обнаружение иммуносупрессивного действия ИЛ-21 позволяет предположить, что этот цитокин является «обоюдоострым мечом» - стимуляция ИЛ-21 может приводить либо к индукции, либо к подавлению иммунных реакций. При использовании иммунотерапевтических агентов, связанных с ИЛ21, необходимо учитывать как стимулирующие, так и подавляющие эффекты ИЛ21. Уровень ИЛ21 должен точно контролироваться регуляторными элементами. В одном аспекте, эффекторный модуль согласно данному изобретению может представлять собой гибридный полипептид ДД-ИЛ21.

[00258] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут содержать интерфероны типа I. Интерфероны типа I (ИФН-I) представляют собой растворимые белки, важные для борьбы с вирусной инфекцией у людей. ИФН-I включают в себя подтипы ИФН-альфа (ИФН- α 1, ИФН- α 1b, ИФН- α 1c), ИФН-бета, подтипы ИФН-дельта (ИФН-дельта 1, ИФН-дельта 2, ИФН-дельта 8), ИФН-гамма, ИФН-каппа и ИФН-эпсилон, ИФН-лямбда, ИФН-омега, ИФН-тау и ИФН-дзета. ИФН- α и ИФН- β являются основными подтипами ИФН-I в иммунных реакциях. Все подтипы ИФН-I передают сигналы через уникальный гетеродимерный рецептор, рецептор интерферона альфа (ИФНАР), состоящий из 2 субъединиц, ИФНАР1 и ИФНАР2. Активация ИФНР регулирует ответ хозяина на вирусные инфекции, и адаптивный иммунитет. ИФНР может активировать несколько сигнальных каскадов, включая путь передатчика сигнала и активатора транскрипции Janus активированной киназы (JAK-STAT), путь митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK), путь фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), путь гомолог(птичий)-подобного онкогена CT10 v-src вируса саркомы (CRKL), и каскад NF- κ B. Давно установлено, что ИФН типа I прямо ингибируют пролиферацию опухолевых клеток и инфицированных вирусом клеток, и увеличивают экспрессию ГКГС класса I, повышая распознавание антигена. Также была доказана вовлеченность ИФН-I в регуляцию иммунной системы. ИФН могут прямо, через рецептор интерферона (ИФНР) или опосредованно, путем индукции хемокинов и цитокинов, регулировать иммунную систему. ИФН типа I усиливают функции NK-клеток и способствуют выживанию NK-клеток. ИФН типа I также воздействуют на моноциты, поддерживая дифференциацию моноцитов в ДК с большой производительностью презентации антигена, и стимулируют функцию и дифференциацию макрофагов. Несколько исследований также демонстрируют, что ИФН-I способствуют выживанию и функционированию CD8⁺ Т-лимфоцитов. В некоторых случаях, может быть желательно настроить экспрессию ИФН типа I с использованием биоконструктов согласно данному изобретению, чтобы избежать иммуносупрессии, вызванной длительным лечением ИФН.

[00259] Разрабатываются новые противоопухолевые иммунотерапии, в которых используются рекомбинантные белки ИФН типа I, трансген ИФН типа I, векторы, кодирующие ИФН типа I, и клетки,

экспрессирующие ИФН типа I. Например, ИФН- α получил одобрение для лечения ряда опухолевых заболеваний, таких как меланома, ПМК (почечно-клеточная карцинома) и множественная миелома. Хотя ИФН типа I являются мощными инструментами для прямой и косвенной модуляции функций иммунной системы, побочные эффекты системного длительного лечения и недостаточно высокая эффективность ослабляют интерес к ИФН- α в клиническом применении в онкологии. Считается, что, если уровни ИФН будут точно регулироваться в злокачественных тканях, то ИФН типа I вероятно будут более эффективными. Предложены подходы к периодической доставке согласно наблюдению, заключающемуся в том, что периодичность с оптимизированным шагом может помочь избежать сигналинга механизмов десенсибилизации (механизмов отрицательной обратной связи), индуцируемых ИФН-I (то есть, из-за индукции SOCS1) в отвечающих иммунных клетках. Согласно данному изобретению эффекторный модуль может содержать гибридный полипептид ДД-ИФН. ДД и его лиганд контролируют экспрессию ИФН, чтобы вызывать противовирусные и противоопухолевые иммунные ответы, и между тем минимизировать побочные эффекты, вызванные длительным воздействием ИФН.

[00260] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут включать в себя членов суперсемейства факторов некроза опухолей (ФНО). Как используется в данном документе, термин «суперсемейство ФНО» относится к группе цитокинов, которые могут индуцировать апоптоз. Члены семейства ФНО включают в себя ФНО-альфа, ФНО-бета (также известный как лимфотоксин-альфа (LT- α)), лимфотоксин-бета (LT- β), CD40L (CD154), CD27L (CD70), CD30L (CD153), FASL (CD178), 4-1BBL (CD137L), OX40L, TRAIL (лиганд, индуцирующий апоптоз, связанный с ФНО), APRIL (лиганд, индуцирующий пролиферацию), TWEAK, TRANCE, TALL-1, GITRL, LIGHT и TNFSF1 до TNFSF20 (член суперсемейства лигандов ФНО с 1 по 20). В одном варианте осуществления, полезный груз согласно изобретению может представлять собой ФНО-альфа. ФНО-альфа может вызывать цитоллиз опухолевых клеток, а также индуцировать пролиферацию и дифференциацию клеток. В одном аспекте, эффекторный модуль согласно данному изобретению может содержать гибридный полипептид ДД-ФНО-альфа.

[00261] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут содержать ингибирующие молекулы, которые блокируют ингибирующие цитокины. Ингибиторы могут представлять собой блокирующие антитела, специфичные к ингибирующему цитокину, и антагонистами к ингибирующему цитокину, или тому подобное.

[00262] В некоторых аспектах, полезные грузы согласно данному изобретению могут содержать ингибитор вторичного цитокина ИЛ35. ИЛ35 принадлежит к семейству цитокинов интерлейкина-12 (ИЛ12) и представляет собой гетеродимер, состоящий из β -цепи Ebi3 ИЛ27 и α -цепи p35 ИЛ12. Секреция биоактивного ИЛ35 была описана только в регуляторных Т-лимфоцитах (Foxp3)⁺ (белок 3 с вильчатоподобным доменом) (Трег) (покоящиеся и активированные Трег). В отличие от других членов в семействе, ИЛ35, по-видимому, функционирует исключительно противовоспалительным образом, ингибируя пролиферацию эффекторных Т-лимфоцитов и, возможно, другие параметры (Collison et al., *Nature*, 2007, 450(7169): 566–569).

[00263] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут содержать ингибиторы, которые блокируют подтипы (TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3) трансформирующего фактора роста бета (TGF- β). TGF- β секретируется многими типами клеток, включая макрофаги, и часто образует комплекс с двумя белками LTBR и LAP. Протеиназы сыворотки, такие как плазмин, катализируют

высвобождение активного TGF- β из комплекса из активированных макрофагов. Было показано, что увеличение экспрессии TGF- β коррелирует со злокачественностью многих видов рака. Иммуносупрессивная активность TGF- β в микроокружении опухоли способствует онкогенезу.

[00264] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут содержать ингибиторы фермента IDO.

[00265] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут содержать хемокины и хемокиновые рецепторы. Хемокины представляют собой семейство секретируемых небольших цитокинов или сигнальных белков, которые могут индуцировать направленный хемотаксис в находящихся поблизости чувствительных клетках. Хемокин может представлять собой SCY (небольшой цитокин), выбранный из группы, состоящей из SCYA1-28 (CCL1-28), SCYB1-16 (CXCL1-16), SCYC1-2 (XCL1-2), SCYD-1 и SCYE-1; или хемокин C, выбранный из XCL1 и XCL2; или хемокин CC, выбранный из CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, CCL10, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27 и CCL28; или хемокин CXC, выбранный из CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16 и CXCL17; или хемокин CX3C - CX3CL1. В некоторых аспектах, рецептор хемокинов может быть рецептором хемокинов C, включая XCR1; или рецептором хемокинов CC, включая CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9 и CCR10; или рецептором хемокинов CXC, включая CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4 и CXCR5; или рецептором хемокина CX3C - CX3CR1.

[00266] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут содержать другие иммуномодуляторы, которые играют критическую роль в иммунотерапии, такие как GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), эритропоэтин (EPO), MIP3a, хемотаксический белок моноцитов (MCP)-1, молекула внутриклеточной адгезии (ICAM), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), киназа, активирующая рецептор интерлейкина-1 (iRAK-1), лактоферрин, и колониестимулирующий фактор гранулоцитов (G-CSF).

[00267] В некоторых вариантах осуществления, полезный груз согласно данному изобретению может содержать амфирегулин. Амфирегулин (AREG) является EGF-подобным фактором роста, который связывается с рецептором EGFR и усиливает функцию регуляторных CD4⁺ Т-лимфоцитов (Treg). AREG способствует подавлению иммунитета в опухолевой среде. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут содержать амфирегулин для ослабления иммунного ответа во время иммунотерапии.

[00268] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут содержать гибридные белки, в которых цитокин, хемокин и/или другой растворимый фактор могут быть слиты с другими биологическими молекулами, такими как антитела и/или лиганды рецептора. Такие гибридные молекулы могут увеличивать время полужизни цитокинов, снижать системную токсичность и увеличивать локальную концентрацию цитокинов в сайте опухоли. Гибридные белки, содержащие два или большее количество цитокинов, хемокинов и/или других растворимых факторов, могут быть использованы для получения синергетической терапевтической пользы. В одном варианте осуществления, полезный груз может представлять собой гибридный белок GM-CSF/IL12.

3. Дополнительные элементы эффекторного модуля

[00269] Эффекторный модуль согласно данному изобретению может дополнительно содержать сигнальную последовательность, которая регулирует распределение полезного груза, представляющего интерес, элемент расщепления и/или процессинга, которая облегчает отщепление полезного груза от конструкции эффекторного модуля, сигнал нацеливания и/или проникновения, который может регулировать клеточную локализацию эффекторного модуля, тэг и/или одну или большее количество линкерных последовательностей, которые связывают различные компоненты эффекторного модуля.

Сигнальные последовательности

[00270] В дополнение к ЭОС (например, ДД) и области полезного груза, эффекторные модули согласно изобретению могут дополнительно содержать одну или большее количество сигнальных последовательностей. Сигнальные последовательности (иногда называемые сигнальными пептидами, нацеливающими сигналами, нацеливающими пептидами, последовательностями локализации, транзитными пептидами, лидерными последовательностями или лидерными пептидами) направляют белки (например, эффекторный модуль согласно данному изобретению) в их места назначения в клетке и/или вне клетки. Белковые сигнальные последовательности играют центральную роль в нацеливании и транслокации почти всех секретируемых белков и многих интегральных мембранных белков.

[00271] Сигнальная последовательность представляет собой короткий (длиной 5-30 аминокислот) пептид, присутствующий на N-конце большинства новых синтезированных белков, которые направлены в определенное место. Сигнальные последовательности могут быть распознаны частицами распознавания сигнала (SRP) и расщеплены с использованием пептидаз типа I и типа II сигнальных пептидов. Сигнальные последовательности, полученные из человеческих белков, могут быть включены в качестве регуляторного модуля эффекторного модуля для направления эффекторного модуля в конкретное место в клетке и/или вне клетки. Эти сигнальные последовательности проверены экспериментально и могут быть расщеплены (Zhang et al., *Protein Sci.* 2004, 13:2819-2824).

[00272] В некоторых вариантах осуществления, сигнальная последовательность может быть, хотя и не обязательно, расположена на N-конце или C-конце эффекторного модуля и может, хотя и не обязательно, отщепляться от желаемого эффекторного модуля для получения «зрелого» полезного груза, то есть иммунотерапевтического агента, как это обсуждается в данном документе.

[00273] В некоторых примерах, сигнальная последовательность может представлять собой секретируемую сигнальную последовательность, полученную из природно секретируемого белка, и его варианта. В некоторых случаях, секретируемые сигнальные последовательности могут представлять собой сигнальные последовательности цитокинов, такие как, но не ограничиваясь лишь этими: сигнальная последовательность ИЛ2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 783, кодируемую нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 788-791, и/или сигнальная последовательность р40, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 719, кодируемую нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 736-744.

[00274] В некоторых случаях, могут использоваться сигнальные последовательности, направляющие полезный груз, представляющий интерес, к поверхности мембраны клетки-мишени. Экспрессия полезного груза на поверхности клетки-мишени может быть полезной для ограничения рассредоточения полезного груза в нецелевые области *in vivo*, тем самым потенциально улучшая профиль безопасности полезных грузов. Кроме того, мембранное презентирование полезного груза может обеспечивать физиологический и

характерный сигналинг, а также стабилизацию и рециркуляцию полезного груза для более длительного периода полужизни. Мембранные последовательности могут быть эндогенной сигнальной последовательностью N-концевого компонента полезного груза, представляющего интерес. Необязательно, может быть желательно заменить данную последовательность на другую сигнальную последовательность. Сигнальные последовательности могут быть выбраны на основе их совместимости с секреторным путем интересующего типа клеток, так что полезный груз презентуется на поверхности Т-лимфоцита. В некоторых вариантах осуществления, сигнальная последовательность может представлять собой сигнальную последовательность IgE, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 801 и нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 810, 930 или 931, сигнальную последовательность CD8a (также называемую лидерной последовательностью CD8a), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 628 и нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 671-675, или сигнальную последовательность ИЛ15Ra (также называемая лидерной последовательностью ИЛ15Ra), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 932 и нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 933.

[00275] Другие примеры сигнальных последовательностей включают в себя вариант, который может быть модифицированной сигнальной последовательностью, обсуждаемой в патентах США № 8148494; № 8258102; № 9133265; № 9279007; и в публикации заявки на патент США № 20070141666; и в международной публикации заявки на патент № WO1993018181; содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00276] В других примерах, сигнальная последовательность может представлять собой гетерогенную сигнальную последовательность из других организмов, таких как вирусы, дрожжи и бактерии, которые могут направлять эффекторный модуль в конкретное место в клетке, например ядро (например, EP 1209450). Другие примеры могут включать в себя сигнальные последовательности аспарагиновой протеазы (NSP24) из *Trichoderma*, которые могут усиливать секрецию гибридного белка, например ферментов (например, патент США № 8093016, от Cervin и Kim), сигнальные последовательности бактериальных липопротеинов (например, публикация заявки PCT № WO199109952, от Lau и Rioux), сигнальные пептиды энтеротоксина II *E. coli* (например, патент США № 6605697, от Kwon et al.), сигнальная последовательность секреции *E. coli* (например, публикация патента США № US2016090404, от Malley et al.), сигнальная последовательность липазы из метилотрофных дрожжей (например, патент США № 8975041) и сигнальные пептиды для ДНКаз, полученные из *Coryneform bacteria* (например, патент США № 4965197); содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00277] Сигнальные последовательности могут также включать в себя сигналы ядерной локализации (NLS), сигналы ядерного экспорта (NES), сигналы локализации в тубулярно-везикулярной структуре поляризованных клеток (смотрите, например, патент США № 8993742; Cour et al., *Nucleic Acids Res.* 2003, 31(1): 393-396; содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме), внеклеточные сигналы локализации, сигналы субклеточной локализации (например, в лизосоме, эндоплазматическом ретикулуме, аппарате Гольджи, митохондриях, плазматической мембране и пероксисоме и т. д.) (смотрите, например, патент США № 7396811; и Negi et al., *Database*, 2015, 1-7; содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

[00278] В некоторых вариантах осуществления, сигнальные последовательности согласно данному изобретению включают в себя, без ограничения, любые из тех, которые описаны в Таблице 6 совместно

рассматриваемой и находящейся в совместном владении предварительной заявки на патент США № 62/320864, поданной 4/11/2016, или в предварительной заявке США № 62/466596, поданной 3 марта 2017 года, и международной публикации WO2017/180587, содержания каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Сайты расщепления

[00279] В некоторых вариантах осуществления, эффекторный модуль содержит элемент расщепления и/или процессинга. Эффекторный модуль согласно данному изобретению может содержать, по меньшей мере, один сигнал/сайт расщепления белка. Сигнал/сайт расщепления белка может быть расположен на N-конце, С-конце, в любом промежутке между N- и С-концом, например, но без ограничения: посредине - между N- и С- концом, между N-концом и серединой, между серединой и С-концом, и их комбинациями.

[00280] Эффекторный модуль может содержать один или большее количество сигналов/сайтов расщепления любых протеиназ. Протеиназы могут представлять собой сериновую протеиназу, цистеиновую протеиназу, эндопептидазу, дипептидазу, металлопротеиназу, глутаминовую протеиназу, треонинпротеиназу и аспарагиновую протеиназу. В некоторых аспектах, сайт расщепления может представлять собой сигнальную последовательность фурина, актинидина, кальпаина-1, карбоксипептидазы А, карбоксипептидазы Р, карбоксипептидазы Y, каспазы-1, каспазы-2, каспазы-3, каспазы-4, каспазы-5, каспазы-6, каспазы-7, каспазы-8, каспазы-9, каспазы-10, катепсина В, катепсина С, катепсина G, катепсина Н, катепсина К, катепсина L, катепсина S, катепсина V, кластрипаина, химазы, химотрипсина, эластазы, эндопротеиназы, энтерокиназы, фактора Ха, муравьиной кислоты, гранзима В, матриксной металлопептидазы-2, матриксной металлопептидазы-3, пепсина, протеиназы К, протеазы SUMO, субтилизина, протеазы TEV, термолизина, тромбина, трипсина и TAGZyme.

[00281] В одном варианте осуществления, сайт расщепления представляет собой сайт расщепления фурина, содержащий аминокислотную последовательность SARNRQKRS (SEQ ID NO: 721), кодируемую нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 750; или модифицированный сайт расщепления фурина, содержащий аминокислотную последовательность ARNRQKRS (SEQ ID NO: 722), кодируемую нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 751; или модифицированный сайт фурина, содержащий аминокислотную последовательность ESRRVRRNKRSK (SEQ ID NO: 630), кодируемую нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 681-683.

[00282] В некоторых вариантах осуществления, сайты расщепления согласно данному изобретению включают в себя, без ограничения, любые из тех, которые описаны в Таблице 7 совместно рассматриваемой и находящейся в совместном владении предварительной заявки на патент США № 62/320 864, поданной 4/11/2016, или в предварительной заявки США № 62/466596, поданной 3 марта 2017 года, и международной публикации WO2017/180587, содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Белковые тэги

[00283] В некоторых вариантах осуществления, эффекторный модуль согласно изобретению может содержать белковый тэг. Белковая метка может быть использована для обнаружения и мониторинга движения эффекторного модуля. Эффекторный модуль может содержать один или большее количество тэгов, таких как эпитопный тэг (например, FLAG или гемагглютининовый (НА) тэг). Для представленных эффекторных модулей может быть использовано большое количество белковых тэгов. Они включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: самометящиеся полипептидные тэги (например,

галогеналкандегалогеназа (halotag2 или halotag7), тэг ACP, тэг CLIP, тэг MCP, тэг SNAP), эпитопные тэги (например, FLAG, HA, His и Myc), флуоресцентные тэги (например, зеленый флуоресцентный белок (GFP), красный флуоресцентный белок (RFP), желтый флуоресцентный белок (YFP), и их варианты), биолюминесцентные тэги (например, люцифераза и ее варианты), аффинные тэги (например, тэг мальтозосвязывающего белка (MBP), тэг глутатион-S-трансферазы (GST)), иммуногенный аффинные тэги (например, белок A/G, IRS, AU1, AU5, glu-glu, KT3, S-tag, HSV, VSV-G, Xpress и V5) и другие тэги (например, биотин (малая молекула), StrepTag (StrepII), SBP, карбоксильный белок-переносчик биотина (BCCP), eXact, CBP, CYD, HPC, CBD, домен, связывающий интеин-хитин, Trx, NorpA и NusA.

[00284] В других вариантах осуществления, тэг также может быть выбран из тех, которые раскрыты в патентах США № 8999897; № 8357511; № 7094568; № 5011912; № 4851341; и № 4703004; публикациях заявок на патент США № US2013115635 и № US2013012687; и публикации международной заявки № WO2013091661; содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00285] В некоторых аспектах, может использоваться множество белковых тэгов, одинаковых или разных тэгов; каждый из тэгов может быть расположен на одном и том же N- или C-конце, тогда как в других случаях эти тэги могут быть расположены на каждом конце.

[00286] В некоторых вариантах осуществления, белковые тэги согласно данному изобретению включают в себя, без ограничения, любые из тех, которые описаны в Таблице 8 совместно рассматриваемой и находящейся в совместном владении предварительной заявки на патент США № 62/320864, поданной 4/11/2016, или в предварительной заявке США № 62/466596, поданной 3 марта 2017 года, и международной публикации WO2017/180587, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Нацеливающие пептиды

[00287] В некоторых вариантах осуществления, эффекторный модуль согласно изобретению может дополнительно содержать нацеливающий пептид и/или пептид проникновения. Небольшие нацеливающие пептиды и/или пептиды проникновения, которые селективно распознают маркеры клеточной поверхности (например, рецепторы, трансмембранные белки и молекулы внеклеточного матрикса), могут быть использованы для нацеливания эффекторного модуля на желаемые органы, ткани или клетки. Короткие пептиды (5-50 аминокислотных остатков), синтезированные *in vitro* и встречающиеся в природе пептиды или их аналоги, варианты и производные, могут быть включены в эффекторный модуль для направления эффекторного модуля к нужным органам, тканям и клеткам и/или в субклеточные области внутри клеток.

[00288] В некоторых вариантах осуществления, нацеливающая последовательность и/или пептид проникновения может быть включен в эффекторный модуль для направления эффекторного модуля к органу-мишени или ткани, или клетке (например, раковой клетке). В других вариантах осуществления, нацеливающий пептид и/или пептид проникновения может направлять эффекторный модуль в конкретную субклеточную область внутри клетки.

[00289] Нацеливающий пептид имеет любое количество аминокислот от около 6 до около 30 включительно. Пептид может иметь 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот. В целом, как правило, нацеливающий пептид может иметь 25 или меньше аминокислот, например, 20 или меньше, например, 15 или меньше.

[00290] Типичные нацеливающие пептиды могут включать в себя, но без ограничения, те, которые раскрыты в данной области техники, например, в патентах США № 9206231; № 9110059; № 8706219; и №

8772449; и в публикациях заявок США № 2016089447; № 2016060296; № 2016060314; № 2016060312; № 2016060311; № 2016009772; № 2016002613; № 2015314011 и № 2015166621; и в публикациях международных заявок № WO2015179691 и № WO2015183044; содержания которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00291] В некоторых вариантах осуществления, нацеливающие пептиды согласно данному изобретению включают в себя, без ограничения, любые из тех, которые описаны в Таблице 9 совместно рассматриваемой и находящейся в совместном владении предварительной заявки на патент США № 62/320864, поданной 4/11/2016, или в предварительной заявке США № 62/466596, поданной 3 марта 2017 года, и международной публикации WO2017/180587, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Линкеры

[00292] В некоторых вариантах осуществления, эффекторный модуль согласно изобретению может дополнительно содержать линкерную последовательность. Линкерная область служит главным образом в качестве спейсера между двумя или большим количеством полипептидов внутри эффекторного модуля. Термин «линкер» или «спейсер», как используется в данном документе, относится к молекуле или группе молекул, которые соединяют две молекулы или две части молекулы, такие как два домена рекомбинантного белка.

[00293] В некоторых вариантах осуществления, «линкер» (L) или «линкерный домен», или «линкерная область», или «линкерный модуль», или «пептидный линкер», как используется в данном документе, относится к олиго- или полипептидной области, содержащей от около 1 до 100 аминокислот, которая соединяет вместе любые домены/области эффекторного модуля (также обозначен как пептидный линкер). Пептидный линкер может иметь длину 1-40 аминокислот или длину 2-30 аминокислот, длину 20-80 аминокислот или длину 50-100 аминокислот. Длина линкера также может быть оптимизирована в зависимости от типа используемого полезного груза и исходя из кристаллической структуры полезного груза. В некоторых случаях, может быть предпочтительно выбрана более короткая длина линкера. В некоторых аспектах, пептидный линкер состоит из аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями, предпочтительно от 1 до 20 аминокислот, соединенных пептидными связями, причем аминокислоты выбраны из 20 встречающихся в природе аминокислот: глицина (G), аланина (A), валина (V), лейцина (L), изолейцина (I), серина (S), цистеина (C), треонина (T), метионина (M), пролина (P), фенилаланина (F), тирозина (Y), триптофана (W), гистидина (H), лизина (K), аргинина (R), аспартата (D), глутаминовой кислоты (E), аспарагина (N) и глутамина (Q). Как понятно специалистам в данной области техники, одна или большее количество из этих аминокислот могут быть гликозилированы. В некоторых аспектах, аминокислоты пептидного линкера могут быть выбраны из аланина (A), глицина (G), пролина (P), аспарагина (R), серина (S), глутамина (Q) и лизина (K).

[00294] В одном примере, искусственно сконструированный пептидный линкер предпочтительно может состоять из полимера из гибких остатков, таких как глицин (G) и серин (S), так что смежные белковые домены могут свободно перемещаться относительно друг друга. Могут использоваться более длинные линкеры, когда желательно обеспечить, чтобы два соседних домена не мешали друг другу. Выбор конкретной линкерной последовательности может быть связан с тем, влияет ли она на биологическую активность, стабильность, сворачивание, нацеливание и/или фармакокинетические характеристики гибридной конструкции. Примеры пептидных линкеров включают в себя, но не ограничиваются лишь

[00296] Линкерная последовательность может представлять собой природный линкер, полученный из мультидоменного белка. Природный линкер представляет собой короткую пептидную последовательность, которая разделяет два разных домена или мотива внутри белка.

[00297] В некоторых аспектах, линкеры могут быть гибкими или жесткими. В других аспектах, линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. Как применяется в данном документе, термины «расщепляемый линкерный домен или область» или «расщепляемый пептидный линкер» используются взаимозаменяемо. В некоторых вариантах осуществления, линкерная последовательность может быть расщеплена ферментативно и/или химически. Примеры ферментов (например, протеиназы/пептидазы), применяемых для расщепления пептидного линкера, включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: протеиназу Arg-C, эндопептидазу Asp-N, химотрипсин, клострипаин, энтерокиназу, фактор Ха, глутамилэндопептидазу, гранзим В, протеиназу I *Achromobacter*, пепсин, пролин-эндопептидазу, протеиназу К, стафилококковую пептидазу I, термолизин, тромбин, трипсин и члены семейства протеолитических ферментов каспаз (например, каспазы 1-10). Химически чувствительные сайты расщепления также могут быть включены в линкерную последовательность. Примеры реагентов химического расщепления включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: цианогенбромид, который расщепляет остатки метионина; N-хлорсукцинимид, йодбензойная кислота или BNPS-скатол (2-(2-нитрофенилсульфенил)-3-метилиндол).

который расщепляет остатки триптофана; разбавленные кислоты, которые расщепляют по аспартил-пролильным связям; и е расщепляемые распознаваемые сайты аспарагиновой кислоты-пролина (т. е. расщепляемый пептидный линкер, содержащий один или большее количество дипептидных фрагментов D-R). Гибридный модуль может содержать несколько областей, кодирующих представляющие интерес пептиды, разделенные одним или большим количеством расщепляемых пептидных линкеров.

[00298] В других вариантах осуществления, расщепляемый линкер может представлять собой «саморасщепляющийся» линкерный пептид, такой как линкеры 2A (например, T2A), линкеры, подобные 2A, или их функциональные эквиваленты и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, линкеры включают в себя пикорнавирусный 2A-подобный линкер, последовательности CHYSEL свиного тешовируса (P2A), вирус *Thosea asigna* (T2A), или их комбинации, варианты и функциональные эквиваленты. Другие линкеры будут очевидны для специалистов в данной области техники и могут использоваться в связи с альтернативными вариантами осуществления изобретения. В некоторых вариантах осуществления, биоконтур согласно данному изобретению могут содержать 2A пептиды. Пептид 2A представляет собой последовательность из около 20 аминокислотных остатков из вируса, который распознается протеазой (2A пептидазы), эндогенной для клетки. Пептид 2A был идентифицирован среди пикорнавирусов, типичным примером которых является вирус ящура (Robertson BH, et. al., J Virol 1985, 54:651-660). 2A-подобные последовательности были также обнаружены в *Picornaviridae*-подобном вирусе А лошадиного ринита, а также в неродственных вирусах, таких как свиной тешовирус-1 и вирус насекомого *Thosea asigna* (TaV). В таких вирусах множество белков происходят из большого полипротеина, кодируемого открытой рамкой считывания. Пептид 2A опосредует ко-трансляционное расщепление данного полипротеина в единственном сайте, который образует соединение между доменами вирусного капсида и полипротеина репликации. Последовательности 2A содержат консенсусный мотив D-V/I-E-X-N-P-G-P (SEQ ID NO: 1235). Предполагается, что данные последовательности действуют ко-трансляционно, предотвращая формирование нормальной пептидной связи между глицином и последним пролином, что приводит к пропуску рибосомой следующего кодона (Donnelly ML et al. (2001). J Gen Virol, 82:1013-1025). После расщепления короткий пептид остается слитым с С-концом белка выше сайта расщепления, тогда как пролин добавляется к N-концу белка ниже сайта расщепления. Из 2A пептидов, идентифицированных на сегодняшний день, четыре широко используются, а именно FMDV 2A (сокращенно обозначенный в данном документе как F2A); вирус А лошадиного ринита (ERAV) 2A (E2A); свиной тешовирус-1 2A (P2A) и вирус *Thosea asigna* 2A (T2A). В некоторых вариантах осуществления, пептидные последовательности 2A, используемые в данном изобретении, выбраны из SEQ ID NO: 8-11 международной публикации патента WO2010042490, содержание которой включено посредством ссылки в полном объеме.

[00299] В качестве неограничивающего примера расщепляемый пептид P2A может представлять собой GATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 925; кодируется SEQ ID NO: 926).

[00300] Линкеры согласно данному изобретению также могут быть непептидными линкерами. Например, могут применяться алкильные линкеры, такие как $\text{—NH—(CH}_2\text{)}_a\text{—C(O)—}$, причем $a=2\text{--}20$. Данные алкильные линкеры могут быть дополнительно замещены любой не стерически свободной группой, такой как низший алкил (например, $\text{C}_1\text{--C}_6$), низший ацил, галоген (например, Cl, Br), CN, NH_2 , фенил и так далее.

[00301] В некоторых аспектах, линкер может представлять собой искусственный линкер из патентов США № 4946778; № 5525491; № 5856456; и международной публикации патента № WO2012/083424; содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00302] В некоторых вариантах осуществления, линкеры согласно данному изобретению включают в себя, без ограничения, любые из тех, которые описаны в Таблице 11 совместно рассматриваемой и находящейся в совместном владении предварительной заявки на патент США 62/320864, поданной 4/11/2016, или в предварительной заявке США № 62/466596, поданной 3 марта 2017 года, и международной публикации WO2017/180587, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00303] В одном варианте осуществления, линкер может представлять собой спейсерную область из одного или большего количества нуклеотидов. Неограничивающими примерами спейсеров являются TCTAGATAATACGACTCACTAGAGATCC (SEQ ID NO: 927), TATGGCCACAACCATG (SEQ ID NO: 928), AATCTAGATAATACGACTCACTAGAGATCC (SEQ ID NO: 929), GCTTGGCCACAACCCACAAGGAGACGACCTTCC (SEQ ID NO: 1000), TCGCGAATG, или TCGCGA.

[00304] В одном варианте осуществления, линкер может представлять собой сайт BamHI. В качестве неограничивающего примера сайт BamHI имеет аминокислотную последовательность GS и/или ДНК-последовательность GGATCC.

Встроенные стимулы, сигналы и другие регуляторные элементы

[00305] В некоторых вариантах осуществления, эффекторный модуль согласно данному изобретению может дополнительно содержать одну или большее количество микроРНК, сайтов связывания микроРНК, промоторов и настраиваемых элементов. В одном варианте осуществления, микроРНК может быть использована для поддержки создания настраиваемых биоконтуров. Каждый аспект или регулируемая модальность могут привести в эффекторный модуль или биоконтур отдельно настраиваемый элемент. Например, дестабилизирующий домен может изменять сайты расщепления или свойства димеризации или время полужизни полезного груза, а включение одной или большего количества микроРНК или сайтов связывания микроРНК может обеспечить признаки клеточной ненаправленности и транспорта. Следовательно, данное изобретение охватывает биоконтуры, которые являются мультифакторными по своей обоснованности. Такие биоконтуры и эффекторные модули могут быть сконструированы так, чтобы они содержали один, два, три, четыре или большее количество регулируемых элементов.

[00306] В некоторых вариантах осуществления, последовательности микроРНК согласно данному изобретению включают в себя, без ограничения, любые из тех, которые описаны в Таблице 13 совместно рассматриваемой и находящейся в совместном владении предварительной заявки на патент США 62/320864, поданной 4/11/2016, или в предварительной заявке США № 62/466596, поданной 3 марта 2017 года, и международной публикации WO2017/180587, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00307] В некоторых вариантах осуществления, композиции согласно изобретению могут содержать необязательные протеосомные адаптеры. Как применяется в данном документе, термин «протеосомный адаптер» относится к любой нуклеотидной/аминокислотной последовательности, которая направляет прикрепленный полезный груз на деградацию. В некоторых аспектах, адаптеры направляют полезный груз прямо на деградацию, тем самым обходя потребность в реакциях убиквитинирования. Протеосомные адаптеры могут использоваться в комбинации с дестабилизирующими доменами для уменьшения базальной экспрессии полезного груза. Типичные протеосомные адаптеры содержат домен UbL Rad23 или hHR23b, HPV E7, который связывается как с белком-мишенью Rb, так и с субъединицей S4 протеосомы с высокой

аффинностью, что позволяет осуществлять прямое направление к протеосомам, минуя механизм убиквитинирования; белок ганкирин, который связывается с Rb и субъединицей протеасомы S6.

Полинуклеотиды

[00308] Термин «полинуклеотид» или «молекула нуклеиновой кислоты» в самом широком смысле включает в себя любое соединение и/или вещество, которое содержит полимер нуклеотидов, например, соединенных нуклеозидов. Эти полимеры часто называют полинуклеотидами. Иллюстративные нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды согласно изобретению включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: рибонуклеиновые кислоты (РНК), дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), треозные нуклеиновые кислоты (ТНА), гликолевые нуклеиновые кислоты (ГНК), пептидные нуклеиновые кислоты (ПKN), закрытые нуклеиновые кислоты (ЗНК, включая ЗНК, имеющую β -D-рибо конфигурацию, α -ЗНК, имеющую α -L-рибо конфигурацию (диастереомер ЗНК), 2'-амино-ЗНК, имеющую 2'-амино функционализацию, и 2'-амино- α -ЗНК, имеющую 2'-амино функционализацию) или их гибриды.

[00309] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды согласно изобретению могут представлять собой матричную РНК (мРНК) или любую молекулу нуклеиновой кислоты, и могут быть или не быть химически модифицированными. В одном аспекте, молекула нуклеиновой кислоты представляет собой мРНК. Как применяется в данном документе, термин «матричная РНК (мРНК)» относится к любому полинуклеотиду, который кодирует представляющий интерес полипептид, и который способен транслироваться для получения представляющего интерес кодируемого полипептида *in vitro*, *in vivo*, *in situ* или *ex vivo*.

[00310] Традиционно, основные компоненты молекулы мРНК содержат, по меньшей мере, кодирующую область, 5'UTR, 3'UTR, 5'-кэп и поли-А-хвост. Опираясь на эту модульную структуру дикого типа, данное изобретение расширяет область функциональных возможностей традиционных молекул мРНК, предоставляя конструкции полезных грузов, которые поддерживают модульную организацию, но которые содержат одну или большее количество структурных и/или химических модификаций или изменений, которые придают полезные свойства полинуклеотиду, например, продлевают время функционирования. Как применяется в данном документе, «структурный» признак или модификация представляет собой тот, в котором два или больше количество связанных нуклеозидов вставлены, удалены, дублированы, инвертированы или рандомизированы в полинуклеотиде без существенной химической модификации самих нуклеозидов. Поскольку химические связи обязательно будут разорваны и преобразованы для осуществления структурной модификации, структурные модификации имеют химическую природу и, следовательно, являются химическими модификациями. Однако структурные модификации дадут другую последовательность нуклеотидов. Например, полинуклеотид «ATCG» может быть химически модифицирован в «AT-5meC-G». Тот же полинуклеотид может быть структурно модифицирован из «ATCG» в «ATCCCG». Здесь был вставлен динуклеотид «CC», что привело к структурной модификации полинуклеотида.

[00311] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды согласно данному изобретению могут содержать 5'UTR-последовательности, которые играют роль в инициации трансляции. Последовательности 5'UTR могут содержать такие элементы как последовательности Козак, которые, как обычно известно, вовлечены в процесс, с помощью которого рибосома иницирует трансляцию генов, последовательности Козак имеют консенсус XCCR(A/G) CCAUG, причем R представляет собой пурин (аденин или гуанин) тремя основаниями выше стартового кодона (AUG), и X представляет собой любой нуклеотид. В одном

варианте осуществления, последовательность Козак представляет собой ACCGCC. Путем конструирования элементов, которые обычно обнаруживаются в обильно экспрессируемых генах клеток или тканей-мишеней, можно повысить стабильность и продуцирование белка полинуклеотидами согласно изобретению.

[00312] Дополнительно предложены полинуклеотиды, которые могут содержать участок внутренней посадки рибосомы (IRES), который играет важную роль в инициации синтеза белка при отсутствии структуры 5'-кэпа в полинуклеотиде. IRES может действовать как единственный сайт связывания рибосомы или может служить одним из множества сайтов связывания. Полинуклеотиды согласно изобретению, содержащие больше чем один функциональный сайт связывания рибосом, могут кодировать несколько пептидов или полипептидов, которые независимо транслируются рибосомами, что приводит к образованию бицистронных и/или мультицистронных молекул нуклеиновой кислоты.

[00313] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды, кодирующие биоконтур, эффекторный модуль, ЭОС и полезные грузы, такие как иммунотерапевтические агенты, могут содержать от около 30 до около 100000 нуклеотидов (например, от 30 до 50, от 30 до 100, от 30 до 250, от 30 до 500, от 30 до 1000, от 30 до 1500, от 30 до 3000, от 30 до 5000, от 30 до 7000, от 30 до 10000, от 30 до 25 000, от 30 до 50000, от 30 до 70000, от 100 до 250, от 100 до 500, от 100 до 1000, от 100 до 1500, от 100 до 3000, от 100 до 5000, от 100 до 7000, от 100 до 10000, от 100 до 25 000, от 100 до 50000, от 100 до 70 000, от 100 до 100000, от 500 до 1000, от 500 до 1500, от 500 до 2000, от 500 до 3000, от 500 до 5000, от 500 до 7 000, от 500 до 10000, от 500 до 25 000, от 500 до 50000, от 500 до 70000, от 500 до 100000, от 1000 до 1500, от 1000 до 2000, от 1000 до 3000, от 1000 до 5000, от 1000 до 7000, от 1000 до 10000, от 1000 до 25000, от 1000 до 50000, от 1000 до 70000, от 1000 до 100000, от 1500 до 3000, от 1500 до 5000, от 1500 до 7000, от 1500 до 10000, от 1500 до 25000, от 1500 до 50000, от 1500 до 70000, от 1500 до 100000, от 2000 до 3000, от 2000 до 5000, от 2000 до 7000, от 2000 до 10000, от 2000 до 25000, от 2000 до 50000, от 2000 до 70000 и от 2000 до 100000 нуклеотидов). В некоторых аспектах, полинуклеотиды согласно изобретению могут содержать больше чем 10000 нуклеотидов.

[00314] Области полинуклеотидов, которые кодируют определенные элементы, такие как сайты расщепления, линкеры, сигналы переноса, тэги или другие элементы, могут независимо иметь длину, которая варьирует от 10 до 1000 нуклеотидов (например, больше чем 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800 и 900 нуклеотидов или, по меньшей мере, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800 900 и 1000 нуклеотидов).

[00315] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды согласно данному изобретению могут дополнительно содержать встроенные регуляторные фрагменты, такие как сайты связывания микроРНК в 3'UTR молекулы нуклеиновой кислоты, которые, когда связываются с молекулами микроРНК, подавляют экспрессию генов либо путем снижения стабильности молекулы нуклеиновой кислоты, либо путем ингибирования трансляции. Наоборот, применительно к полинуклеотидам согласно данному изобретению сайты связывания микроРНК могут быть сконструированы из (то есть удалены из) последовательностей, в которых они встречаются в природе, для увеличения экспрессии белка в специфических тканях. Например, сайты связывания miR-142 и miR-146 могут быть удалены для улучшения экспрессии белка в иммунных клетках. В некоторых вариантах осуществления, любой из кодируемых полезных грузов может регулироваться с помощью ЭОС и затем комбинироваться с одной или большим количеством регуляторных

последовательностей, чтобы создавать дво- или мульти-регулируемый эффекторный модуль или биоконтурную систему.

[00316] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды согласно данному изобретению могут кодировать фрагменты, варианты, производные полипептидов согласно изобретению. В некоторых аспектах, вариант последовательности может сохранять одинаковую или сходную активность. В альтернативном варианте, вариант может иметь измененную активность (например, повышенную или пониженную) относительно начальной последовательности. В целом, как правило, варианты конкретного полинуклеотида или полипептида согласно изобретению будут иметь, по меньшей мере, около 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, но меньше чем 100% идентичности последовательности с этим конкретным эталонным полинуклеотидом или полипептидом, как определено с помощью программ выравнивания последовательностей и параметров, описанных в данном документе и известных специалистам в данной области техники. К таким инструментам выравнивания относятся инструменты BLAST (Stephen et al., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.*, 1997, 25:3389-3402.)

[00317] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды согласно данному изобретению могут быть модифицированы. Как применяется в данном документе, термин «модифицированный» или, при необходимости, «модификация» относится к химической модификации в отношении нуклеотидов А, G, U (Т в ДНК) или С. Модификации могут быть по основанию нуклеозида и/или сахарной части нуклеозидов, которые содержит полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, множественные модификации вносят в модифицированную нуклеиновую кислоту, или в один или большее количество отдельных нуклеозидов или нуклеотидов. Например, модификации нуклеозида могут включать в себя одну или большее количество модификаций основы нуклеозида и сахара. Модификации полинуклеотидов согласно данному изобретению могут включать себя любые из тех, которые описаны, например, в международной публикации № WO2013052523, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00318] Как описано в данном документе, «нуклеозид» определяется как соединение, содержащее молекулу сахара (например, пентозу или рибозу) или ее производное в комбинации с органическим основанием (например, пурином или пиримидином) или его производным (также упоминаемым в данном документе как «нуклеос основание»). Как описано в данном документе, «нуклеотид» определяется как нуклеозид, содержащий фосфатную группу.

[00319] В некоторых вариантах осуществления, модификация может находиться в межнуклеозидной связи (например, фосфатном остове). В данном документе, в контексте полинуклеотидного остова фразы «фосфат» и «фосфодиэфир» используются взаимозаменяемо. Основные фосфатные группы могут быть модифицированы путем замены одного или большего количества атомов кислорода другим заместителем. Дополнительно, модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут включать полную замену немодифицированного фосфатного фрагмента другим межнуклеозидным соединением. Примеры модифицированных фосфатных групп включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: фосфоротиоат, фосфороселенаты, боранофосфаты, сложные эфиры боранофосфата, гидрофосфонаты, фосфорамидаты, фосфородиамидааты, алкильные или арильные фосфонаты, и фосфотриэфиры. Фосфородитиоаты имеют замещенные серой оба несвязывающихся кислорода. Фосфатный линкер также может быть модифицирован заменой на азот связывающего кислорода (мостиковые фосфорамидаты), серой (мостиковые

фосфоротиоаты) и углеродом (мостиковые метиленфосфонаты). Другие модификации, которые могут быть использованы, описаны, например, в международной заявке № WO2013052523, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00320] Химические модификации и/или замещение нуклеотидов или нуклеоснований полинуклеотидов согласно изобретению, которые полезны в данном изобретении, включают в себя любые модифицированные заместители, известные в данной области техники, например, ($\pm$)-1-(2-гидроксипропил)псевдоуридин ТР, (2R)-1-(2-гидроксипропил)псевдоуридин ТР, 1-(4-метоксифенил)псевдо-UTP, 2'-О-диметиладенозин, 1,2'-О-диметилгуанозин, 1,2'-О-диметилинозин, 1-гексил-псевдо-UTP, 1-гомоалилпсевдоуридин ТР, 1-гидроксиметидпсевдоуридин ТР, 1-изо-пропил-псевдо-UTP, 1-Ме-2-тио-псевдо-UTP, 1-Ме-4-тио-псевдо-UTP, 1-Ме-альфа-тио-псевдо-UTP, 1-Ме-GTP, 2'-амино-2'-дезоксип-АТР, 2'-амино-2'-дезоксип-СТР, 2'-амино-2'-дезоксип-GTP, 2'-амино-2'-дезоксип-UTP, 2'-азидо-2'-дезоксип-АТР, тубесидин, в условиях модифицированного гидроксифибутозина, уридин-5-оксиуксусная кислота, метиловый эфир уридин-5-оксиуксусной кислоты, выбутозин, вайозин, ксантин, ксантозин-5'-ТР, ксиладенозин, зебуларин, α -тио-аденозин, α -тио-цитидин, α -тио-гуанозин и/или α -тиоуридин.

[00321] Полинуклеотиды согласно данному изобретению могут содержать одну или большее количество модификаций, описанных в данном документе. Различные модификации сахара, модификации основания, модификации нуклеотидов и/или межнуклеозидных соединений (например, структуры остова) могут быть в различных позициях в полинуклеотиде согласно изобретению. Специалист в данной области техники поймет, что аналоги нуклеотидов или другие модификации могут быть расположены в любой позиции(циях) полинуклеотида, так что функция полинуклеотида существенно не снижается. Модификация также может быть 5' или 3' концевой модификацией. Полинуклеотид может содержать от около 1% до около 100% модифицированных нуклеотидов (либо по отношению к общему содержанию нуклеотидов, либо по отношению к одному или большему количеству типов нуклеотидов, т. е. любому одному или большему количеству из А, G, U или C) или любой промежуточный процент (например, от 1% до 20%, от 1% до 25%, от 1% до 50%, от 1% до 60%, от 1% до 70%, от 1% до 80%, от 1% до 90%, от 1% до 95%, от 10% до 20%, от 10% до 25%, от 10% до 50%, от 10% до 60%, от 10% до 70%, от 10% до 80%, от 10% до 90%, от 10% до 95%, от 10% до 100%, от 20% до 25%, от 20% до 50%, от 20% до 60%, от 20% до 70%, от 20% до 80%, от 20% до 90%, от 20% до 95%, от 20% до 100%, от 50% до 60%, от 50% до 70%, от 50% до 80%, от 50% до 90%, от 50% до 95%, от 50% до 100%, от 70% до 80%, от 70% до 90%, от 70% до 95%, от 70% до 100%, от 80% до 90%, от 80% до 95%, от 80% до 100%, от 90% до 95%, от 90% до 100% и от 95% до 100%).

[00322] В некоторых вариантах осуществления, один или большее количество кодонов полинуклеотидов согласно данному изобретению могут быть заменены другими кодонами, кодирующими нативную аминокислотную последовательность для настройки экспрессии ЭОС, посредством процесса, называемого отбором кодонов. Так как пулы мРНК-кодонов и анти-кодонов тРНК имеют тенденцию варьировать среди организмов, типов клеток, субклеточных элементов и во времени, выбор кодонов, описанный в данном документе, является пространственно-временным (ПВ) отбором кодонов.

[00323] В некоторых вариантах осуществления изобретения, некоторые полинуклеотидные элементы могут быть оптимизированы по кодонам. Оптимизация кодонов относится к процессу модификации последовательности нуклеиновой кислоты для усиления экспрессии в клетке-хозяине путем замены по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50 или большего количества кодонов нативной последовательности на кодоны, которые наиболее часто используются в генах данной клетки-хозяина при сохранении нативной

аминокислотной последовательности. Использование кодонов может быть измерено с использованием индекса адаптации кодонов (ИАК), который измеряет отклонение кодирующей полинуклеотидной последовательности от референтного набора генов. Таблицы использования кодонов доступны в Базе данных использования кодонов (Codon Usage Database)(<http://www.kazusa.or.jp/codon/>), а ИАК можно рассчитать с помощью программы EMBOSS CAI (<http://emboss.sourceforge.net/>). Способы оптимизации кодонов известны в данной области техники и могут быть полезны в усилиях по достижению одной или большего количества из нескольких целей. Эти цели включают в себя подгонку частот кодонов в организмах-мишенях и организмах-хозяевах для обеспечения надлежащего сворачивания, смещение содержания нуклеотидов для изменения стабильности или уменьшения вторичных структур, минимизацию кодонов tandemных повторов или гомонуклеотидных трактов, которые могут нарушать конструирование или экспрессию генов, адаптацию регуляторных областей транскрипции и трансляции, добавление или удаление сигнальных последовательностей белка, удаление/добавление пост-трансляционных сайтов модификации в кодируемом белке (например, сайтов гликозилирования), добавление, удаление или перетасовывание белковых доменов, добавление или удаление сайтов рестрикции, модификацию сайтов связывания рибосом и сайтов деградации, чтобы скорректировать скорости трансляции чтобы позволить различным доменам белка правильно свертываться, или уменьшить или устранить проблемные вторичные структуры в пределах полинуклеотида. Инструменты, алгоритмы и сервисы для оптимизации кодонов известны в данной области техники, и неограничивающие примеры включают в себя сервисы GeneArt (Life Technologies), DNA2.0 (Menlo Park CA), OptimumGene (GenScript, Пискатауэй, Нью-Джерси), алгоритмы, такие как, но не ограничиваясь, DNAWorks v3.2.3 и/или запатентованные способы. В одном варианте осуществления, полинуклеотидная последовательность или ее часть оптимизирована по кодонам с использованием алгоритмов оптимизации. Варианты кодонов для каждой аминокислоты хорошо известны в данной области техники, как и таблицы различных видов для оптимизации экспрессии в данном конкретном виде.

[00324] В некоторых вариантах осуществления изобретения, некоторые полинуклеотидные элементы могут быть оптимизированы по кодонам. Например, предпочтительная область для оптимизации кодонов может находиться выше (5') или ниже (3') области, которая кодирует полипептид. Данные области могут быть включены в полинуклеотид до и/или после оптимизации кодонов области, кодирующей полезный груз, или открытой рамки считывания (ORF).

[00325] После оптимизации (при желании) полинуклеотидные компоненты реконструируют и превращают в вектор, такой как, но не ограничиваясь лишь этими: плазмиды, вирусы, космиды и искусственные хромосомы.

[00326] Выбор пространственно-временного кодона может влиять на экспрессию полинуклеотидов согласно изобретению, поскольку состав кодонов определяет скорость трансляции мРНК видов и ее стабильность. Например, если антикодоны тРНК по отношению к оптимизированным кодонам более многочисленны, то, следовательно, может быть усилена трансляция. Напротив, если антикодонов тРНК по отношению к распространенным кодонам меньше, то, следовательно, трансляция может происходить с более медленной скоростью. Presnyak et al. показали, что стабильность мРНК видов зависит от содержания кодонов, а более высокая стабильность и, следовательно, более высокая экспрессия белка могут быть достигнуты с использованием оптимизированных кодонов (Presnyak et al. (2015) Cell 160, 1111–1124; содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Таким образом,

в некоторых вариантах осуществления, ПВ выбор кодонов может включать в себя выбор оптимизированных кодонов для усиления экспрессии ЭОС, эффекторных модулей и биоконтуров согласно изобретению. В других вариантах осуществления, пространственно-временной выбор кодонов может включать в себя выбор кодонов, которые реже используются в генах клетки-хозяина для снижения экспрессии композиций согласно изобретению. Отношение оптимизированных кодонов к кодонам, которые реже используются в генах клетки-хозяина, также можно варьировать для настройки экспрессии.

[00327] В некоторых вариантах осуществления, определенные области полинуклеотида могут быть предпочтительными для отбора кодонов. Например, предпочтительной областью для отбора кодонов может быть область выше (5') или ниже (3') области которая кодирует полипептид. Эти области могут быть включены в полинуклеотид до и/или после выбора кодонов области, кодирующей полезный груз, или открытой рамки считывания (ORF).

[00328] Стоп-кодон полинуклеотидов согласно данному изобретению может быть модифицирован для включения последовательностей и мотивов для изменения уровней экспрессии ЭОС, полезных грузов и эффекторных модулей согласно данному изобретению. Такие последовательности могут быть включены для индукции повторного считывания стоп-кодона, причем стоп-кодон может обозначать аминокислоты, например, селеноцистеин или пирролизин. В других случаях, стоп-кодоны могут быть вообще пропущены, чтобы возобновить трансляцию через альтернативную открытую рамку считывания. Прочитанный стоп-кодон может быть использован для настройки экспрессии компонентов эффекторных модулей с определенной скоростью (например, как диктуется контекстом стоп-кодона). Примеры предпочтительных мотивов стоп-кодонов включают в себя UGAN, UAAN и UAGN, где N представляет собой либо C, либо U. Модификации и манипуляции с полинуклеотидами могут быть выполнены способами, известными в данной области техники, такими как, но не ограничиваясь лишь этими: сайт-направленный мутагенез и рекомбинантная технология. Полученные модифицированные молекулы могут затем быть проверены на активность с использованием анализов *in vitro* или *in vivo*, таких как описанные в данном документе, или любого другого подходящего скринингового анализа, известного в данной области техники.

[00329] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды согласно изобретению могут содержать две или большее количество последовательностей эффекторных модулей, или две или большее количество представляющих интерес последовательностей полезного груза, которые представлены в виде схемы, такой как ABABAB или AABBAABBAABV или ABCABCABC, или их вариантов, повторяемые один раз, два раза или больше чем три раза. В этих схемах каждая буква A, B или C представляет собой отдельный компонент эффекторного модуля.

[00330] В еще одном варианте осуществления, полинуклеотиды согласно изобретению могут содержать две или большее количество последовательностей компонентов эффекторного модуля, причем каждый компонент имеет одну или большее количество последовательностей ЭОС (последовательностей ДД) или две или большее количество последовательностей полезного груза. В качестве неограничивающего примера, последовательности могут иметь вид, такой как ABABAB или AABBAABBAABV или ABCABCABC, или их варианты, повторяемые один, два или больше чем три раза в каждой из областей. В качестве другого неограничивающего примера, последовательности могут быть в виде схемы, такой как ABABAB или AABBAABBAABV или ABCABCABC, или их вариантов, повторяемые один, два или больше чем три раза по всему полинуклеотиду. В этих схемах, каждая буква A, B или C представляет различную последовательность или компонент.

[00331] Согласно данному изобретению полинуклеотиды, кодирующие различные биоконтуры, эффекторные модули, ЭОС и конструкции полезного груза, могут быть соединены вместе через 3'-конец с использованием нуклеотидов, которые модифицированы на 3'-конце. Химическое конъюгирование может быть использовано для контроля стехиометрии доставки в клетки. Полинуклеотиды могут быть спроектированы для конъюгирования с другими полинуклеотидами, красителями, интеркалирующими агентами (например, акридинами), сшивающими агентами (например, псораленом, митомицином С), порфиринами (ТРРС4, теафирин, сапфирин), полициклическими ароматическими углеводородами (например, феназином, дигидрофеназином) искусственными эндонуклеазами (например, ЭДТА), алкилирующими агентами, фосфо, аминок, меркапто, ПЭГ (например, ПЭГ-40К), MPEG, (MPEG)₂, полиамино, алкильными группами, замещенным алкилом, радиоактивными метками, ферментами, гаптенами (например, биотином), облегчающими транспорт/абсорбцию агентами (например, аспирином, витамином Е, фолиевой кислотой), синтетическими рибонуклеазами, белками, например, гликопротеинами, или пептидами, например молекулами, имеющими специфическое сродство к ко-лиганду, или антителами, например антителом, которое связывается с указанным типом клеток, таким как раковая клетка, эндотелиальная клетка или костная клетка, гормонами и рецепторами гормонов, непептидными соединениями, такими как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы или лекарственные вещества. В качестве неограничивающих примеров, они могут представлять собой конъюгаты с другими иммунными конъюгатами.

[00332] В некоторых вариантах осуществления, композиции полинуклеотидов согласно изобретению могут быть получены путем объединения различных компонентов эффекторных модулей с использованием метода сборки Гибсона. Реакция сборки Гибсона состоит из трех изотермических реакций, каждая из которых зависит от различной ферментативной активности, включая: 5'-экзонуклеазу, которая создает длинные выступающие концы, полимеразу, которая заполняет пробелы в отоженных одноцепочечных областях, и ДНК-лигазу, которая закрывает ники отоженных и заполненных пробелов. Полимеразные цепные реакции проводят перед сборкой Гибсона, которую можно использовать для получения продуктов ПЦР с перекрывающейся последовательностью. Эти способы могут повторяться последовательно, чтобы собирать все большие и большие молекулы. Например, способ может включать в себя повторение способа, описанного выше, для соединения второго набора из двух или большего количества молекул ДНК, представляющих интерес друг с другом, и затем повторение способа снова для соединения интересующего первого и второго набора молекул ДНК и т.д. На любом этапе во время этих многочисленных циклов сборки, собранная ДНК может быть амплифицирована путем ее трансформации в подходящий микроорганизм, или она может быть амплифицирована *in vitro* (например, с помощью ПЦР).

[00333] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды согласно данному изобретению могут кодировать гибридный полипептид, содержащий дестабилизирующий домен (ДД) и, по меньшей мере, один иммунотерапевтический агент, описанный в данном документе. Домен ДД может представлять собой мутант FKBP, кодируемый нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 684-686, 688-691, 987-989, 994, 1013 и/или 1028, мутант есDHFR, кодируемый нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 687, 692, 772, 798, 814-815, 988, 991 и/или 993, мутант hDHFR, кодируемый нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 693-700, 773, 852-857 и/или 934-980, и/или 995-998.

[00334] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды согласно изобретению могут кодировать эффекторные модули, содержащие XAP CD19 в качестве полезного груза, содержащего нуклеотидную

последовательность SEQ ID NO: 701-715 и/или 1019-1042, или ИЛ12 в качестве полезного груза, содержащего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 774-782, или ИЛ15 в качестве полезного груза, содержащего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 749, 799-800 и/или 1055-1056, или гибридный полипептид ИЛ15/ИЛ15Ra в качестве полезного груза, содержащего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 816-821, 1086-1089, 1091-1095, 1098-1111, 1120 и/или 1123.

Клетки

[00335] Согласно данному изобретению предложены клетки, генетически модифицированные для экспрессии по меньшей мере одного биоконтра, ЭОС (например, ДД), эффекторного модуля и иммунотерапевтического агента согласно изобретению. Клетки согласно изобретению могут включать в себя, без ограничения, иммунные клетки, стволовые клетки и опухолевые клетки. В некоторых вариантах осуществления, иммунные клетки представляют собой иммунные эффекторные клетки, включая, но не ограничиваясь лишь этими: Т-лимфоциты, такие как CD8⁺ Т-лимфоциты и CD4⁺ Т-лимфоциты (например, клетки Th1, Th2, Th17, Foxp3⁺), Т-лимфоциты памяти, такие как стволовые Т-лимфоциты памяти, центральные Т-лимфоциты памяти и эффекторные Т-лимфоциты памяти, окончательно дифференцированные эффекторные Т-лимфоциты, естественные киллеры (NK), NK Т-лимфоциты, инфильтрирующие в опухоль лимфоциты (TIL), цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), регуляторные Т-лимфоциты (Трег) и дендритные клетки (ДК), другие иммунные клетки, которые могут проявлять эффекторную функцию, или их смесь. Т-лимфоциты могут представлять собой Т $\alpha\beta$ -лимфоциты и Т $\gamma\delta$ -лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления, стволовые клетки могут происходить из эмбриональных стволовых клеток человека, мезенхимальных стволовых клеток и нервных стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления, Т-лимфоциты могут быть дефектными по эндогенным Т-клеточным рецепторам (смотрите патенты США № 9273283; № 9181527; и № 9028812; содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

[00336] В некоторых вариантах осуществления, клетки согласно изобретению могут быть аутологичными, аллогенными, сингенными или ксеногенными по отношению к конкретному отдельному субъекту.

[00337] В некоторых вариантах осуществления, клетки согласно изобретению могут представлять собой клетки млекопитающих, в частности клетки человека. Клетки согласно изобретению могут быть первичными клетками или immortalized клеточными линиями.

[00338] В некоторых вариантах осуществления, клетки согласно изобретению могут включать в себя факторы размножения в качестве полезного груза для запуска пролиферации и размножения клеток. Иллюстративные полезные грузы включают в себя RAS, такие как KRAS, NRAS, RRAS, RRAS2, MRAS, ERAS и HRAS, DIRAS, такие как DIRAS1, DIRAS2 и DIRAS3, NKIRAS, такие как NKIRAS1, и NKIRAS2, RAL, такие как RALA, и RALB, RAP, такие как RAP1A, RAP1B, RAP2A, RAP2B и RAP2C, RASD, такие как RASD1, и RASD2, RASL, такие как RASL10A, RASL10B, RASL11A, RASL11B и RASL12, REM, такие как REM1 и REM2, GEM, RERG, RERGL и RRAD.

[00339] Сконструированные иммунные клетки могут быть получены путем трансдукции клеточных композиций полипептидом биоконтра, эффекторного модуля, ЭОС и/или полезного груза (т. е. иммунотерапевтическим агентом) или полинуклеотидом, кодирующим указанный полипептид, или вектором, содержащим указанный полинуклеотид. Вектор может представлять собой вирусный вектор, такой как лентивирусный вектор, гамма-ретровирусный вектор, рекомбинантный AAV, аденовирусный

вектор и вектор на основе онколитического вируса. В других аспектах, также могут быть использованы невирусные векторы, например, наночастицы и липосомы. В некоторых вариантах осуществления, иммунные клетки согласно изобретению являются генетически модифицированными для экспрессии по меньшей мере одного иммунотерапевтического агента согласно изобретению, который можно регулировать с помощью стимула. В некоторых примерах, в клетку вводят два, три или большее количество иммунотерапевтических агентов, встроенных в тот же биоконтур и эффекторный модуль. В других примерах, в клетку могут быть введены два, три или большее количество биоконтуров, эффекторных модулей, каждый из которых содержит иммунотерапевтический агент.

[00340] В некоторых вариантах осуществления, иммунные клетки согласно изобретению могут быть Т-лимфоцитами, модифицированными для экспрессии антиген-специфического рецептора Т-лимфоцитов (ТКР) или антиген-специфического химерного антигенного рецептора (ХАР), описанного в данном документе (известные как Т-лимфоциты ХАР). Соответственно, в Т-лимфоцит вводят по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий систему ХАР (или ТКР), описанную в данном документе, или вектор, содержащий полинуклеотид. Т-лимфоцит, экспрессирующий ХАР или ТКР, связывается со специфическим антигеном через внеклеточный нацеливающий фрагмент ХАР или ТКР, тем самым сигнал через внутриклеточный сигнальный домен(ы) передается в Т-лимфоцит, и в результате этого активируется Т-лимфоцит. Активированный Т-лимфоцит ХАР изменяет свое поведение, включая высвобождение цитотоксического цитокина (например, фактора некроза опухоли, лимфотоксина и т. д.), повышение скорости пролиферации клеток, изменение молекулы клеточной поверхности или тому подобное. Такие изменения вызывают разрушение клетки-мишени, экспрессирующей антиген, распознаваемый ХАР или ТКР. Кроме того, высвобождение цитокина или изменение в молекуле клеточной поверхности стимулирует другие иммунные клетки, например, В-лимфоцит, дендритную клетку, NK-клетку и макрофаг.

[00341] ХАР, введенный в Т-лимфоцит, может представлять собой ХАР первого поколения, содержащий только внутриклеточный сигнальный домен из ТКР CD3-дзета, или ХАР второго поколения, содержащий внутриклеточный сигнальный домен из ТКР CD3-дзета и ко-стимулирующий сигнальный домен, или ХАР третьего поколения, содержащий внутриклеточный сигнальный домен из ТКР CD3-дзета и два или большее количество костимулирующих сигнальных доменов, или систему с разделенным ХАР, или систему с включаемым/выключаемым ХАР. В одном примере, экспрессию ХАР или ТКР контролируют с помощью дестабилизирующего домена (ДД), такого как мутантный hDHFR, в эффекторном модуле согласно изобретению. Наличие или отсутствие hDHFR-связывающего лиганда, такого как TMP, используется для настройки экспрессии ХАР или ТКР в трансдуцированных Т-лимфоцитах или NK-клетках.

[00342] В некоторых вариантах осуществления, Т-лимфоциты ХАР согласно изобретению могут быть дополнительно модифицированы для экспрессии еще одного, двух, трех или большего количества иммунотерапевтических агентов. Иммунотерапевтические агенты могут представлять собой другой ХАР или ТКР, специфичный к другой молекуле-мишени; цитокин, такой как ИЛ2, ИЛ12, ИЛ15 и ИЛ18, или рецептор цитокина, такой как ИЛ15Ra; химерный переключатель рецептор, который преобразует ингибирующий сигнал в стимулирующий сигнал; рецептор хоминга, который направляет адаптивно перенесенные клетки в сайт-мишень, такой как опухолевая ткань; агент, который оптимизирует метаболизм иммунной клетки; или ген безопасного переключения (например, ген самоуничтожения), который убивает активированные Т-лимфоциты, когда после переноса адаптивных клеток наблюдается тяжелый побочный

эффект или когда перенесенные иммунные клетки больше не нужны. Эти молекулы могут быть внесены в один и тот же эффекторный модуль или в отдельные эффекторные модули.

[00343] В одном варианте осуществления, Т-лимфоцит ХАР (включая Т-лимфоцит ТКР) согласно изобретению может представлять собой «снаряженный» Т-лимфоцит ХАР, который трансформируют эффекторным модулем, содержащим ХАР, и эффекторным модулем, содержащим цитокин. Индуцируемые или конститутивно секретируемые активные цитокины дополнительно защищают Т-лимфоциты ХАР для повышения эффективности и устойчивости. В этом контексте, такой Т-лимфоцит ХАР также упоминается как «защищенный Т-лимфоцит ХАР». Молекула «защиты» может быть выбрана на основе микроокружения опухоли и других элементов врожденной и адаптивной иммунной систем. В некоторых вариантах осуществления, молекула может представлять собой стимулирующий фактор, такой как ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-18, ИФН типа I, CD40L и 4-1BBL, которые, как было показано, дополнительно повышают эффективность и устойчивость Т-лимфоцитов ХАР перед лицом враждебной опухолевой микросреды посредством различных механизмов (Yeku et al., *Biochem Soc Trans.*, 2016, 44(2): 412-418).

[00344] В некоторых аспектах, снаряженный Т-лимфоцит ХАР согласно изобретению модифицирован для экспрессии ХАР CD19 и ИЛ12. Такие Т-лимфоциты после ХАР-опосредованной активации в опухоли высвобождают индуцибельный ИЛ12, который усиливает активацию Т-лимфоцитов и привлекает и активирует клетки врожденного иммунитета для устранения CD19-негативных раковых клеток.

[00345] В одном варианте осуществления, Т-лимфоциты согласно изобретению могут быть модифицированы для экспрессии эффекторного модуля, содержащего ХАР, и эффекторного модуля, содержащего ген самоуничтожения.

[00346] В одном варианте осуществления, Т-лимфоцит ХАР (включая Т-лимфоцит ТКР) согласно изобретению может быть трансформирован эффекторными модулями, содержащими ген цитокина и защитного переключателя (например, ген самоуничтожения). Ген самоуничтожения может быть индуцибельной каспазой, такой как каспаза 9, которая индуцирует апоптоз, когда активируется внесклеточным стимулом биоконтурной системы. Такой индуцированный апоптоз устраняет перенесенную клетку по мере необходимости для снижения риска прямой токсичности и неконтролируемой пролиферации клеток.

[00347] В некоторых вариантах осуществления, иммунные клетки согласно изобретению могут быть НК-клетками, модифицированными для экспрессии антиген-специфического рецептора Т-лимфоцитов (ТКР) или антиген-специфического химерного антигенного рецептора (ХАР), которые описаны в данном документе.

[00348] Клетки естественные киллеры (NK) являются членами семейства лимфоидных клеток врожденного иммунитета и характеризуются у людей экспрессией фенотипического маркера CD56 (молекулы адгезии нервных клеток) в отсутствие CD3 (корцептор Т-лимфоцитов). NK-клетки являются мощными эффекторными клетками врожденной иммунной системы, которые обеспечивают цитотоксическую атаку без необходимости предварительного антигенного праймирования, образуя первую линию защиты от заболеваний, включая злокачественные новообразования и вирусную инфекцию.

[00349] Несколько доклинических и клинических испытаний продемонстрировали, что адаптивный перенос NK-клеток является многообещающим подходом к лечению рака, такого как острый миелолейкоз (Ruggeri et al., *Science*; 2002, 295: 2097–2100; и Geller et al., *Immunotherapy*, 2011, 3: 1445-1459). Адоптивный перенос NK-клеток, экспрессирующих ХАР, таких как активирующий ХАР на основе DAP12, выявил

улучшение уничтожения опухолевых клеток (Topfer et al., *J Immunol.* 2015; 194:3201–3212). NK-клетки, сконструированные для экспрессии CS-1-специфического ХАР, также демонстрируют усиление цитолиза и продукции интерферона- γ (ИФН- γ) при множественной миеломе (Chu et al., *Leukemia*, 2014, 28(4): 917-927).

[00350] Активация NK-клеток характеризуется набором рецепторов с активирующей и ингибирующей функциями. Важные рецепторы активации на NK-клетках включают в себя CD94/NKG2C и NKG2D (лектиноподобные рецепторы C-типа) и природные рецепторы цитотоксичности (NCR) NKp30, NKp44 и NKp46, которые распознают лиганды на опухолевых клетках или инфицированных вирусом клетках. Ингибирование NK-клеток, по существу, опосредовано взаимодействием полиморфных ингибирующих иммуноглобулиноподобных рецепторов (KIR) клеток-киллеров с их родственными лигандами человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) через альфа-1 спираль молекулы HLA. Баланс между сигналами, которые генерируются активирующими рецепторами и ингибирующими рецепторами, главным образом определяет незамедлительную цитотоксическую активацию.

[00351] NK-клетки могут быть выделены из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) или получены из эмбриональных стволовых клеток человека (ES) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSCs). Первичные NK-клетки, выделенные из МКПК, могут быть дополнительно размножены для адаптивной иммунотерапии. Стратегии и протоколы, полезные для размножения NK-клеток, могут включать в себя стимуляцию интерлейкином 2 (ИЛ2) и использование аутологичных кормящих клеток, или использование генетически модифицированных аллогенных кормящих клеток. В некоторых аспектах, NK-клетки можно избирательно размножать с помощью комбинации стимулирующих лигандов, включая ИЛ15, ИЛ21, ИЛ2, 41BBL, ИЛ12, ИЛ18, MICA, 2B4, LFA-1 и BCM1/SLAMF2 (например, публикация патента США № US20150190471).

[00352] Иммунные клетки, экспрессирующие эффекторные модули, содержащие ХАР и/или другие иммунотерапевтические агенты, можно использовать в качестве иммунотерапии рака. Иммунотерапия содержит клетки, экспрессирующие ХАР и/или другие иммунотерапевтические агенты в качестве активного ингредиента, и может дополнительно содержать подходящий наполнитель. Примеры наполнителя могут включать в себя вышеупомянутые фармацевтически приемлемые наполнители, включая различные среды для культивирования клеток, и изотонический раствор хлорида натрия.

[00353] В некоторых вариантах осуществления, клетки согласно данному изобретению могут представлять собой дендритные клетки, которые генетически модифицированы для экспрессии композиций согласно изобретению. Такие клетки могут быть использованы в качестве противораковых вакцин.

Способы разработки и характеристики антител к CD19

[00354] В некоторых вариантах осуществления, согласно данному изобретению предложены способы получения антител к CD19, фрагментов или вариантов антител. Такие способы могут включать в себя этапы: (1) приготовления композиции с CD19, (2) приведение в контакт библиотеки антител, или фрагментов или вариантов антител с композицией и (3) идентификации одного или большего количества антител к CD19. Также в данном документе предложены способы идентификации отличающиеся от FMC63 CD19-антител, фрагментов или вариантов антител.

[00355] В некоторых вариантах осуществления, согласно данному изобретению предложены способы идентификации scFv CD19. Такие способы могут включать в себя скрининг фагмидных библиотек на scFv CD19. Фагмидные библиотеки, экспрессирующие рекомбинантные scFv, связанные с поверхностью

бактерий или бактериофагов, полезны в данном изобретении. Фагмидные библиотеки могут быть получены с помощью ПЦР-встраивания полинуклеотидов, кодирующих тяжелую цепь и каппа-легкую цепь иммуноглобулина IgM и заражения Cre рекомбиназа-положительных бактерий векторами, содержащими продукты ПЦР, при высоком уровне множественности заражения (MOI). Высокий уровень MOI дает бактерии, содержащие несколько фагмид, каждая из которых кодирует различные гены VH и VL, которые могут быть рекомбинированы рекомбиназой Cre. Полученная библиотека, которая может быть создана путем рекомбинации, составляет примерно 10^8 уникальных scFv. В некоторых случаях, библиотеки scFv CD19, заданные в форме конструкции химерного антигенного рецептора, могут быть подвергнуты скринингу для идентификации CD19scFv, полезных в данном изобретении.

[00356] В некоторых вариантах осуществления, scFv, иммунологически специфичные к CD19, могут быть идентифицированы с использованием клеток, которые эктопически экспрессируют полноразмерный, фрагмент или часть CD19. Клеточные линии с низкой эндогенной экспрессией CD19 могут быть выбраны для эктопической экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, CD19 может представлять собой природную изоформу CD19 человека.

[00357] В некоторых вариантах осуществления, гибридные белки, содержащие внеклеточные домены CD19 (то есть экзон 1-экзон 4), слитые с Fc-областью человеческого IgG1 (CD19sIg), используют для идентификации CD19-специфичных scFv. Такие гибридные белки были описаны Oliveira et al. (2013) *Journal of Translational Medicine* 11:23; содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00358] Также в данном документе предложены способы идентификации scFv, отличных от FMC63, которые включают в себя scFv, которые иммунологически специфичны и связываются с эпитопом антигена CD19, который отличается или не похож на эпитоп антигена CD19, который связывается с FMC63. В некоторых вариантах осуществления, scFv, отличные от FMC63, идентифицируют путем скрининга библиотеки scFv с помощью комплекса, состоящего из CD19 человека, связанного с FMC63. CD19 макака-резуса (*Macaca mulatta*), называемый в данном документе резус-CD19, на 88% гомологичен с CD19 человека. Несмотря на эту высокую степень гомологии, резус-CD19 не распознается FMC63, что указывает на то, что эпитоп FMC63 находится в области CD19 человека, которая не гомологична резус-CD19. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, резус-CD19 может быть использован для скрининга библиотек scFv для идентификации scFv, отличающихся от FMC63. Мутации в области резус-CD19, которая не гомологична CD19 человека, ранее использовались для идентификации остатков CD19 человека, которые обеспечивают связывание с FMC63 (Sommermeyer et al. (2017) *Leukemia* Feb 16. doi: 10.1038/leu.2017.57). В некоторых вариантах осуществления, мутационный анализ, описанный Sommermeyer et al., может быть использован для создания мутантов CD19 человека, которые не могут связываться с FMC63. Такие мутанты могут включать в себя CD19 человека (H218R, A237D, M243V, E244D, P250T) и CD19 человека (H218R, A237D), и могут быть использованы для скрининга библиотек scFv на предмет наличия scFv, отличающихся от FMC63. Sotillo et al. идентифицировали сплайс вариант CD19 человека без экзона 2 у больных раком (Sotillo et al. (2015) *Cancer Discov.* 2015 Dec;5(12):1282-95). Сплайс вариант в котором отсутствует экзон 2, не распознается FMC63 и может также использоваться для скрининга библиотек scFv на наличие scFv, отличных от FMC63.

[00359] Гибридные молекулы CD19 IgG, полученные путем слияния области Fc IgG1 человека с полными внеклеточными доменами CD19 человека, то есть с экзонами 1-4 (CD19sIgG1-4) или внеклеточными

доменами, в которых отсутствует экзон 2, то есть экзоны 1, 3 и 4 (CD19sIgG1, 3,4) также могут быть использованы для скрининга библиотек scFv для идентификации scFv, отличающихся от FMC63.

[00360] Белки, варианты и мутанты CD19, полезные в изобретении, представлены в Таблице 14.

Таблица 14: Белки, варианты и мутанты CD19

Описание	Последовательность	SEQ ID NO
CD19 человека, изоформа 1 (NCBI идентификационный № NP_001171569.1)	MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLK GTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIW LFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGE LFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVW AKDRPEIWEGEPPCLPPRDSL NQSLSQDLTMAPGSTLWLS CGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARD MWVMETGLLLPRATAQDAGKYCHRGNTMSFHLEITA RPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQR ALVLRKRKRMTDPTRRFFKVTPPPGSGPQNQYGNVLSLP TPTSGLGRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSR SPPGVGP EEEEEEGEYEEPDSEEDSEFYENDSNLGQDQLSQ DGSYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQPVAR TMDFLSPHGSAWDPSREATSLAGSQSYEDMRGILYAAPQ LRSIRGQPGPNHEEDADSYENMDNPDGPDPAWGGGGRM GTWSTR	858
CD19 человека, изоформа 2 (NCBI идентификационный № NP_001761.3)	MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLK GTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIW LFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGE LFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVW AKDRPEIWEGEPPCLPPRDSL NQSLSQDLTMAPGSTLWLS CGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARD MWVMETGLLLPRATAQDAGKYCHRGNTMSFHLEITA RPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQR ALVLRKRKRMTDPTRRFFKVTPPPGSGPQNQYGNVLSLP TPTSGLGRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSR SPPGVGP EEEEEEGEYEEPDSEEDSEFYENDSNLGQDQLSQ DGSYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQPVAR TMDFLSPHGSAWDPSREATSLGSQSYEDMRGILYAAPQLR SIRGQPGPNHEEDADSYENMDNPDGPDPAWGGGGRMGT WSTR	859
Резус-CD19 (Uniprot ID: F7F486)	MPPPCLLFFLLFLTPMEVRPQEPLVVKVEEGDNAVLQCLE GTSDGPTQQLVWCRDSPFEPFLNLSLGLPGMGIRMGPLGI WLLIFNVSNTGGFYLCQGPLSEKAWQPGWTVSVEGSG ELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLNSQLYV WAKDRPEMWEGEPPCGPPRDSL NQSLSQDLTMAPGSTL	860

		WLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVRPKGPKSSLLSLELKDDRP DRDMWVVDTGLLLTRATAQDAGKYYCHRGNWTKSFYL EITARPALWHWLLRIGGWKVPVTLTYLIFCLCSLVGILQ LQRALVLRKRKRMTDPTRRFFKVTTPPGSGPQNQYGNV LSLPTPTSGLGRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQVDGA VGSRSPPGAGPEEEEEGEGYEEDSEEGSEFYENDSNFGQD QLSQDGSYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQ PVARTMDFLSPHGSAWDPSREATSLGSQSYEDMRGLLYA APQLRTIRGQPGPNHEEDADSYENMDNPDGPDPAWGGGG RMGTWSAR	
CD19 (H218R, M243V, E244D, P250T)	человека A237D,	MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLK GTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIW LFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGE LFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVW AKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNSLSQDLTMAPGSTLWLS CGVPPDSVSRGPLSWTHVRPKGPKSSLLSLELKDDRPDRD MWVVDTGLLLTRATAQDAGKYYCHRGNTMSFHLEITA RPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQR ALVLRKRKRMTDPTRRFFKVTTPPGSGPQNQYGNVLSLP TPTSGLGRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSR SPPGVGPEEEEEGEGYEEDSEEDSEFYENDSNLGQDQLSQ DGSYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQPVAR TMDFLSPHGSAWDPSREATSLAGSQSYEDMRGILYAAPQ LRSIRGQPGPNHEEDADSYENMDNPDGPDPAWGGGGGRM GTWSTR	861
CD19 (H218R, A237D)	человека	MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLK GTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIW LFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGE LFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVW AKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNSLSQDLTMAPGSTLWLS CGVPPDSVSRGPLSWTHVRPKGPKSSLLSLELKDDRPDRD MWVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNTMSFHLEITA RPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQR ALVLRKRKRMTDPTRRFFKVTTPPGSGPQNQYGNVLSLP TPTSGLGRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSR SPPGVGPEEEEEGEGYEEDSEEDSEFYENDSNLGQDQLSQ DGSYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQPVAR TMDFLSPHGSAWDPSREATSLAGSQSYEDMRGILYAAPQ LRSIRGQPGPNHEEDADSYENMDNPDGPDPAWGGGGGRM GTWSTR	862
CD19 человека (дельта)		MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEGELFRWNVSDL	863

экзон 2)	GGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWE GEPPCLPPRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVS RGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVWVETGL LLPRATAQDAGKYYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLL RTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRKRKR MTDPTRRFFKVTTPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSGLGRAQ RWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSRSPPGVGPEEE EGEGYEEDSEEDSEFYENDSNLGQDQLSQDGSYENPED EPLGPEDEDSFSNAESYENEDDEELTQPVARTMDFLSPHGS AWDPSREATSLGSQSYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNH EEDADSYENMDNPDGPDPAWGGGGRMGWTR	
CD19 человека (экзон 1-4)	MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLK GTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIW LFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGE LFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVW AKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLS CGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARD MWVWVETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNTMSFHLEITA RP	864
CD19 человека (экзон 1,3,4)	MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEGELFRWNVSDL GGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWE GEPPCLPPRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVS RGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVWVETGL LLPRATAQDAGKYYCHRGNTMSFHLEITARP	865

III. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ И ГОТОВЫЕ ФОРМЫ

[00361] Согласно данному изобретению также предложены фармацевтические композиции, содержащие один или большее количество биоконтуров, эффекторных модулей, ЭОС (например, ДД), стимулов и полезных грузов (т. е. иммунотерапевтических агентов), векторов, клеток и других компонентов согласно изобретению, и, необязательно, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый наполнитель или инертный ингредиент.

[00362] Как применяется в данном документе, термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату биоконтуров, ЭОС, стимулов и полезных грузов (т. е. иммунотерапевтических агентов), других компонентов, векторов, клеток, описанных в данном документе, или их фармацевтически приемлемых солей, необязательно с другими химическими компонентами, такими как физиологически подходящие носители и наполнители. Фармацевтические композиции согласно изобретению содержат эффективное количество одной или большего количества активных композиций согласно изобретению. Приготовление фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере одну композицию согласно данному изобретению и/или дополнительный активный ингредиент, будет известно специалистам в данной области техники в свете данного раскрытия изобретения, как приведено в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, включен в данный документ посредством ссылки.

[00363] Термин «наполнитель» или «инертный ингредиент» относится к неактивному веществу, добавленному в фармацевтическую композицию и готовую форму для дополнительного облегчения введения активного ингредиента. Для целей данного раскрытия, фраза «активный ингредиент» в целом, как правило, относится к любому одному или большему количеству биоконтуров, эффекторных модулей, ЭОС, стимулов и полезных грузов (то есть иммунотерапевтическим агентам), других компонентов, векторов и клеток, подлежащих доставке, как описано в данном документе. Фраза «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным веществам и композициям, которые не вызывают побочную, аллергическую или другую неблагоприятную реакцию при введении животному, такому как, например, человек, в зависимости от необходимости.

[00364] В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции и готовые формы вводят людям, пациентам или субъектам. Хотя описания фармацевтических композиций, предложенных в данном документе, в основном направлены на фармацевтические композиции, которые подходят для введения людям, специалисту в данной области техники будет понятно, что такие композиции обычно подходят для введения любому другому животному, например животным, не относящимся к человеку, например, не относящимся к человеку млекопитающим. Субъекты, для которых предполагается введение фармацевтических композиций, включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: млекопитающих, отличных от человека, включая сельскохозяйственных животных, таких как крупный рогатый скот, лошади, цыплята и свиньи, домашних животных, таких как кошки, собаки, или лабораторных животных, таких как мыши, крысы, кролики, собаки и отличные от человека приматы. Понятно, что для введения человеку препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты, как того требует Управление по биологическим стандартам FDA.

[00365] Фармацевтическая композиция и готовая форма согласно изобретению могут быть приготовлены, упакованы и/или проданы оптом, в виде одной единицы дозы и/или в виде множества единиц дозы. Как применяется в данном документе, «единица дозы» представляет собой дискретное количество фармацевтической композиции, содержащей заранее определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента в целом, как правило, равно дозе активного ингредиента, которую вводят субъекту, и/или удобной части такой дозы, такой как, например, половина или одна треть такой дозы.

[00366] Композиции согласно данному изобретению могут быть приготовлены любым способом, подходящим для доставки. Композиция может представлять собой, но не ограничена следующим: наночастицы, поли(лактид-ко-гликолевая кислота) (PLGA) микрогранулы, липидоиды, липоплекс, липосомы, полимеры, углеводороды (включая простые сахара), катионные липиды и их комбинации.

[00367] В одном варианте осуществления, готовая форма представляет собой наночастицу, которая может содержать по меньшей мере один липид. Липид может быть выбран из, но не ограничивается лишь этими: DLin-DMA, DLin-K-DMA, 98N12-5, C12-200, DLin-MC3-DMA, DLin-KC2-DMA, DODMA, PLGA, PEG, PEG-DMG и PEGилированных липидов. В другом аспекте, липид может представлять собой катионный липид, такой как, без ограничения, DLin-DMA, DLin-D-DMA, DLin-MC3-DMA, DLin-KC2-DMA и DODMA.

[00368] Для полинуклеотидов согласно изобретению, готовая форма может быть выбрана из любой из предложенных, например, в международной заявке PCT US2012/069610, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00369] Относительные количества активного ингредиента, фармацевтически приемлемого наполнителя или инертного ингредиента и/или любых дополнительных ингредиентов в фармацевтической композиции в

соответствии с изобретением будут варьировать в зависимости от особенностей, размера и/или состояния субъекта, которого лечат, и, кроме того, в зависимости от пути введения композиции. Например, композиция может содержать от 0,1 до 100, например от 0,5 до 50, от 1 до 30, от 5 до 80, по меньшей мере, 80 (маса/маса) активного ингредиента.

[00370] Эффективность лечения или улучшения заболевания можно оценить, например, путем измерения прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, выраженности симптомов, уменьшения боли, качества жизни, дозы лекарственного средства, необходимого для поддержания эффекта лечения, уровня маркера заболевания или любого другого измеримого параметра, подходящего для данного заболевания, которое лечат или для которого проводят профилактику. Специалист в данной области техники вполне может наблюдать эффективность лечения или профилактики путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. В связи с введением композиций согласно данному изобретению, термин «эффективный против», например, рака, указывает на то, что введение клинически приемлемым образом приводит к благоприятному эффекту по меньшей мере для статистически значимой доли пациентов, такому как улучшение симптомов, излечение, уменьшение нагрузки от заболевания, уменьшение массы опухоли или количества клеток, увеличение продолжительности жизни, улучшение качества жизни, или другому эффекту, обычно признаваемому как положительный врачами, знакомыми с лечением определенного типа рака.

[00371] Лечебный или профилактический эффект является доказанным, когда наблюдается статистически значимое улучшение одного или большего количества параметров выраженности заболевания, или если наблюдают отсутствие ухудшения или развития симптомов, которые, как ожидается, указывали бы на обратное. В качестве примера, положительное изменение по меньшей мере 10 измеримых параметров заболевания, и предпочтительно по меньшей мере 20, 30, 40, 50 или большего количества, может указывать на эффективное лечение. Эффективность для данной композиции или готовой формы согласно данному изобретению также может быть оценена с использованием экспериментальной животной модели данного заболевания, как известно в данной области техники. При использовании экспериментальной животной модели эффективность лечения подтверждается наблюдением статистически значимого изменения.

IV. ПРИМЕНЕНИЯ

[00372] В одном аспекте данного изобретения, предлагаются способы уменьшения объема опухоли или опухолевой нагрузки. Способы включают в себя введение субъекту, имеющему опухоль, фармацевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одну биоконтурную систему, эффекторный модуль, ДД и/или полезный груз (т. е. иммунотерапевтический агент), по меньшей мере один вектор или клетки. Биоконтурная система и эффекторный модуль, содержащие любой иммунотерапевтический агент, как описано в данном документе, могут быть в форме полипептида или полинуклеотида, такого как мРНК, или вирусного вектора, содержащего полинуклеотид, или клетки, модифицированной для экспрессии биоконтурной системы, эффекторного модуля, ДД, и полезного груза интереса (то есть, иммунотерапевтического агента).

[00373] В другом аспекте данного изобретения, предлагаются способы индукции противоопухолевого иммунного ответа у субъекта. Способы включают в себя введение субъекту, имеющему опухоль, фармацевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одну биоконтурную систему, эффекторный модуль, ДД и/или полезный груз (т. е. иммунотерапевтический агент), по меньшей мере один вектор или клетки. Биоконтурная система и эффекторный модуль, содержащие любой

иммунотерапевтический агент, как описано в данном документе, могут быть в форме полипептида или полинуклеотида, такого как мРНК, или вирусного вектора, содержащего полинуклеотид, или клетки, модифицированной для экспрессии биоконтур, эффекторного модуля, ДД и полезного груза интереса (т. е. иммунотерапевтического агента).

[00374] Способы согласно данному изобретению могут представлять собой адаптивный перенос клеток (АПК) с использованием генетически сконструированных клеток, таких как иммунные эффекторные клетки согласно изобретению, раковых вакцин, содержащих биоконтурные системы, эффекторные модули, ДД, представляющие интерес полезные грузы (т. е. иммунотерапевтические агенты) изобретения, или композиции, которые воздействуют на опухолевое иммуносупрессивное микроокружение, или их комбинацию. Эти методы лечения могут быть дополнительно использованы с другими методами лечения рака, такими как химиотерапия и лучевая терапия.

1. Адоптивный перенос клеток (адаптивная иммунотерапия)

[00375] В некоторых вариантах осуществления, клетки, которые были генетически модифицированы для экспрессии по меньшей мере одной биоконтурной системы, эффекторного модуля, ДД и/или полезного груза (иммунотерапевтический агент), могут использоваться для адаптивной клеточной терапии (АКТ). Как применяется в данном документе, термин «перенос адаптивных клеток» относится к введению иммунных клеток (из аутологичных, аллогенных или генетически модифицированных хозяев) с прямой противораковой активностью. АКТ показала себя многообещающее для применение в клинической практике против злокачественных и инфекционных заболеваний. Например, Т-лимфоциты, генетически сконструированные для распознавания CD19, были использованы для лечения фолликулярной В-лимфоцитарной лимфомы (Kochenderfer et al., *Blood*, 2010, 116:4099-4102; и Kochenderfer and Rosenberg, *Nat Rev Clin Oncol.*, 2013, 10(5): 267-276), и АКТ с использованием аутологичных лимфоцитов, генетически модифицированных для экспрессии противоопухолевых Т-клеточных рецепторов, использовалась для лечения метастатической меланомы (Rosenberg and Dudley, *Curr. Opin. Immunol.* 2009, 21: 233-240).

[00376] Согласно данному изобретению, биоконтур и системы могут быть использованы при разработке и внедрение клеточной терапии, такой как адаптивная клеточная терапия. Некоторые эффекторные модули, используемые в клеточной терапии, приведены на Фиг. 7-12. Биоциклы, их компоненты, эффекторные модули и их ЭОС, и полезные грузы, могут использоваться в клеточных терапиях для осуществления терапий ХАР, в управление или регуляции ТИЛ, в аллогенной клеточной терапии, в комбинирование Т-лимфоцитарной терапии с другими линиями лечения (например, облучением, цитокинами), для кодирования сконструированных ТКР или модифицированных ТКР, или для усиления Т-лимфоцитов, отличных от ТКР (например, путем введения генов цитокинов, генов ингибиторов контрольных точек PD1, CTLA4).

[00377] В данном документе предложены способы для применения в адаптивной клеточной терапии. Способы включают в себя предварительную адаптацию субъекта, нуждающегося в этом, модуляцию иммунных клеток с помощью ЭОС, биоконтуров и композиций согласно данному изобретению, введение субъекту сконструированных иммунных клеток, экспрессирующих композиции согласно изобретению, и успешное приживание сконструированных клеток в субъекте.

[00378] В некоторых вариантах осуществления, ЭОС, биоконтур и композиции согласно данному изобретению могут использоваться для минимизации схем предварительной адаптации, связанных с адаптивной клеточной терапией. Как применяется в данном документе, термин «предварительна адаптация» относится к любой схеме лечения, назначаемой субъекту для улучшения результата адаптивной клеточной

терапии. Стратегии предварительной адаптации включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: облучение всего тела и/или лимфодеплетирующую химиотерапию. Клинические испытания адаптивной терапии без предварительной адаптации не продемонстрировали какой-либо клинической пользы, что указывает на ее важность для АКТ. Тем не менее, предварительная адаптация связана с значительной токсичностью и ограничивает группу субъектов, подходящих для АКТ. В некоторых случаях, иммунные клетки для АКТ могут быть сконструированы для экспрессии цитокинов, таких как ИЛ12 и ИЛ15, в качестве полезного груза с использованием ЭОС согласно данному изобретению, чтобы уменьшить потребность в предварительной адаптации (Pengram et al. (2012) *Blood* 119 (18): 4133-41; содержание которого включено посредством ссылки в полном объеме.)

[00379] В некоторых вариантах осуществления, иммунные клетки для АКТ могут представлять собой дендритные клетки, Т-лимфоциты, такие как CD8⁺ Т-лимфоциты и CD4⁺ Т-лимфоциты, клетки естественные киллеры (NK), NK Т-лимфоциты, цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), инфильтрирующие в опухоль лимфоциты (TIL), лимфокин-активируемые клетки киллеры (LAK), Т-лимфоциты памяти, регуляторные Т-лимфоциты (Treg), хелперные Т-лимфоциты, цитокин-индуцированные клетки киллеры (CIK) и любые их комбинации. В других вариантах осуществления, иммуностимулирующие клетки для АКТ могут быть получены из эмбриональных стволовых клеток (ESC) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC). В некоторых вариантах осуществления, для АКТ используются аутологичные или аллогенные иммунные клетки.

[00380] В некоторых вариантах осуществления, клетки, используемые для АКТ, могут представлять собой Т-лимфоциты, сконструированные для экспрессии ХАР, содержащих антиген-связывающий домен, специфичный к антигену на представляющих интерес опухолевых клетках. В некоторых вариантах осуществления, клетки, используемые для АКТ, могут представлять собой клетки NK, сконструированные для экспрессии ХАР, содержащих антиген-связывающий домен, специфичный к антигену на представляющих интерес опухолевых клетках. В дополнение к адаптивному переносу генетически модифицированных Т-лимфоцитов (например, Т-лимфоцитов ХАР) для иммунотерапии, для адаптивной иммунотерапии могут использоваться альтернативные типы ХАР-экспрессирующих лейкоцитов, либо по отдельности, либо в комбинации с Т-лимфоцитами ХАР. В одном примере, для АКТ может быть использована смесь Т-лимфоцитов и NK-клеток. Уровень экспрессии ХАР в Т-лимфоцитах и NK-клетках, согласно данному изобретению, регулируется и контролируется малой молекулой, которая связывается с ДД, функционально связанным с ХАР в эффекторном модуле.

[00381] В некоторых вариантах осуществления, ХАР согласно данному изобретению могут быть помещены под транскрипционный контроль локуса константой области альфа цепи рецептора Т-лимфоцитов (TRAC) в Т-лимфоцитах для достижения равномерной экспрессии ХАР при одновременном повышении активности Т-лимфоцитов. Локус TRAC может быть нарушен с использованием CRISPR/Cas 9, нуклеазы с цинковым пальцем (ZFN), TALEN с последующей вставкой конструкции ХАР. Способы конструирования конструкций ХАР, направленных на локус TRAC, описаны в Euquem J. et al. (2017) *Nature*.543(7643):113-117 (содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

[00382] В некоторых вариантах осуществления, NK-клетки, сконструированные для экспрессии композиций данного изобретения, могут быть использованы для АКТ. Активация NK-клеток индуцирует перфорин/гранзим-зависимый апоптоз в клетках-мишенях. Активация NK-клеток также вызывает секрецию

цитокинов, таких как ИФН- γ , TNF- α и GM-CSF. Эти цитокины усиливают фагоцитарную функцию макрофагов и их антимикробную активность и увеличивают адаптивный иммунный ответ посредством активации презентации антигена антиген-презентирующими клетками, такими как дендритные клетки (ДК) (рассмотренно Vivier et al., *Nat. Immunol.*, 2008, 9(5): 503-510).

[00383] Другие примеры генетической модификации могут включать в себя введение химерных антигенных рецепторов (ХАР) и уменьшение уровня рецепторов ингибирующих NK-клеток, таких как NK G2A.

[00384] NK-клетки также могут быть генетически перепрограммированы для обхода сигналов, ингибирующих NK-клетки, при взаимодействии с опухолевыми клетками. Например, использование CRISPR, ZFN или TALEN для генетической модификации NK-клеток для подавления их ингибирующих рецепторов может повысить противоопухолевую способность NK-клеток.

[00385] Иммунные клетки могут быть выделены и размножены *ex vivo* с использованием различных способов, известных в данной области техники. Например, способы выделения и размножения цитотоксических Т-лимфоцитов описаны в патентах США № 6805861 и № 6531451; публикации патента США № US20160348072A1 и международной публикации патента № WO2016168595A1; содержания которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Выделение и размножение NK-клеток описано в публикации патента США № US20150152387A1, патенте США № 7435596; и Oyer, J.L. (2016). *Cytotherapy*. 18 (5):653-63; содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В частности, первичные NK-клетки человека могут быть размножены в присутствии кормящих клеток, например линии миелоидных клеток, которая была генетически модифицирована для экспрессии связанных с мембраной ИЛ15, ИЛ21, ИЛ12 и 4-1BBL.

[00386] В некоторых случаях, субпопуляции иммунных клеток могут быть обогащены для АПК. Способы обогащения иммунных клеток описаны в международной публикации патента № WO2015039100A1. В другом примере, Т-лимфоциты, положительные по маркеру аттенюатора В и Т-лимфоцитов (BTLA), можно использовать для обогащения Т-лимфоцитов, которые являются противораково-активными, как описано в патенте США № 9512401 (содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

[00387] В некоторых вариантах осуществления, иммунные клетки для АПК могут быть деплетированы по выбранным субпопуляциям для усиления размножения Т-лимфоцитов. Например, иммунные клетки могут быть лишены Т-лимфоцитов Foxp3+ для минимизации противоопухолевого иммунного ответа с использованием способов, изложенных в публикации патента США № US 20160298081A1; содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00388] В некоторых вариантах осуществления, активации и размножения Т-лимфоцитов для АКТ достигают антигенной стимуляцией временно экспрессируемого химерного антигенного рецептора (ХАР) на поверхности клетки. Такие способы активации описаны в международном патенте № WO2017015427, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00389] В некоторых вариантах осуществления, иммунные клетки могут быть активированы антигенами, связанными с антиген-презентирующими клетками (АПК). В некоторых вариантах осуществления, АПК могут представлять собой дендритные клетки, макрофаги или В-лимфоциты, которые являются антиген-специфичными или неспецифичными. АПК могут быть аутологичными или гомологичными по своему органу. В некоторых вариантах осуществления, АПК могут представлять собой искусственные антиген-

презентирующие клетки (аАПК), такие как аАПК на основе клеток, или бесклеточные аАПК. Клетки на основе аАПК могут быть выбраны из генетически модифицированных аллогенных клеток, таких как клетки эритролейкемии человека, или ксеногенных клеток, таких как мышинные фибробласты и клетки дрозофилы. В альтернативном варианте, АПК могут быть бесклеточными, причем антигены или ко-стимулирующие домены представлены на синтетических поверхностях, таких как латексные гранулы, полистирольные гранулы, липидные везикулы или экзосомы.

[00390] В некоторых вариантах осуществления, клетки согласно изобретению, в частности Т-лимфоциты, можно размножать с использованием искусственных клеточных платформ. В одном варианте осуществления, зрелые Т-лимфоциты могут быть получены с использованием искусственных тимусных органоидов (ИТО), описанных Seet CS et al. 2017. *Nat Methods*. 14, 521–530 (содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). ИТО основаны на линии стромальных клеток, экспрессирующих дельта-подобный канонический лиганд Notch (DLL1). В этом способе стромальные клетки агрегируются с гемопоэтическими стволовыми клетками и клетками-предшественниками центрифугированием, и размещаются на вставке для культуры клеток на границе раздела воздух-жидкость для создания органоидных культур. Полученные из ИТО Т-лимфоциты обладают наивными фенотипами, разнообразным репертуаром Т-клеточных рецепторов (ТКР) и ТКР-зависимой функцией.

[00391] В некоторых вариантах осуществления, адаптивную клеточную терапию осуществляют путем аутологичного переноса, причем клетки получают от субъекта, нуждающегося в лечении, и клетки после выделения и обработки вводят тому же субъекту. В других случаях, АКТ может включать в себя аллогенный перенос, причем клетки выделяют и/или получают от субъекта-донора, отличного от субъекта-реципиента, который в конечном итоге получает клеточную терапию. Донор и субъект-реципиент могут быть генетически идентичными или похожими, или могут демонстрировать один и тот же класс или подтип HLA.

[00392] В некоторых вариантах осуществления, множественные иммунотерапевтические агенты, вводимые в иммунные клетки для АКТ (например, Т-лимфоциты и NK-клетки), могут контролироваться одной и той же биоконтурной системой. В одном примере, цитокин, такой как ИЛ12, и конструкция ХАР, такая как ХАР CD19, связаны с одним и тем же дестабилизирующим доменом hDNFR. Экспрессию ИЛ12 и ХАР CD19 настраивают с использованием одновременно TMP. В других вариантах осуществления, множество иммунотерапевтических агентов, вводимых в иммунные клетки для АКТ (например, Т-лимфоциты и NK-клетки), могут контролировать с помощью различных биоконтурных систем. В одном примере, цитокин, такой как ИЛ12, и конструкция ХАР, такая как ХАР CD19, соединены с различными ДД в двух отдельных эффекторных модулях, таким образом, могут быть настроены отдельно с использованием разных стимулов. В другом примере, ген самоуничтожения и конструкция ХАР могут быть соединены с двумя отдельными эффекторными модулями.

[00393] После генетической модуляции с использованием ЭОС, биоконтур и композиции согласно изобретению, клетки вводят субъекту, нуждающемуся в этом. Способы введения клеток для адаптивной клеточной терапии являются известными и могут использоваться в связи с предложенными способами и композициями. Например, способы адаптивной Т-клеточной терапии описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2003/0170238 от Gruenberg et al; патенте США № 4690915 от Rosenberg; Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol*. 8(10):577-85). Смотрите, например, Themeli et al. (2013) *Nat Biotechnol*. 31(10):

928-933; Tsukahara et al. (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 438(1): 84-9; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; содержания которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00394] В некоторых вариантах осуществления, иммунные клетки для АКТ могут быть модифицированы для экспрессии одного или большего количества иммунотерапевтических агентов, которые облегчают активацию иммунных клеток, инфильтрацию, размножение, выживание и противоопухолевые функции. Иммунотерапевтические агенты могут представлять собой второй ХАР или ТКР, специфичный к другой молекуле-мишени; цитокин или рецептор цитокина; химерный переключающий рецептор, который преобразует ингибирующий сигнал в стимулирующий сигнал; рецептор хоминга, который направляет адаптивно перенесенные клетки в сайт-мишень, такой как опухолевая ткань; агент, который оптимизирует метаболизм иммунной клетки; или ген защитного переключения (например, ген самоуничтожения), который убивает активированные Т-лимфоциты, когда после переноса адаптивных клеток наблюдается тяжелый побочный эффект или когда перенесенные иммунные клетки больше не нужны.

[00395] В некоторых вариантах осуществления, иммунные клетки, используемые для адаптивного переноса клеток, могут быть генетически изменены, чтобы улучшить их устойчивость, цитотоксичность, способность к поражению опухолей и способность проникать в участки заболевания *in vivo*, с общей целью дополнительного улучшения их способности убивать опухоли у больных раком. Одним из примеров является внесение эффекторных модулей согласно изобретению, содержащих цитокины, такие как гамма-цитокины (ИЛ2 и ИЛ15), в иммунные клетки для стимулирования пролиферации и выживания иммунных клеток. Трансдукция генов цитокинов (например, гамма-цитокинов ИЛ2 и ИЛ15) в клетки будет обеспечивать возможность размножать иммунные клетки без добавления экзогенных цитокинов, а экспрессирующие цитокины НК-клетки обладают повышенной опухолевой цитотоксичностью.

[00396] В некоторых вариантах осуществления, биоконтур, их компоненты, ЭОС или эффекторные модули могут использоваться для предотвращения истощения Т-лимфоцитов. Как применяется в данном документе, термин «истощение Т-лимфоцитов» относится к постепенной и прогрессирующей потере функции Т-лимфоцитов, вызванной хронической активацией Т-лимфоцитов. Истощение Т-лимфоцитов является основным фактором, ограничивающим эффективность противовирусной и противоопухолевой иммунотерапии. Истощенные Т-лимфоциты обладают низкими возможностями пролиферации и продукции цитокинов одновременно с высокими показателями апоптоза и высокой экспрессией на поверхности множества ингибирующих рецепторов. Активация Т-лимфоцитов, приводящая к истощению, может происходить либо в присутствии, либо в отсутствие антигена.

[00397] В некоторых вариантах осуществления, биоконтур и их компоненты могут использоваться для предотвращения истощения Т-лимфоцитов в контексте терапии Т-лимфоцитами с химерным антигенным рецептором (ХАР-Т). В этом контексте, истощение в некоторых случаях может быть вызвано олигомеризацией scFvs ХАР на клеточной поверхности, что приводит к непрерывной активации внутриклеточных доменов ХАР. В качестве неограничивающего примера, ХАР согласно данному изобретению могут содержать scFv, которые не способны к олигомеризации. В качестве другого неограничивающего примера, ХАР, которые быстро поглощаются и реэкспрессируются после воздействия антигена, также могут быть выбраны для предотвращения хронической олигомеризации scFv на клеточной поверхности. В одном варианте осуществления, каркасная область scFv может быть модифицирована для предотвращения конститутивного ХАР-сигналинга (Long et al. 2014. *Cancer Research*. 74 (19) S1; содержание которого включено посредством ссылки в полном объеме). Настраиваемые биоконтурные системы согласно

данному изобретению также можно использовать для регуляции экспрессии ХАР на поверхности Т-лимфоцитов для предотвращения хронической активации Т-лимфоцитов. ХАР согласно изобретению также могут быть спроектированы для минимизации истощения. В качестве неограничивающего примера, сигнальный домен 41-BB может быть включен в конструкцию ХАР для уменьшения истощения Т-лимфоцитов. В некоторых вариантах осуществления, любая из стратегий, раскрытых Long H A et al. может быть использована для предотвращения истощения (Long A H et al. (2015) *Nature Medicine* 21, 581–590; содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

[00398] В некоторых вариантах осуществления, настраиваемая природа биоконтуров согласно данному изобретению может быть использована для того, чтобы обратить вспять истощение Т-лимфоцитов человека, наблюдаемое при тоническом сигналинге ХАР. Обратимое подавление биологической активности адаптивно перенесенных клеток с использованием композиций согласно данному изобретению может быть использовано для обращения вспять тонического сигналинга, который, в свою очередь, может возобновить Т-лимфоциты. Обращение вспять истощения может быть измерено по уменьшению активности множества ингибирующих рецепторов, связанных с истощением.

[00399] В некоторых вариантах осуществления, метаболические пути Т-лимфоцитов могут быть модифицированы для уменьшения восприимчивости Т-лимфоцитов к истощению. Метаболические пути могут включать в себя, но не ограничиваются лишь этими: гликолиз, цикл мочевины, цикл лимонной кислоты, бета-окисление, биосинтез жирных кислот, пентозофосфатный путь, биосинтез нуклеотидов и метаболические пути гликогена. В качестве неограничивающего примера, полезные грузы, которые снижают скорость гликолиза, могут использоваться для ограничения или предотвращения истощения Т-лимфоцитов (Long et al. *Journal for Immunotherapy of Cancer* 2013, 1(Suppl 1): P21; содержание которого включено посредством ссылки в полном объеме). В одном варианте осуществления, Т-лимфоциты согласно данному изобретению можно использовать в комбинации с ингибиторами гликолиза, такими как 2-дезоксиглюкоза, и рапамицин.

[00400] В некоторых вариантах осуществления, эффекторные модули согласно данному изобретению могут быть помещены под транскрипционный контроль локуса константой области альфа цепи рецептора Т-лимфоцитов (TRAC) в Т-лимфоцитах. Eyquem et al. показали, что экспрессия ХАР из локуса TRAC предотвращает истощение Т-лимфоцитов и ускоренную дифференциацию Т-лимфоцитов, вызванную чрезмерной активацией Т-лимфоцитов (Eyquem J. et al. (2017) *Nature*.543(7643):113-117; содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

[00401] В некоторых вариантах осуществления, полезные грузы согласно изобретению могут использоваться в сочетании с антителами или фрагментами, которые нацелены на маркеры поверхности Т-лимфоцитов, связанные с истощением Т-лимфоцитов. Маркеры поверхности Т-лимфоцитов, связанные с истощением Т-лимфоцитов, которые могут быть использованы, включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: CTLA-1, PD-1, TGIT, LAG-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA и CD96.

[00402] В одном варианте осуществления, полезный груз согласно изобретению может представлять собой ХАР CD276 (с внутриклеточными доменами CD28, 4-1BB и CD3 дзета), который не демонстрирует повышенный уровень маркеров, связанных с ранним истощением Т-лимфоцитов (смотрите международную публикацию патента № WO2017044699; содержание которого включено посредством ссылки в полном объеме).

[00403] В некоторых вариантах осуществления, композиции согласно данному изобретению могут быть использованы для изменения популяций TIL (инфильтрирующих в опухоль лимфоцитов) у субъекта. В одном варианте осуществления, любой из полезных грузов, описанных в данном документе, можно использовать для изменения соотношения CD4-положительных клеток к CD8-положительным популяциям. В некоторых вариантах осуществления, TIL могут быть отсортированы *ex vivo* и сконструированы для экспрессии любого из цитокинов, описанных в данном документе. Полезные грузы согласно изобретению могут быть использованы для размножения популяций TIL CD4 и/или CD8 для усиления опосредованного TIL иммунного ответа.

2. Противораковые вакцины

[00404] В некоторых вариантах осуществления, биоконтуры, эффекторные модули, представляющие интерес полезные грузы (иммунотерапевтические агенты), векторы, клетки и композиции согласно данному изобретению могут использоваться в сочетании с противораковыми вакцинами.

[00405] В некоторых вариантах осуществления, противораковая вакцина может содержать пептиды и/или белки, полученные из ассоциированного с опухолью антигена (АОА). Такие стратегии могут использоваться для вызова иммунного ответа у субъекта, который в некоторых случаях может представлять собой ответ цитотоксического Т-лимфоцита (ЦТЛ). Пептиды, используемые для противораковых вакцин, также могут быть модифицированы для соответствия мутационному профилю субъекта. Например, пептиды, полученные из EGFR, с мутациями которые соответствуют мутациям, обнаруженным у субъекта, нуждающегося в терапии, успешно используются для пациентов с раком легких (Li F et al. (2016) *Oncoimmunology*. Oct 7;5(12): e1238539; содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

[00406] В одном варианте осуществления, противораковые вакцины согласно данному изобретению могут быть суперагонистами к измененным пептидным лигандам (APL), полученным из АОА. Эти мутантные пептидные лиганды отличаются от нативной пептидной последовательности одной или большим количеством аминокислот, которые активируют специфические клоны ЦТЛ более эффективно, чем нативные эпитопы. Эти изменения могут позволить пептиду лучше связываться с ограничивающей молекулой ГКГС класса I или более благоприятно взаимодействовать с ТКР данного подмножества опухоль-специфичных ЦТЛ. APL могут быть выбраны с использованием способов, описанных в публикации патента США № US20160317633A1, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

3. Комбинированные терапии

[00407] В некоторых вариантах осуществления, желательно комбинировать композиции, векторы и клетки согласно изобретению для введения субъекту. Композиции согласно изобретению, содержащие различные иммунотерапевтические агенты, можно использовать в комбинации для улучшения иммунотерапии.

[00408] В некоторых вариантах осуществления, желательно комбинировать композиции согласно изобретению с адъювантами, которые могут усиливать эффективность и продолжительность антиген-специфических иммунных ответов. Адъюванты, используемые в качестве иммуностимуляторов в комбинированной терапии, включают в себя биологические молекулы или носители, которые доставляют антигены. В качестве неограничивающих примеров, композиции согласно изобретению можно комбинировать с биологическими адъювантами, такими как цитокины, Toll-подобные рецепторы,

бактериальные токсины и/или сапонины. В других вариантах осуществления, композиции согласно данному изобретению можно комбинировать с носителями для доставки. Иллюстративные носители доставки включают в себя полимерные микрогранулы, иммуностимулирующие комплексы, эмульсии (масло в воде или вода в масле), соли алюминия, липосомы или виросомы.

[00409] В некоторых вариантах осуществления, иммунные эффекторные клетки, модифицированные для экспрессии биоконтуров, эффекторных модулей, ДД и полезных грузов согласно изобретению, могут комбинироваться с биологическими адьювантами, описанными в данном документе. Двойная регуляция ХАР и цитокинов и лигандов для отделения кинетического контроля опосредованной мишенью активации от внутренней экспансии Т-лимфоцитов. Такая двойная регуляция также сводит к минимуму потребность в режимах предварительной адаптации пациентов. В качестве неограничивающего примера, ДД регулирует ХАР, например, ХАР CD19 может быть скомбинирован с цитокинами, например, ИЛ12 для усиления противоопухолевой активности ХАР (Pegram H.J., et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete ИЛ12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood*.2012;119:4133–41; содержания которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). В качестве другого неограничивающего примера Merchant et al. скомбинировали вакцины на основе дендритных клеток с рекомбинантным ИЛ7 человека для улучшения исхода у пациентов-детей с высокой степенью риска саркомы (Merchant, M.S et. al. Adjuvant immunotherapy to Improve Outcome in High-Risk Pediatric Sarcomas. *Clin Cancer Res*. 2016. 22(13):3182-91; содержания которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

[00410] В некоторых вариантах осуществления, иммунные эффекторные клетки, модифицированные для экспрессии одного или большего количества антиген-специфических ТКР или ХАР, можно комбинировать с композициями согласно изобретению, содержащими иммунотерапевтические агенты, которые преобразуют иммуносупрессивное опухолевое микроокружение.

[00411] В одном аспекте, могут быть скомбинированы эффекторные иммунные клетки, модифицированные для экспрессии ХАР, специфичных к разным молекулам-мишеням в одной и той же клетке. В другом аспекте, различные иммунные клетки, модифицированные для экспрессии одной и той же конструкции ХАР, такие как НК-клетки и Т-лимфоциты, можно использовать в комбинации для лечения опухоли, например, Т-лимфоцит, модифицированный для экспрессии ХАР CD19, может быть скомбинирован с НК-клеткой, модифицированной для экспрессии того же ХАР CD19, для лечения В-клеточного злокачественного новообразования.

[00412] В других вариантах осуществления, иммунные клетки, модифицированные для экспрессии ХАР, могут комбинироваться с агентами блокады контрольных точек.

[00413] В некоторых вариантах осуществления, иммунные эффекторные клетки, модифицированные для экспрессии биоконтуров, эффекторных модулей, ДД и полезных грузов согласно изобретению, могут быть скомбинированы с противораковыми вакцинами согласно изобретению.

[00414] В некоторых вариантах осуществления, способы согласно изобретению могут включать в себя комбинирование композиций согласно изобретению с другими агентами, эффективными для лечения рака, инфекционных заболеваний и других иммунодефицитных нарушений, например противораковыми агентами. Как применяется в данном документе, термин «противораковый агент» относится к любому агенту, который способен отрицательно влиять на рак у субъекта, например, убивая раковые клетки, индуцируя апоптоз в раковых клетках, уменьшая скорость роста раковых клеток, уменьшая частоту или

количество метастазов, уменьшая размер опухоли, ингибируя рост опухоли, уменьшая кровоснабжения опухоли или раковых клеток, стимулируя иммунный ответ против раковых клеток или опухоли, предотвращая или ингибируя прогрессирования рака, или увеличивая продолжительность жизни субъект с раком.

[00415] В некоторых вариантах осуществления, противораковый агент или терапия может представлять собой химиотерапевтический агент или лучевую терапию, иммунотерапевтический агент, хирургическое вмешательство или любой другой терапевтический агент, который в комбинации с данным изобретением повышает терапевтическую эффективность лечения.

[00416] В одном варианте осуществления, эффекторный модуль, содержащий XAP CD19, можно использовать в комбинации с производными аминопиримидина, такими как ингибитор тирозин-рецепторной киназы лимфомы Беркитта (ВТК), с использованием способов, описанных в международной заявке на патент № WO2016164580, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00417] В некоторых вариантах осуществления, композиции согласно данному изобретению могут быть использованы в комбинации с иммунотерапевтическими агентами, отличными от терапии согласно изобретению, описанной в данном документе, такими как антитела, специфичные к некоторым молекулам-мишеням на поверхности опухолевой клетки.

[00418] Иллюстративные химиотерапевтические препараты включают в себя, без ограничения, Ацивирин; Акларубин; Акодазол гидрохлорид; Акронин; Адозелезин; Алдеслейкин; Алтретамин; Амбромидин; Амелантрон ацетат; Амсакин; Анастрозол; Антрамицин; Аспарагиназу; Асперрин, Сулидак, Куркумин, алкилирующие агенты, включая азотистые иприты, такие как мехлор-этамин, циклофосфамид, ифосфамид, мелфалан и хлорамбуцил; нитрозомочевины, такие как кармустин (BC U), ломустин (CCNU) и семустин (метил-CC U); тиленимины/метилмеламин, такой как триэтиленмеламин (ТЕМ), триэтилен, тиофосфориамид (тиотепа), гексаметилмеламин (ГММ, альтретамин); алкилсульфонаты, такие как бусульфид; триазины, такие как дакарбазин (DTIC); антиметаболиты, включая аналоги фолиевой кислоты, такие как метотрексат и триметотрексат, аналоги пирролидина, такие как 5-фторурацил, фтордезоксидитидин, гемцитабин, цитозина арабинозид (АгаС, цитарабин), 5-азацитидин, 2,2'-дифтордезоксидитидин, аналоги пурина, такие как 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, азатиоприн, 2'-дезоксикоформин (пентостатин), эритрогидроксиниладенин (EHNA), флударабинфосфат и 2-хлордезоксиденозин (кладрибин, 2-CdA); натуральные продукты, в том числе антимитотические лекарственные средства, такие как паклитаксел, алкалоиды барвинка, включая винбластин (VLB), винкристин, и винорелбин, таксотер, эстрамустин и эстрамустинфосфат; эпиподофилотоксины, такие как этопозид и тенипозид; антибиотики, такие как актиномицин D, дауномицин (рубидомицин), доксорубин, митоксантрон, идарубин, блеомицин, пликамицин (митрамицин), митомицин С и актиномицин; ферменты, такие как L-аспарагиназа, цитокины, такие как интерферон (ИФН) -гамма, фактор некроза опухоли (ФНО)-альфа, ФНО-бета и GM-CSF, антиангиогенные факторы, такие как ангиостатин и эндостатин, ингибиторы FGF или VEGF такие как растворимые формы рецепторов для ангиогенных факторов, включая растворимые рецепторы VGF/VEGF, координационные комплексы платины, такие как цисплатины и карбоплатин, антрацендионы, такие как митоксантрон, замещенные мочевины, такие как гидроксимочевина, производные метилгидразина, включая N-метилгидразин (MIFf) и прокарбазин, адренкортикальные подавители, такие как митотан (o,p'-DDD) и аминоклотетимид; гормоны и антагонисты, включая антагонисты адренкортикостероидов, такие как

преднизон и эквиваленты, дексаметазон и аминоглютетимид; прогестины, такие как гидроксипрогестерона капроат, медроксипрогестерона ацетат и мегестрола ацетат; эстрогены, такие как эквиваленты диэтилстильбэстрола и этинилэстрадиола; антиэстрогены, такие как тамоксифен; андрогены, включая тестостерона пропионат и флуоксиместерон/эквиваленты; антиандрогены, такие как флутамид, аналоги гонадотропин-рилизинг гормона и лейпролид; нестероидные антиандрогены, такие как флутамид; ингибиторы киназ, ингибиторы гистондеацетилаз, ингибиторы метилирования, ингибиторы протеасом, моноклональные антитела, окислители, антиоксиданты, ингибиторы теломеразы, миметики ВНЗ, ингибиторы убиквитинлигаз, ингибиторы STAT и ингибиторы рецепторных тирозин киназ, такие как иматиниб мезилат (продаются как Gleeevac или Glivac) и эрлотиниб (ингибитор рецептора EGF) в настоящее время на рынке как Tarvesa; противовирусные препараты, такие как озельтамивир фосфат, амфотерицин В, и паливизумаб; миметики SDI 1; семустин; ингибитор 1, полученный из стареющих клеток; спафосиевая кислота; спикамицин D; спиромустин; спленопентит; спонгистатин 1; скваламин; стипиамид; ингибиторы стромелизина; сульфинозин; антагонист суперактивного вазоактивного пептида кишечника; веларезол; верамин; вердин; вертепорфин; винорелбин; винксалтин; витаксин; ворозол; занотерон; зениплатин; зиласкорб; и зиностатин стимуламер; ингибитор-малая молекула PI3K β , GSK2636771; ингибитор пан-PI3K (BKM120); ингибиторы BRAF. Вемурафениб (Zelboraf) и дабрафениб (Tafinlar); или любой аналог или производное и вариант вышеперечисленного.

[00419] Радиотерапевтические агенты и факторы включают в себя излучение и волны, которые индуцируют повреждение ДНК, например, γ -облучение, рентгеновские лучи, УФ-облучение, микроволновое радиоизлучение, испускание электронов, радиоизотопы, и тому подобные. Терапия может быть выполнена путем облучения сайта локализованной опухоли с помощью описанных выше форм излучения. Наиболее вероятно, что все эти факторы дают широкий спектр повреждений ДНК, предшественников ДНК, репликации и восстановления ДНК, а также сборку и поддержание хромосом. Интервал величины дозы для рентгеновских лучей колеблется от суточных доз, составляющих от 50 до 200 рентген в течение длительных периодов времени (от 3 до 4 недель), до однократных доз, составляющих от 2000 до 6000 рентген. Диапазоны доз для радиоизотопов варьируют в широких пределах и зависят от времени полураспада изотопа, силы и типа испускаемого излучения, и поглощение опухолевыми клетками.

[00420] В некоторых вариантах осуществления, химиотерапевтический агент может представлять собой иммуномодулирующий агент, такой как леналидомид (LEN). Недавние исследования показали, что леналидомид может усилить противоопухолевые функции XAP модифицированных Т-лимфоцитов (Otahal et al., *Oncoimmunology*, 2015, 5(4): e1115940). Некоторые примеры противоопухолевых антител включают в себя тоцилизумаб, силтуксимаб.

[00421] Другие агенты, которые могут быть использованы в комбинации с композициями согласно изобретению могут также включать в себя, но не ограничиваются лишь этими: агенты, которые влияют на активацию рецепторов клеточной поверхности и их лиганды, такие как Fas/Fas-лиганд, DR4 или DR5/TRAIL и щелевые контакты, цитостатические агенты и агенты дифференциации, ингибиторы клеточной адгезии, такие как ингибиторы киназы фокальной адгезии (Faks) и ловастатин, или агенты, которые повышают чувствительность гипер-пролиферативных клеток к апоптотическим индукторам, такие как антитела C225.

[00422] Комбинации могут включать в себя введение композиции согласно изобретению и других агентов, одновременно или по отдельности. В альтернативном варианте, нынешняя иммунотерапия может

предшествовать или следовать за другим агентом/терапией с интервалами в диапазоне нескольких минут, дней, недель или месяцев.

4. Болезни

[00423] Согласно данному изобретению предложен способ уменьшения объема опухоли или нагрузки у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ включает в себя введение в субъекту композиции согласно изобретению.

[00424] Согласно данному изобретению также предложены способы лечения рака у субъекта, включающие в себя введение субъекту эффективного количества иммунных эффекторных клеток, генетически модифицированных, чтобы экспрессировать по меньшей мере один эффекторный модуль согласно изобретению.

Рак

[00425] Можно лечить различные виды рака с помощью фармацевтических композиций, биоконтуров, компонентов биоконтуров, эффекторных модулей, включая их ЭОС или полезные грузы согласно данному изобретению. Как применяется в данном документе, термина «рак» относится к любому из различных злокачественных новообразований, характеризующихся распространением анапластических клеток, которые имеют тенденцию к вторжению в окружающие ткани и метастазированию в новые участки тела, а также относится к патологическому состоянию, характеризующемуся ростом злокачественного новообразования. Виды рака могут представлять собой опухоли или гематологические злокачественные новообразования, и включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: все типы лимфом/лейкозов, карциномы и саркомы, такие, как те виды рака или опухолей, которые обнаруживаются в заднем проходе, мочевом пузыре, желчных протоках, костях, мозге, молочных железах, шейке матки, толстой кишке/прямой кишке, эндометрии, пищеводе, глазе, желчном пузыре, голове и шее, печени, почке, гортани, легком, средостенье (грудь), во рту, яичниках, поджелудочной железе, половом члене, предстательной железе, коже, тонкой кишке, желудке, спинном мозге, копчике, яичках, щитовидной железе и матке.

[00426] Виды карцином, которые можно лечить с помощью композиций согласно данному изобретению, включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: папиллому/карциному, хориокарциному, опухоли эндодермальной пазухи, тератому, аденому/ аденокарциному, меланому, фиброму, липому, лейомиому, рабдомиому, мезотелиому, ангиому, остеому, хондрому, глиому, лимфому/лейкоз, плоскоклеточную карциному, мелкоклеточную карциному, крупноклеточные недифференцированные карциномы, базально-клеточную карциному и синоназальную недифференцированную карциному.

[00427] Виды карцином, которые можно лечить с помощью композиций согласно данному изобретению, включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: саркомы мягких тканей, например альвеолярную саркому мягких тканей, ангиосаркому, дерматофибросаркому, десмоидную опухоль, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, внескелетную хондросаркому, внескелетную остеосаркому, фибросаркому, гемангиоперицитому, гемангиосаркому, саркому Капоши, лейомиосаркому, липосаркому, лимфангиосаркому, лимфосаркому, злокачественную фиброзную гистиоцитому, нейрофибросаркому, рабдомиосаркому, синовиальную саркому, и опухоль Аскина, саркому Юинга (примитивная нейроэктодермальная опухоль), злокачественную гемангиоэндотелиому, злокачественную шванному, остеосаркому, и хондросаркому.

[00428] В качестве неограничивающего примера, карцинома, которую могут лечить, может представлять собой: острый гранулоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, острую гранулоцитарную

лейкемию, аденокарциному, аденосаркому, рак надпочечников, адренокортикальную карциному, анальный рак, анапластическую астроцитому, ангиосаркому, рак аппендикса, астроцитому, базальноклеточную карциному, В-лимфоцитарную лимфому, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак костей, рак кишечника, рак головного мозга, глиому ствола мозга, опухоль головного мозга, рак молочной железы, карциноидные опухоли, рак шейки матки, холангиокарциному, хондросаркому, хронический лимфолейкоз, хронический миелоидный лейкоз, рак толстой кишки, колоректальный рак, краниофарингиому, кожную лимфому, меланому кожи, диффузную астроцитому, протоковую карциному *in situ*, рак эндометрия, эпендимому, эпителиоидную саркому, рак пищевода, саркому Юинга, рак внепеченочного желчного протока, рак глаза, рак фаллопиевой трубы, фибросаркому, рак желчного пузыря, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, карциноидный рак желудочно-кишечного тракта, стромальную опухоль желудочно-кишечного тракта, общее, герминогенную опухоль, мультиформную глиобластому, глиому, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, гемангиоэндотелиому, лимфому Ходжкина, болезнь Ходжкина, лимфому Ходжкина, гипофарингеальный рак, инфильтрирующуюся протоковую карциному, инфильтрирующуюся дольковую карциному, воспалительный рак молочной железы, рак кишечника, рак внутрипеченочных желчных протоков, инвазивный/инфильтрирующий рак молочной железы, рак островковых клеток поджелудочной железы, рак челюсти, саркому Капоши, рак почки, рак гортани, лейомиосаркому, лептоменингеальные метастазы, лейкоз, рак губ, липосаркому, рак печени, дольковый рак *in situ*, астроцитому низкой степени злокачественности, рак легкого, рак лимфатических узлов, лимфому, мужской рак молочной железы, медуллярную карциному, медуллобластому, меланому, менингиому, карциному из клеток Меркель, мезенхимальную хондросаркому, мезенхиому, мезотелиому, метастатический рак молочной железы, метастатическую меланому, метастатический плоскоклеточный рак шеи, смешанные глиомы, рак полости рта, слизистую карциному, меланому слизистых оболочек, множественную миелому, рак носовой полости, рак носоглотки, рак шеи, нейробластому, нейроэндокринные опухоли, неходжкинскую лимфому, неходжкинские лимфомы, немелкоклеточный рак легкого, овсяно-клеточный рак легкого, рак глаза, меланому глаза, олигодендроглиому, рак ротовой полости, рак полости рта, рак ротоглотки, остеогенную саркому, остеосаркому, рак яичников, эпителиальный рак яичников, эмбрионально-клеточную опухоль яичников, первичную перитонеальную карциному яичников, стромальную опухоль зародышевых тяжей яичников, болезнь Паджета, рак поджелудочной железы, папиллярную карциному, рак придаточных пазух носа, паратиреоидный рак, рак таза, рак полового члена, рак периферического нерва, фарингеальный рак, феохромоцитому, волосовидную астроцитому, опухоль пинельной области, пинеобластому, рак гипофиза, первичную лимфому центральной нервной системы, рак простаты, рак прямой кишки, рак почек, рак почечной лоханки, рабдомиосаркому, рак слюнных желез, саркому, саркому костей, саркому мягких тканей, саркому матки, рак носовой пазухи, рак кожи, мелкоклеточный рак легкого, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, рак позвоночника, рак хребта, рак спинного мозга, опухоль позвоночника, плоскоклеточную карциному, рак желудка, синовиальную саркому, Т-лимфоцитарную лимфому, рак яичка, рак горла, тимому/карциному вилочковой железы, рак щитовидной железы, рак языка, рак миндалин, рак переходных клеток, тройной негативный рак молочной железы, рак фаллопиевых труб, карциному фаллопиевых труб, рак мочеоточника, аденокарциному матки, рак матки, саркому матки, рак влагалища и рак вульвы.

Инфекционные заболевания

[00429] В некоторых вариантах осуществления, биоконтур согласно изобретению может быть использован для лечения инфекционных заболеваний. Биоконтур согласно изобретению могут быть

введены в клетки, подходящие для адаптивного переноса клеток, например макрофаги, дендритные клетки, клетки естественные киллеры, и/или Т-лимфоциты. Инфекционные заболевания, которые лечат с помощью биоконтуров согласно изобретению могут представлять собой заболевания, вызываемые вирусами, бактериями, грибами, и/или паразитами. Полезные грузы ИЛ15-ИЛ15Ra согласно изобретению могут быть использованы для увеличения пролиферации иммунных клеток и/или устойчивости иммунных клеток, полезных в лечении инфекционных заболеваний.

[00430] «Инфекционные болезни» в данном описании относятся к заболеваниям, вызванным любым патогеном или агентом, инфицирующим клетки млекопитающих, предпочтительно клетки человека, и вызывающим состояние болезни. Их примеры включают в себя бактерии, дрожжи, грибы, простейшие, микоплазмы, вирусы, прионы, и паразиты. Примеры включают в себя те, которые вовлечены в (a) вирусные заболевания, такие как, например, заболевания, возникающие в результате инфекции, вызванной аденовирусом, герпесвирусом (например, HSV-I, HSV-II, ЦМВ, или VZV), поксвирусом (например, ортопоксвирусом, таким как оспа или вирус осповакцины, или контагиозный моллюск), пикорнавирусом (например, риновирусом или энтеровирусом), ортомиксовирусом (например, вирусом гриппа), парамиксовирусом (например, вирусом парагриппа, вирусом эпидемического паротита, вирусом кори и респираторно-синцитиальным вирусом (RSV)), коронавирусом (например, SARS), паповавирусом (например, папилломавирусами, такими как те, которые вызывают генитальные бородавки, обычные бородавки или подошвенные бородавки), гепаднавирусом (например, вирусом гепатита В), флавивирусом (например, вирусом гепатита С или вирусом Денге), или ретровирусом (например, лентивирусом, таким как ВИЧ); (b) бактериальные заболевания, такие как, например, заболевания, возникающие в результате инфицирования бактериями, например, рода *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Listeria*, *Aerobacter*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Pneumococcus*, *Neisseria*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Serratia*, *Providencia*, *Chromobacterium*, *Brucella*, *Yersinia*, *Haemophilus*, *Bordetella*, или; (c) другие инфекционные заболевания, например хламидии, грибковые заболевания, включая, но не ограничиваясь лишь этими: кандидоз, аспергиллез, гистоплазмоз, криптококковый менингит; паразитарные заболевания, включая, но не ограничиваясь лишь этими: малярию, пневмоцистную пневмонию, лейшманиоз, криптоспоридиоз, токсоплазмоз, и трипаносомную инфекцию, и прионы, которые вызывают болезни человека, такие как болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ), вариант болезни Крейтцфельда-Якоба (вБКЯ), синдром Гершмана-Штраусслера-Шейнкера, фатальную семейную бессонницу и куру.

5. Микробиом

[00431] Изменения в составе микробиома могут повлиять на действие анти-раковой терапии. Разнообразные сообщества симбиотических, синантропных и патогенных микроорганизмов, существуют во всех открытых окружающей среде участках организма, и в данном документе упоминаются как «микробиом». Открытые окружающей среде участки тела, которые могут быть заселены микробиомом включают в себя кожу, носоглотку, ротовую полость, дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт, и репродуктивный тракт.

[00432] В некоторых вариантах осуществления, нативный микробиом или микробиом с встроенными иммунотерапевтическими агентами может быть использован для повышения эффективности анти-раковых иммунотерапий. Способы использования микробиома, чтобы улучшить ответ на иммунотерапевтические агенты были описаны Sivan et al. (Sivan A., et al. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and

facilitates anti-PD-L1 efficacy. Science 2015; 350:1084–9; содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). В одном варианте осуществления, белок, РНК и/или другие биомолекулы, получаемые из микробиома, могут быть использованы в качестве полезного груза, чтобы влиять на эффективность анти-раковой иммунотерапии.

6. Инструменты и агенты для создания терапевтических средств

[00433] Согласно данному изобретению предложены инструменты и агенты, которые могут быть использованы для получения иммунотерапевтических агентов для уменьшения объема опухоли или опухолевой нагрузки у субъекта, нуждающегося в этом. Значительное число переменных вовлечено в производство терапевтического агента, таких как структура полезного груза, тип клеток, способ переноса гена, способ и время *ex vivo* экспансии, предварительная адаптация, и количество и тип опухолевой нагрузки у субъекта. Такие параметры могут быть оптимизированы с помощью инструментов и агентов, описанных в данном документе.

Клеточные линии

[00434] Согласно данному изобретению предложена клетка млекопитающего, которая была генетически модифицирована композициями согласно изобретению. Подходящие клетки млекопитающих включают в себя первичные клетки и immortalized клеточные линии. Подходящие клеточные линии млекопитающих включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: клеточная линия 293 из почки эмбриона человека, клеточная линия фибробластов NIH 3T3, клеточная линия колоректальной карциномы человека HCT116, клеточная линия карциномы яичников SKOV-3, immortalized линии Т-лимфоцитов (например, клетки Jurkat и клетки SupT1), клеточная линия Raji из клеток лимфомы, клетки NALM-6, клетки K562, клетки HeLa, клетки PC12, клетки HL-60, линии клеток NK (например, NKL, NK92, NK962, и YTS), и тому подобное. В некоторых случаях, клетка не является immortalized клеточной линией, но вместо этого клетка получена от индивида, и в данном описании упоминается как первичная клетка. Например, клетка представляет собой Т-лимфоцит, полученный от индивида. Другие примеры включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: цитотоксические клетки, стволовые клетки, мононуклеарные клетки периферической крови или клетки-предшественницы, полученные от индивида.

Отслеживание ЭОС, биоконтуры и клеточные линии

[00435] В некоторых вариантах осуществления, может быть желательно отслеживать композиции согласно изобретению или клетки, модифицированные в композициями согласно изобретению. Отслеживание может выполняться с использованием репортерных фрагментов, которые, как они использованы в данном документе, относятся к любым белкам, способным создавать обнаруживаемый сигнал, в ответ на стимул. Примеры включают в себя щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу, хлорамфеникол ацетилтрансферазу, бета-глюкуронидазу, пероксидазу, β -лактамазу, каталитические антитела, биолюминесцентные белки, люциферазу, и флуоресцентные белки, такие как зеленый флуоресцентный белок (GFP).

[00436] Репортерные фрагменты могут быть использованы для мониторинга ответа ДД при добавлении лиганда, соответствующего ДД. В других случаях, репортерные фрагменты могут быть использованы для отслеживания выживаемости клеток, устойчивости, клеточного роста и/или локализации в пробирке *in vitro*, *in vivo*, или *ex vivo*.

[00437] В некоторых вариантах осуществления, предпочтительный репортерный фрагмент может представлять собой люциферазный белок. В одном варианте осуществления, репортерный фрагмент

представляет собой люциферазу Renilla (SEQ ID NO: 866, кодируемая нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 867), или люциферазу светлячка (SEQ ID NO: 868, кодируемая нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 869).

Животные модели

[00438] Полезность и эффективность композиций согласно данному изобретению могут быть испытаны на *in vivo* животных моделях, предпочтительно мышинных моделях. Мышиные модели, которые используют, могут быть сингенными мышинными моделями, причем клетки мыши модифицируют композициями согласно изобретению, и тестируют на мышах с одинаковым генетическим фоном. Примеры включают в себя мышинные модели pMEL-1 и 4T1. В альтернативном варианте, ксенотрансплантатные модели, где человеческие клетки, такие как опухолевые клетки и иммунные клетки вводят в иммунодефицитным мышам также могут быть использованы в таких исследованиях. Иммунодефицитные мыши, которых используют, могут представлять собой CByJ.Cg-Foxn1^{nu}/J, B6.129S7-Rag1^{tm1Mom}/J, B6.129S7-Rag1^{tm1Mom}/J, B6. CB17-Prkdc^{scid}/SzJ, NOD.129S7(B6)-Rag1^{tm1Mom}/J, NOD.Cg-Rag1^{tm1Mom}Prf1^{tm1Sd}/SzJ, NOD.CB17-Prkdc^{scid}/SzJ, NOD.Cg-Prkdc^{scid}B2m^{tm1Unc}/J, NOD-scid ИЛ2Rg^{null}, мыши Nude (nu), мыши SCID, мыши NOD, мыши RAG1/RAG2, мыши NOD-Scid, ИЛ2rg нокаутные мыши, b2m нокаутные мыши, NOD-scid ИЛ2r⁺нокаутные мыши, NOD-scid-B2m нокаутные мыши, мыши beige, и трансгенные мыши HLA.

Клеточные анализы

[00439] В некоторых вариантах осуществления, эффективность композиций согласно изобретению в качестве иммунотерапевтических агентов может быть оценена с использованием клеточных анализов. Уровни экспрессии и/или идентичности композиций согласно изобретению могут быть определены в соответствии с любыми способами, известными в данной области техники для идентификации белков и/или количественного определения уровней белков. В некоторых вариантах осуществления, такие способы могут включать в себя Вестерн-блоттинг, проточную цитометрию, и иммунологические анализы.

[00440] В данном документе предложены способы для функциональной характеристики клеток, экспрессирующих ЭОС, биоконтуров и композиций согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления, функциональную характеристику проводят на первичных иммунных клетках или immortalized линиях иммунных клеток, и она может быть определена путем экспрессии маркеров клеточной поверхности. Примеры поверхностных клеточных маркеров для Т-лимфоцитов, включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: CD3, CD4, CD8, CD 14, CD20, CD11b, CD16, CD45 и HLA-DR, CD 69, CD28, CD44, ИФН-гамма. Маркеры для истощения Т-лимфоцитов включают в себя PD1, TIM3, BTLA, CD160, CD39, 2B4 и LAG-3. Примеры маркеров клеточной поверхности для антиген-презентирующих клеток включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: ГКГС класса I, ГКГС класса II, CD40, CD45, B7-1, B7-2, рецептор ИФН-γ и рецептор ИЛ-2, ICAM-1 и/или рецептор Fcγ. Примеры маркеров клеточной поверхности для дендритных клеток включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: ГКГС класса I, ГКГС класса II, B7-2, CD18, CD29, CD31, CD43, CD44, CD45, CD54, CD58, CD83, CD86, CMRF- 44, CMRF- 56, DCIR и/или Dectin-1 и т. п.; а в некоторых случаях также не имеют CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD16, CD 19, CD20, CD56 и/или CD57. Примеры маркеров клеточной поверхности для клеток NK включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: CCL3, CCL4, CCL5, CCR4, CXCR4, CXCR3, NKG2D, CD71, CD69, CCR5, фосфо JAK/STAT, фосфо ERK, фосфо p38/MAPK, фосфо АКТ, фосфо STAT3, гранулизин, гранзим В, гранзим К, ИЛ10, ИЛ22, ИФН-гамма, LAP, перфорин и ФНО-альфа.

V. СРЕДСТВА ДОСТАВКИ И/ИЛИ ВЕКТОРЫ

Векторы

[00441] Согласно данному изобретению также предложены векторы, которые упаковывают полинуклеотиды согласно изобретению, кодирующие биоконтуры, эффекторные модули, конструкции ЭОС (ДД) и полезных грузов, а также их комбинации. Векторы согласно данному изобретению также могут быть использованы для доставки упакованных полинуклеотидов в клетку, локальный сайт ткани или субъект. Эти векторы могут быть любого типа, включая векторы ДНК, векторы РНК, плазмиды, вирусные векторы и частиц. Технология вирусных векторов хорошо известна и описана в Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Вирусы, которые могут быть использованы в качестве векторов включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, векторы на основе адено-ассоциированных вирусов (AAV), векторы на основе вируса простого герпеса, ретровирусные векторы, онколитические вирусы и т. п.

[00442] В целом, как правило, векторы содержат сайт начала репликации, функциональный в по меньшей мере, одном организме, последовательность промотора и удобный сайт эндонуклеаз рестрикции, и один или большее количество селективных маркеров, например, ген устойчивости к лекарственному средству.

[00443] Как применяется в данном документе, промотор определяется как последовательность ДНК, распознаваемая аппаратом транскрипции клетки, необходимая для инициации специфической транскрипции полинуклеотидной последовательности согласно данному изобретению. Векторы могут содержать нативные или ненативные промоторы, функционально связанные с полинуклеотидами согласно изобретению. Промоторы могут быть сильными, слабыми, конститутивными, индуцируемыми, тканеспецифичными, специфичными для стадии развития, и/или специфичными для организма. Одним из примеров подходящего промотора является последовательность немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (ЦМВ). Эта последовательность промотора является последовательностью сильного конститутивного промотора, способного создавать высокие уровни экспрессии полинуклеотидной последовательности, которая функционально с ним связана. Другим примером предпочтительного промотора является фактор элонгации-1 альфа (EF-1-альфа). Могут также быть использованы другие конститутивные промоторы, включая, но не ограничиваясь лишь этими: промотор вируса обезьян 40 (SV40), вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор длинного концевой повтора (LTR), промотор вируса птичьего лейкоза, немедленно-ранний промотор вирус Эпштейна-Барр, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, включая, но не ограничиваясь промотором фосфоглицераткиназы (PGK), промотором актина, промотором миозина, промотором гемоглобина, промотором убиквитина С (UBC), промотором малого ядерного белка U6 человека и промотором креатинкиназы. В некоторых случаях, могут быть использованы индуцируемые промоторы, такие как, но не ограничиваясь лишь этими: промотор металлотионеина глюкокортикоидной промотор, промотор прогестерона, и промотора тетрациклина. В некоторых вариантах осуществления, промотор может быть выбран из SEQ ID NO: 716-718.

[00444] В некоторых вариантах осуществления, оптимальный промотор может быть выбран на основании его способности достигать минимальной экспрессии ЭОС и полезных грузов согласно изобретению в отсутствие лиганда, и детектируемой экспрессии в присутствии лиганда.

[00445] Дополнительные элементы промотора, например, энхансеры могут быть использованы для регуляции частоты инициации транскрипции. Такие области могут быть расположены на 10-100 пар оснований выше или ниже стартового сайта. В некоторых случаях, два или большее количество

промоторных элементов могут быть использованы для совместной или независимой активации транскрипции.

[00446] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный вектор экспрессии может содержать регуляторные последовательности, такие как кодоны инициации и терминации транскрипции и трансляции, которые являются специфическими для типа клетки-хозяина, в которую должен быть введен вектор.

1. Лентивирусные векторы

[00447] В некоторых вариантах осуществления, в качестве носителей и средств доставки могут быть использованы лентивирусные векторы/частицы. Лентивирусы являются подгруппой семейства вирусов *Retroviridae*, названные так, потому что до интеграции в геном хозяина требуется обратная транскрипция вирусного РНК-генома в ДНК. Таким образом, наиболее важные признаки лентивирусных носителей/частиц представляют собой интеграцию их генетического материала в геном мишени/клетки-хозяина. Некоторые примеры лентивирусов включают в себя вирусы иммунодефицита человека: ВИЧ-1 и ВИЧ-2, вирус иммунодефицита обезьян (SIV), кошачий вирус иммунодефицита (FIV), бычий вирус иммунодефицита (BIV), вирус болезни Джембраны (JDV), вирус инфекционной анемии лошадей (EIAV), вирус инфекционной анемии лошадей, вирус артрита-энцефалита коз и овец (CAEV).

[00448] Как правило, лентивирусные частицы, образующие носитель для доставки генов являются дефектными сами по себе (также упоминаются как «само-инактивирующиеся»). Лентивирусы способны заражать как делящиеся, так и неделящиеся клетки в силу механизма входа через неповрежденную ядерную оболочку хозяина (Naldini L et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1998, 9: 457-463). Рекомбинантные лентивирусные носители/частицы были получены путем многократного ослабления генов вирулентности ВИЧ, например, гены *Env*, *Vif*, *ВРР*, *VPU*, *Nef* и *Tat* удаляют, делая вектор биологически безопасным. Соответственно, лентивирусные носители, например, полученные из ВИЧ-1/ВИЧ-2 могут опосредовать эффективную доставку, интеграцию и долгосрочную экспрессию трансгена в непродлиферирующие клетки. Как применяется в данном документе, термин «рекомбинантный» относится к вектору или другой нуклеиновой кислоте, содержащим лентивирусные последовательности и нелентивирусные ретровирусные последовательности.

[00449] Лентивирусная частица может быть получена путем ко-экспрессии элементов упаковки вируса и самого генома вектора в продуцирующей клетке, например человеческих клетках НЕК293Т. Эти элементы, как правило, представлены в трех (в лентивирусных системах второго поколения) или четырех отдельных плазмидах (в лентивирусных системах третьего поколения). Продуцирующие клетки ко-трансфицируют с помощью плазмид, которые кодируют лентивирусные компоненты, включая ядро (то есть структурные белки) и ферментативные компоненты вируса, и белок(ки) оболочки (называемые системой упаковки), и плазида, которая кодирует геном, содержащий инородный трансген, должны быть перенесены в клетку-мишень, сам носитель (также упоминается как вектор переноса). В целом, как правило, плазмиды или векторы включают в продуцирующую клеточную линию. Плазмиды/векторы вводят с помощью трансфекции, трансдукции или инфекции в продуцирующую клеточную линию. Способы трансфекции, трансдукции или инфекции, хорошо известны специалистам в данной области техники. В качестве неограничивающего примера, конструкции упаковки и переноса могут быть введены в продуцирующие клеточные линии с помощью трансфекции с фосфатом кальция, липофекции или электропорации, как правило, вместе с доминантным маркером селекции, например, нео, DHFR, синтазой Gln или ADA, с последующим отбором в присутствии соответствующего лекарственного агента и выделением клонов.

[00450] Продуцирующие клетки производят рекомбинантные вирусные частицы, содержащие чужеродный ген, например, эффекторный модуль согласно данному изобретению. Рекомбинантные вирусные частицы выделяют из культуральной среды и титруют с помощью стандартных способов, используемые специалистами в данной области техники. Рекомбинантные лентивирусные носители могут быть использованы для инфицирования клеток-мишеней.

[00451] Клетки, которые могут быть использованы для получения высокого титра лентивирусных частиц могут включать в себя, но не ограничиваются лишь этими: клетки HEK293T, клетки 293G, клетки STAR (Relander et al., *Mol. Ther.*, 2005, 11: 452-459), система экспрессии FreeStyle™ 293 (ThermoFisher, Waltham, MA), и другие линии продуцирующих клеток на основе HEK293T (например, Stewart et al., *Hum Gene Ther.* 2011, 22(3):357-369; Lee et al., *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(9): 1551-1560; Throm et al., *Blood*. 2009, 113(21): 5104-5110; содержания которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

[00452] В некоторых аспектах, белки оболочки могут быть гетерологичными белками оболочки из других вирусов, такими как белок G вируса везикулярного стоматита (VSV G) или белки оболочки gp64 бакуловируса. Гликопротеин VSV-G может быть главным образом выбран среди видов, отнесенных к роду везикуловирусов: Караджа вирус (CJSV - *Carajas virus*), Чандипура вирус (CHPV - *Chandipura virus*), вирус Кокал (COCV), Исфахан вирус (ISFV - *Isfahan virus*), Мараба вирус (MARAV - *Maraba virus*), Пайри вирус (PIRYV - *Piry virus*), везикулярный стоматит Алаговас вирус (VSIV - *Vesicular stomatitis Alagoas virus*), везикулярный стоматит Индиана вирус (VSIV - *Vesicular stomatitis Indiana virus*) и везикулярный стоматит Нью-Джерси вирус (VSNJV - *Vesicular stomatitis New Jersey virus*), и/или штаммов, условно отнесенных в роду везикуловирусов, например Грасс карп рабдовирус (*Grass carp rhabdovirus*), вирус BeAn 157575 (BeAn 157575), Бойтеке вирус (BTKV - *Boteke virus*), Калчаки вирус *Calchaqui virus* (CQIV - *Calchaqui virus*), Ийл вирус американ (EVA - *Eel virus American*), Грей Лодж вирус (GLOV - *Gray Lodge virus*), Джурона вирус (JURY - *Jurona virus*), Клеймеф вирус (KLAV - *Klamath virus*), Квата вирус (KWAV - *Kwatta virus*), Ла Джоя вирус (LJV - *La Joya virus*), Мальпейс спринг вирус (MSPV - *Malpais Spring virus*), Манутайн Элгон бэг вирус (MEBV - *Mount Elgon bat virus*), Перинет вирус (PERV - *Perinet virus*), Пайк фрай рабдовирус (PFRV - *Pike fry rhabdovirus*), Портон вирус (PORV - *Porton virus*), Ради вирус (RADIV - *Radi virus*), Спринг виремия оф карп вирус (SVCV - *Spring viremia of carp virus*), Тупая вирус (TUPV - *Tupaia virus*), рабдовирус язвенной болезни (UDRV - *Ulcerative disease rhabdovirus*) и Йаг Богдановак вирус (YBV - *Yug Bogdanovac virus*). Gp64 или другой бакуловирусный белок env может быть получен из вируса ядерного полиэдроа *Autographa californica* (AcMNPV), вируса ядерного полиэдроа *Anagrapha falcifera*, вируса ядерного полиэдроа *Bombyx mori*, вируса ядерного полиэдроа *Choristoneura fumiferana*, однокапсидного вируса ядерного полиэдроа *Orgyia pseudotsugata*, вируса ядерного полиэдроа *Epiphyas postvittana*, вируса ядерного полиэдроа *Hyphantria cunea*, вируса ядерного полиэдроа *Galleria mellonella*, вируса Dhori, вируса Thogoto, вируса ядерного полиэдроа *Antheraea pernyi* или вируса Batken.

[00453] Дополнительные элементы, предложенные в лентивирусных частицах могут содержать ретровирусные LTR (длинный-концевой повтор) на любом 5' или 3' конце, ретровирусный элемент экспорта, необязательно лентивирусный элемент обратного ответа (RRE), промотор или активную его часть, а также область контроля локуса (LCR) или ее активную часть. Другие элементы включают в себя последовательность центрального полипуринового тракта (CPPT) для повышения эффективности трансдукции в неделящиеся клетки, посттранскрипционный регуляторный элемент (WPRE) вируса гепатита

сурков (WHP), который усиливает экспрессию трансгена, и увеличивает титр. Эффекторный модуль связан с вектором.

[00454] Способы получения рекомбинантных лентивирусных частиц обсуждаются в данной области техники, например, в патентах США № 8846385; 7745179; 7629153; 7575924; 7179903; и 6808905; содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00455] Лентивирусные векторы, которые используют, могут быть выбраны из, но не ограничиваются лишь этими: pLVX Plenti, pLenti6, pLJM1, FUGW, pWPXL, pWPI, Plenti ЦМВ Puro DEST, pLJM1-EGFP, pULTRA, pInducer20, pHIV-EGFP, pCW57.1, pTRPE, pELPS, pRRL и pLionII.

[00456] Также могут быть использованы лентивирусные носители, известные в данной области техники (смотрите, патенты США № 9260725; 9068199; 9023646; 8900858; 8748169; 8709799; 8420104; 8329462; 8076106; 6013516; и 5994136, международная публикация патента № WO2012079000; содержания которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

2. Ретровирусные векторы (γ-ретровирусные векторы)

[00457] В некоторых вариантах осуществления, ретровирусные векторы могут быть использованы для упаковки и доставки биоконтугов, компонентов биоконтугов, эффекторных модулей, ЭОС или конструкций полезных грузов согласно данному изобретению. Ретровирусные векторы (RV) делают возможной устойчивую интеграцию трансгена в клетки-мишени. В дополнение к лентивирусным векторам на основе комплекса ВИЧ-1/2, ретровирусные векторы, основанные на простых гамма-ретровирусах широко используются для доставки терапевтических генов и зарекомендовали себя в клинических условиях в качестве одних из наиболее эффективных и мощных систем доставки генов, способных к трансдукции широкого диапазона типов клеток. Примеры видов гамма-ретровирусов включают в себя вирусы лейкоза мыши (MLV) и вирусы лейкоза кошачьих (FeLV).

[00458] В некоторых вариантах осуществления, гамма-ретровирусные векторы, полученные из гамма-ретровирусов млекопитающего, таких как вирусы лейкоза мышей (MLV), являются рекомбинантными. Семейства гамма-ретровирусов MLV включают в себя экотропные, амфотропные, ксенотропные и политропные подсемейства. Экотропные вирусы способны заражать только мышинные клетки с использованием рецептора mCATom-1. Примеры экотропных вирусов представляют собой MLV и AKV Молоуни. Амфотропные вирусы заражают мышинные виды, людей и другие виды через рецептор Pit-2. Один пример амфотропного вируса представляет собой вирус 4070A. Ксенотропные и политропные вирусы используют тот же рецептор (Xpr1), но различаются по их видовому тропизму. Ксенотропные вирусы, такие как NZB-9-1, заражают человека и другие виды, но не мышинные виды, в то время как политропные вирусы, такие как бляшкообразующие вирусы (MCF) заражают мышинные виды, людей и другие виды.

[00459] Гамма-ретровирусные векторы могут быть получены в упаковывающих клетках путем ко-трансфекции клеток несколькими плазмидами, включая те, которые кодируют ретровирусный структурный и ферментативный (gag-pol) полипротеин, те, которые кодируют белок оболочки (env), и те, которые кодируют вектор мРНК, содержащий полинуклеотид, кодирующий композиции согласно данному изобретению, который должен быть упакован в новообразованные вирусные частицы.

[00460] В некоторых аспектах, рекомбинантный гамма-ретровирусный вектор псевдотипируют белками оболочки из других вирусов. Гликопротеины оболочки включают в наружный липидный шар вирусных частиц, которые могут увеличить/изменить тропизм клеток. Иллюстративные белки оболочки включают в себя белок оболочки вируса лейкемии гиббонов (Galv) или белок G вируса везикулярного стоматита (VSV-

G), или белок оболочки эндогенного ретровируса обезьян, или белки Н и F вируса кори, или белок оболочки gp120 вируса иммунодефицита человека, или белок оболочки везикуловirusа Cosal (смотрите, например, публикацию заявки США № 2012/164118; содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). В других аспектах, гликопротеины оболочки могут быть генетически модифицированы, чтобы внедрить нацеливающие/связывающие лиганды в гамма-ретровирусные векторы; связывающие лиганды, включают в себя, но не ограничены пептидными лигандами, одноцепочечными антителами и факторами роста (Wachler et al., *Nat. Rev. Genet.* 2007, 8(8):573–587; содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Эти сконструированные гликопротеины могут нацелить векторы на клетки, экспрессирующие их соответствующие фрагменты-мишени. В других аспектах, «молекулярный мостик» может быть введен, чтобы направить векторы к специфическим клеткам. Молекулярный мостик имеет двойную специфичность: один конец может распознавать вирусные гликопротеины, а другой конец может связываться с молекулярной детерминантой на клетке-мишени. Такие молекулярные мостики, например лиганд-рецептор, авидин-биотин, и химические соединения, моноклональные антитела и сконструированные фузогенные белки, могут направлять прикрепление вирусных векторов к клеткам-мишеням для трансдукции (Yang et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 2008, 101(2): 357-368; и Maetzig et al., *Viruses*, 2011, 3, 677-713; содержания которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

[00461] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные гамма-ретровирусные векторы являются само-инактивирующимися (SIN) гамма-ретровирусными векторами. Векторы являются неспособными к репликации. SIN векторы могут нести делеции в пределах области 3' U3, первоначально содержащей энхансерную/промоторную активность. Кроме того, область 5' U3 может быть заменена сильными промоторами (необходимыми в линии упаковывающих клеток), полученными из цитомегаловируса или RSV, или внутренним промотором за выбором, и/или энхансерным элементом. Выбор внутренних промоторов может быть сделан в соответствии с конкретными требованиями экспрессии гена, необходимой для конкретной цели данного изобретения.

[00462] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды, кодирующие биоконтур, компоненты биоконтра, эффекторной модуль, ЭОС, вставляют в рекомбинантный вирусный геном. Другие компоненты вирусной мРНК рекомбинантного гамма-ретровирусного вектора могут быть изменены путем вставки или удаления природных последовательностей (например, вставки IRES, вставки гетерологичного полинуклеотида, кодирующего полипептид, или ингибирующей нуклеиновой кислоты интереса, замещением более эффективным промотором из другого ретровируса или вируса, вместо промотора дикого типа, и т. п.). В некоторых примерах, рекомбинантные гамма-ретровирусные векторы могут содержать модифицированный сигнал упаковки, и/или сайт связывания праймера (PBS), и/или 5'-энхансерные/промоторные элементы в U3-области 5'-длинного концевого повтора (LTR), и/или 3'-SIN элементы, внесенные в U3-области 3'-LTR. Эти модификации могут повысить титры и способность к инфицированию.

[00463] Гамма-ретровирусные векторы, пригодные для доставки компонентов биоконтра, эффекторных модулей, ЭОС или конструкций полезных грузов согласно данному изобретению, могут быть выбраны из тех, которые раскрыты в патентах США № 8828718; 7585676; 7351585; публикации заявке США № 2007/048285; публикациях заявок США № WO2010/113037; WO2014/121005; WO2015/056014; и патентах

EP № EP1757702; EP1757703 (содержания которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

3. Адено-ассоциированные вирусные векторы (AAV)

[00464] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды согласно данному изобретению могут быть упакованы в рекомбинантные адено-ассоциированные вирусные (rAAV) векторы. Такие векторы или вирусные частицы могут быть разработаны, чтобы использовать любой из капсидов известных серотипов, или комбинации капсидов серотипов. Капсиды серотипов могут включать в себя капсиды из любых выявленных серотипов AAV и их вариантов, например, AAV1, AAV2, AAV2G9, AAV3, AAV4, AAV4-4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 и AAVrh10.

[00465] В одном варианте осуществления, серотип AAV может представлять собой или иметь последовательность, как описано в публикации США № US20030138772, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме, например, но не ограничиваясь лишь этими: AAV1 (SEQ ID NO: 6 и 64 US20030138772), AAV2 (SEQ ID NO: 7 и 70 US20030138772), AAV3 (SEQ ID NO: 8 и 71 US20030138772), AAV4 (SEQ ID NO: 63 US20030138772), AAV5 (SEQ ID NO: 114 US20030138772), AAV6 (SEQ ID NO: 65 US20030138772), AAV7 (SEQ ID NO: 1-3 US20030138772), AAV8 (SEQ ID NO: 4 и 95 US20030138772), AAV9 (SEQ ID NO: 5 и 100 US20030138772), AAV10 (SEQ ID NO: 117 US20030138772), AAV11 (SEQ ID NO: 118 US20030138772), AAV12 (SEQ ID NO: 119 US20030138772), AAVrh10 (аминокислоты с 1 по 738 SEQ ID NO: 81 US20030138772), или их варианты. Не ограничивающие примеры вариантов включают в себя SEQ ID NO: 9, 27-45, 47-62, 66-69, 73-81, 84-94, 96, 97, 99, 101-113 из US20030138772, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме

[00466] В одном варианте осуществления, серотип AAV может иметь последовательность, как описано в Pulicherla et al. (*Molecular Therapy*, 2011, 19(6):1070-1078), патентах США № 6156303; 7198951; публикациях патентов США № US2015/0159173 и US2014/0359799; и международных публикациях патентов № WO1998/011244, WO2005/033321 и WO2014/14422; содержания которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00467] Векторы AAV включают в себя не только одноцепочечные векторы, но и само-комплементарные векторы AAV (скAAV). скAAV векторы содержат ДНК, которая отжигается сама с собой с образованием двухцепочечного векторного генома. Путем пропуска синтеза второй цепи, скAAV делает возможным быструю экспрессию в клетке.

[00468] Векторы rAAV могут быть изготовлены с помощью стандартных способов в данной области техники, например, путем тройной трансфекции, в клетках sf9 насекомых или в суспензии клеточных культур человеческих клеток, например клетках HEK293.

[00469] Биоконтур, компоненты биоконтура, эффекторный модуль, ЭОС или конструкции полезных грузов могут кодироваться одним или большим количеством вирусных геномов, чтобы быть упакованными в капсиды AAV, описанные в данном документе.

[00470] Такие векторы или вирусные геномы могут также включать в себя, в дополнение к по меньшей мере, одному или двум ITR (инвертированные концевые повторы), некоторые регуляторные элементы, необходимые для экспрессии из вектора или вирусного генома. Такие регуляторные элементы хорошо известны в данной области техники и включают в себя, например, промоторы, интроны, спейсеры, заполняющие последовательности, и тому подобные.

[00471] В некоторых вариантах осуществления, больше чем один эффекторный модуль или ЭОС (например, ДД), может кодироваться вирусным геномом.

4. Вектор на основе онколитического вируса

[00472] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды согласно изобретению могут быть упакованы в онколитические вирусы, такие как вирусы осповакцины для вакцинации. Онколитические вирусы осповакцины могут включать в себя вирусные частицы вирусного вектора осповакцины, который является тимидинкиназа(ТК)-дефектным, экспрессирующим гранулоцитарно-макрофагальный (ГМ)-колониестимулирующий фактор (CSF), способным к репликации, которых достаточно, чтобы вызвать онколизис клеток в опухоли (например, патент США № 9226977).

5. Матричная РНК (мРНК)

[00473] В некоторых вариантах осуществления, эффекторные модули согласно изобретению могут быть сконструированы в виде матричной РНК (мРНК). Как применяется в данном документе, термин «матричная РНК (мРНК)» относится к любому полинуклеотиду, который кодирует представляющий интерес полипептид, и который способен транслироваться для получения представляющего интерес кодируемого полипептида *in vitro*, *in vivo*, *in situ* или *ex vivo*. Такие молекулы мРНК могут иметь структурные компоненты или признаки любой из тех, что описаны в международной заявке № PCT/US2013/030062, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00474] Полинуклеотиды согласно изобретению также могут быть разработаны как описано, например, Ribostem Limited в заявке на патент Соединенного Королевства № 0316089.2, поданной 9 июля 2003 года, в данный момент не рассматривается, заявке PCT № PCT/GB2004/002981, поданной 9 июля 2004 года, опубликованной как WO2005005622, заявке на патент США № 10/563897 с переходом в национальную фазу, поданной 8 июня 2006 года, опубликованной как US20060247195, в данный момент не рассматривается, и в заявке на европейский патент № EP2004743322 с переходом в национальную фазу, поданной 9 июля 2004 года, опубликованной как EP1646714, в данное время отозванная; Novozymes, Inc. в заявке PCT номер № PCT/US2007/88060, поданной 19 декабря 2007 года, опубликованной как WO2008140615, в заявке на патент США № 12/520072 с переходом в национальную фазу, поданной 2 июля 2009 года, опубликованной как US20100028943, и в заявке на европейский патент № EP2007874376, поданной 7 июля 2009, опубликованной как EP2104739; Университет Рочестера в заявке PCT № PCT/US2006/46120, поданной 4 декабря 2006 года, опубликованной как WO2007064952, и в заявке на патент США № 11/606995, поданной 1 декабря 2006 года, опубликованной как US20070141030; BioNTech AG в заявке на европейский патент № EP2007024312, поданной 14 декабря 2007 года, в данный момент не рассматривается, заявке PCT № PCT/EP2008/01059, поданной 12 декабря 2008 года, опубликованной как WO2009077134, в заявке на европейский патент № EP2008861423 с переходом в национальную фазу, поданной 2 июня 2010 года, опубликованной как EP2240572, заявке на патент США № 12/735060 с переходом в национальную фазу, поданной 24 ноября 2010 года, опубликованной как US20110065103, заявке на патент Германии № DE 10 2005 046 490, поданной 28 сентября 2005 года, в заявке PCT № PCT/EP2006/0448, поданной 28 сентября 2006 года, опубликованной как WO2007036366, в патенте Европы № EP1934345 с переходом в национальную фазу, опубликованном 21 марта 2012 года, и в заявке на патент США № 11/992638 с переходом в национальную фазу, поданной 14 августа 2009 опубликованной как 20100129877; Immune Disease Institute Inc. в заявке на патент США №13/088009, поданной 15 апреля 2011 года, опубликованной как US20120046346, и в заявке PCT № PCT/US2011/32679, поданной 15 апреля 2011

года, опубликованной как WO20110130624; Shire Human Genetic Therapeutics в заявке на патент США № 12/957340, поданной 20 ноября 2010 года, опубликованной как US20110244026; Sequitur Inc. в заявке PCT № PCT/US1998/019492, поданной 18 сентября 1998 года, опубликованной как WO1999014346; The Scripps Research Institute в заявке PCT № PCT/US2010/00567, поданной 24 февраля 2010 года, опубликованной как WO2010098861, и заявке на патент США № 13/203229 с переходом в национальную фазу, поданной 3 ноября 2011 опубликованной как US20120053333; Ludwig-Maximilians University в заявке PCT № PCT/EP2010/004681, поданной 30 июля 2010 года, опубликованной как WO2011012316; Cellscript Inc. в патенте США № 8039214, поданном 30 июня 2008 года, и с выдачей охранного документа 18 октября 2011, в заявках на патент США № 12/962498, поданной 7 декабря 2010 года, опубликованной как US20110143436, 12/962468, поданной 7 декабря 2010 года, опубликованной как US20110143397, 13/237451, поданной 20 сентября 2011 года, опубликованной как US20120009649, и в заявке PCT № PCT/US2010/59305, поданной 7 декабря 2010, опубликованной как WO2011071931, и в PCT/US2010/59317, поданной 7 декабря 2010 года, опубликованной как WO2011071936; Управляющие университета Пенсильвании в заявке PCT № PCT/US2006/32372, поданной 21 августа 2006 года, опубликованной как WO2007024708, и в заявке на патент США № 11/990646 с переходом в национальную фазу, поданной 27 марта 2009 года, опубликованной как US20090286852; Curevac GMBH в заявках на патент Германии № DE10 2001 027 283.9, поданной 5 июня 2001 года, № DE10 2001 062 480.8, поданной 19 декабря 2001 года, и № DE 20 2006 051 516, поданной 31 октября 2006 года, все не рассматриваются, в европейских патентах № EP1392341, предоставлен охранный документ 30 марта 2005 года, и № EP1458410, предоставлен охранный документ 2 января 2008 года, в заявках PCT № PCT/EP2002/06180, поданной 5 июня 2002 года, опубликованной как WO2002098443, № PCT/EP2002/14577, поданной 19 декабря 2002 года, опубликованной как WO2003051401, № PCT/EP2007/09469, поданной 31 декабря 2007 года, опубликованной как WO2008052770, № PCT/EP2008/03033, поданной 16 апреля 2008 года, опубликованной как WO2009127230, № PCT/EP2006/004784, поданной 19 мая 2005 года, опубликованной как WO2006122828, № PCT/EP2008/00081, поданной 9 января 2007 года, опубликованной как WO2008083949, и в заявках на патент США № 10/729830, поданной 5 декабря 2003 года, опубликованной как US20050032730, № 10/870110, поданной 18 июня 2004 года, опубликованной как US20050059624, № 11/914945 поданной 7 июля 2008 года, опубликованной как US20080267873, № 12/446912, поданной 27 октября 2009 года, опубликованной как US2010047261, в данный момент не рассматривается, № 12/522214, поданной 4 января 2010 года, опубликованной как US20100189729, № 12/787566, поданной 26 мая 2010 года, опубликованной как US20110077287, № 12/787755, поданной 26 мая 2010 года, опубликованной как US20100239608, № 13/185119, поданной 18 июля 2011 года, опубликованной как US20110269950, и № 13/106548, поданной 12 мая 2011 года, опубликованной как US20110311472, все включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00475] В некоторых вариантах осуществления, эффекторные модули могут быть задуманы в виде само-амплифицирующейся РНК. «Само-амплифицирующаяся РНК», как применяется в данном документе, относится к молекулам РНК, которые могут реплицироваться в хозяине, что приводит к увеличению количества РНК и белка, кодируемого РНК. Такая само-амплифицирующаяся РНК может иметь структурные особенности или компоненты любой из тех, что описаны в опубликованной международной заявке на патент № WO2011005799 (содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

VI. ДОЗЫ, ДОСТАВКА И ВВЕДЕНИЕ

[00476] Композиции согласно изобретению могут быть доставлены в клетку или субъект посредством одного или большего количества путей или способов. Вирусные векторы, содержащие один или большее количество эффекторных модулей, ЭОС, иммунотерапевтических агентов и других компонентов, описанных в данном документе, могут быть использованы для их доставки в клетку и/или субъект. Могут также быть использованы другие варианты, такие как мРНК, плазмиды, и рекомбинантные белки.

1. Доставка клеток

[00477] В другом аспекте данного изобретения, полинуклеотиды, кодирующие биоконтуры, эффекторные модули, ЭОС (например, ДД), полезные грузы интереса (иммунотерапевтические агенты) и композиции согласно изобретению, и векторы, содержащих указанные полинуклеотиды, могут быть введены в клетки, такие как иммунные эффекторные клетки.

[00478] В одном аспекте данного изобретения, полинуклеотиды, кодирующие биоконтуры, эффекторные модули, ЭОС (например, ДД), полезные грузы интереса (иммунотерапевтические агенты) и композиции согласно изобретению, могут быть упакованы в вирусные векторы или интегрированы в вирусные геномы, делая возможной временную или стабильную экспрессию полинуклеотидов. Предпочтительные вирусные векторы представляют собой ретровирусные векторы включая лентивирусные векторы. Для того чтобы сконструировать ретровирусный вектор, полинуклеотидную молекулу, кодирующую биоконтур, эффекторный модуль, ДД или полезный груз интереса (т. е. иммунотерапевтический агент) вставляют в вирусный геном вместо определенных вирусных последовательностей для получения вируса, являющегося дефектным по репликации. Рекомбинантный вирусный вектор затем вводят в упаковывающую клеточную линию, содержащую гены gag, pol, и env, но без LTR, и упаковывающие компоненты. Рекомбинантные ретровирусные частицы секретируют в культуральную среду, а затем собирают, необязательно концентрируют и используют для переноса генов. Лентивирусные векторы являются особенно предпочтительными, поскольку они способны инфицировать как делящиеся, так и не делящиеся клетки.

[00479] Векторы могут быть также перенесены в клетки с помощью невирусных способов, с помощью физических способов, таких как иглы, электропорация, сонопорация, гидропорация; химических носителей, таких как неорганические частицы (например, фосфат кальция, диоксид кремния, золото) и/или химических способов. В некоторых вариантах осуществления, синтетические или природные биоразлагаемые агенты могут быть использованы для доставки, например, катионные липиды, липидные нано эмульсии, наночастицы, векторы на основе пептидов или векторы на основе полимеров.

[00480] В некоторых вариантах осуществления, полипептиды согласно изобретению могут быть доставлены прямо в клетку. В одном варианте осуществления, полипептиды согласно изобретению могут быть доставлены с использованием синтетических пептидов, содержащих домен эндосомальной утечки (ELD), слитый с доменом проникновения в клетки (CLD). Полипептиды согласно изобретению совместно вводят в клетку с ELD-CLD-синтетическим пептидом. ELD облегчают утечку в цитозоль белков, которые оказались захваченными в эндомосе. Такие домены являются производными белков микробного и вирусного происхождения, и были описаны в данной области техники. CPD делают возможным перенос белков через плазматическую мембрану, и также были описаны в данной области техники. Гибридные белки ELD-CLD синергически увеличивают эффективность трансдукции по сравнению с ко-трансдукцией любым доменом по отдельности. В некоторых вариантах осуществления, гистидин богатый домен необязательно может быть добавлен к конструкции-переносчику в качестве дополнительного способа, делающего

возможной утечку груза в цитозоль из эндосомы. Переносчик может также содержать остаток цистеина на N- или C-конце, чтобы создать мультимер гибридного пептида. Мультимеры гибридных пептидов ELD-CLD, получаемые добавлением цистеинового остатка к концу пептида, демонстрируют еще большую эффективность трансдукции по сравнению с одиночными гибридными пептидными конструкциями. Полипептиды согласно изобретению также могут быть присоединены к соответствующим сигналам локализации, чтобы направить груз в соответствующее субклеточное пространство, например, ядро. В некоторых вариантах осуществления, любые ELD, CLD или гибридные ELD-CLD синтетических пептидов, указанные в международной публикации патента WO2016161516 и WO2017175072 могут быть использованы в данном изобретении (содержания которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

2. Дозирование

[00481] Данное изобретение относится к способам, включающим в себя введение субъекту, нуждающемуся в этом, какой-либо одной или большего количества композиций для иммунотерапии. Они могут быть введены субъекту с использованием любого количества и любого пути введения, эффективного для профилактики или лечения клинической патологии, например рака, инфекционных заболеваний и других иммунодефицитных заболеваний.

[00482] Композиции согласно данному изобретению, как правило, готовят в виде формы единицы дозы для простоты введения и однородности введения доз. Следует понимать, однако, что общее количество ежедневно используемых композиций согласно данному изобретению может быть определено лечащим врачом в рамках здравого медицинского суждения. Конкретный терапевтически эффективный или профилактически эффективный уровень дозы для любого конкретного пациента будет зависеть от множества факторов, включая нарушение, которое лечат, и тяжесть нарушения; активность конкретного используемого соединения; конкретную используемую композицию; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и рацион пациента; время введения, путь введения, предшествующие или сопутствующие терапевтические вмешательства и скорость экскреции конкретного используемого соединения; продолжительность лечения; препараты, используемые в комбинации или совместно с конкретным используемым соединением; и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

[00483] Композиции согласно изобретению могут быть использованы в различных дозах, чтобы избежать анергии Т-лимфоцитов, предотвратить синдром высвобождения цитокинов, и свести к минимуму токсичность, связанную с иммунотерапией. Например, низкие дозы композиций согласно данному изобретению могут быть использованы для первоначального лечения пациентов с высокой опухолевой нагрузкой, в то время как пациентов с низкой опухолевой нагрузкой можно лечить с помощью высоких и повторяющихся доз композиций согласно изобретению, чтобы обеспечить распознавание минимальной антигенной нагрузки опухоли. В другом случае, композиции согласно данному изобретению могут быть доставлены в пульсирующем режиме, чтобы уменьшить тонический сигналинг Т-лимфоцитов и повысить устойчивость *in vivo*. В некоторых аспектах, токсичность может быть сведена к минимуму, путем первоначального использования низких доз композиций согласно изобретению, перед введением высоких доз. Режим введения доз может быть изменен, если повышены сывороточные маркеры, такие как ферритин, сывороточный С-реактивный белок, ИЛ6, ИФН-гамма и ФНО- α .

[00484] В некоторых вариантах осуществления, нейротоксичность может быть связана с терапией XAP или TIL. Такая нейротоксичность может быть связана XAP-CD19. Токсичность может быть из-за

чрезмерной инфильтрации Т-лимфоцитов в головной мозг. В некоторых вариантах осуществления, нейротоксичность может быть облегчена путем предотвращения прохождения Т-лимфоцитов через гематоэнцефалический барьер. Это может быть достигнуто за счет удаления целевого гена - эндогенного альфа-4 интегрина, также в данном изобретении могут быть полезны ингибиторы, такие как тисабри/натализумаб.

3. Введение

[00485] В некоторых вариантах осуществления, композиции для иммунотерапии могут быть введены в клетки *ex vivo*, которые затем вводят субъекту. Иммунные клетки могут быть выделены и размножены *ex vivo* с использованием различных способов, известных в данной области техники. Например, способы выделения цитотоксических Т-лимфоцитов описаны в патентах США № 6805861 и № 6531451; содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Выделение NK-клеток описано в патенте США № 7435596; содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00486] В некоторых вариантах осуществления, композиции согласно данному изобретению могут быть введены с помощью любого из способов введения, описываемого в совместно рассматриваемых и находящихся в совместном владении предварительной заявке на патент США № 62/320864, поданной 4/11/2016, или в предварительной заявке США № 62/466596, поданной 3 марта 2017 года, и международной публикации WO2017/180587, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме

[00487] В некоторых вариантах осуществления, в зависимости от природы клеток, клетки могут быть введены в организм хозяина, например, млекопитающее, широким набором способов, в том числе путем инъекции, переливания, инфузии, местным капельным введением или имплантацией. В некоторых аспектах, клетки согласно изобретению могут быть введены в местоположение опухоли. Количество клеток, которое используют, будет зависеть от целого ряда обстоятельств, цели введения, время жизни клеток, протокола, который будут применять, например, количества введений, способности клеток размножаться, или тому подобного. Клетки могут находиться в физиологически приемлемой среде.

[00488] В некоторых вариантах осуществления, клетки согласно изобретению можно вводить в виде нескольких доз субъектам, имеющим заболевание или патологию. Введение в целом, как правило, влияет на улучшения одного или большего количества симптомов рака, или клинической патологии, и/или лечит или предотвращает рак или клиническую патологию или его/ее симптомы.

[00489] В некоторых вариантах осуществления, композиции для иммунотерапии могут быть введены *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды согласно данному изобретению, содержащие биоконтуры, эффекторные молекулы, ЭОС, полезные грузы интереса (иммунотерапевтические агенты) и композиции согласно данному изобретению, могут быть доставлены *in vivo* в субъекта. *In vivo* доставка иммунотерапевтических агентов хорошо описана в данной области техники. Так, например, способы доставки цитокинов описаны в патенте Е.Р. № EP0930892 A1, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки.

[00490] В одном варианте осуществления, полезные грузы согласно данному изобретению могут быть введены в комбинации с ингибиторами SHP-1 и/или SHP-2. Тирозиновые протеин-фосфатазы SHP1 (также известная как PTPN6) и SHP2 (также известная как PTPN11) участвуют в ингибирующем сигнальном пути запрограммированной клеточной гибели (PD1). Внутриклеточный домен PD1 содержит ингибирующий

иммунорецепторный мотив на основе тирозина (ITIM) и иммунорецепторный мотив переключения на основе тирозина (ITSM). Было показано, что ITSM вовлекает SHP-1 и 2. Это создает отрицательные ко-стимулирующие микрокластеры, которые индуцируют дефосфорилирование проксимальных сигнальных молекул ТКР, что приводит к подавлению активации Т-лимфоцитов, что может привести к истощению Т-лимфоцитов. В одном варианте осуществления, ингибиторы SHP-1 и 2 могут включать в себя экспрессию доминантных негативных версий белков в Т-лимфоцитах, TIL, или других типах клеток, чтобы уменьшить истощение. Такие мутанты могут связываться с эндогенными, каталитически активными белками, и ингибировать их функцию. В одном варианте осуществления, доминантный отрицательный мутант SHP-1 и/или SHP-2 не имеет фосфатазного домена, необходимого для каталитической активности. В некоторых вариантах осуществления, любой из доминантных отрицательных мутантов SHP-1, описанный Bergeron S et al. (2011). *Endocrinology*. 2011 Dec;152(12):4581-8.; Dustin JB et al. (1999) *J Immunol*. Mar 1;162(5):2717-24.; Berchtold S (1998) *Mol Endocrinol*. Apr;12(4):556-67 и Schram et al. (2012) *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1;302(1):H231-43.; может быть полезным в данном изобретении (содержание которых включено посредством ссылки в в полном объеме).

Пути доставки

[00491] Фармацевтические композиции, биоконтуры, компоненты биоконтуров, эффекторные модули, включая их ЭОС (например, ДД), полезные грузы (т. е. иммунотерапевтические агенты), векторы и клетки согласно данному изобретению могут быть введены любым путем, чтобы достичь терапевтически эффективного результата.

[00492] Они включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: энтеральный (в кишечник), гастроэнтеральный, эпидуральный (в твердую мозговую оболочку), пероральный (через рот), трансдермальный, перидуральный, внутримозговой (в головной мозг), интрацеребровентрикулярный (в желудочки мозга), кожный (наноса на кожу), внутрикожный, (в саму кожу), подкожный (под кожу), назальное введение (через нос), внутривенный путь (в вену), внутривенный болюс, внутривенное капельное введение, внутриартериальный путь (в артерию), внутримышечный (в мышцу), внутричерепной (в сердце), внутрикостную инфузию (в костный мозг), интратекальный путь (в спинномозговой канал), внутрибрюшинный путь (инфузии или инъекции в брюшную полость), интраспинальную инфузию, интравитреальный путь, (через глаз), внутривенную инъекцию (в патологическую полость), внутриполостный путь (в основание полового члена), интравагинальное введение, внутриматочный путь, экстра-амниотическое введение, трансдермальный путь (диффузия через неповрежденную кожу для системного распределения), чресслизистый путь (диффузия через слизистую оболочку), трансвагинальный, инсuffляцию (вдыханием через нос), сублингвальный путь, подгубное введение, клизмы, применения глазных капель (на конъюнктиву), применения ушных капель, аурикулярный путь (в или через ухо), буккальный (прямо за щеку), конъюнктивальный, кожный, зубной (к зубу или зубам), электроосмотическое введение, эндоцервикальный, эндосинусовый, эндотрахеальный, экстракорпоральный, гемодиализ, инфильтрацию, интерстициальный, внутрибрюшной, интра-амниотический, внутрисуставный, внутрипротоковый, внутрибронхиальный, интрасиновиальный, внутривисцеральный (внутрь хряща), внутривисцеральной (внутрь *cauda equine*), интракостеральный (внутрь мозжечко-мозговой цистерны), внутривисцеральный (внутрь роговицы), стоматологический, внутрикоронарный, интракоронарный (внутрь коронарных артерий), внутрь пещеристого тела (внутрь расширяющегося пространства пещеристого тела полового члена), внутридисковый (внутрь диска),

внутрипротоковый (внутри протока железы), внутридвенадцатиперстной кишки), интрадуральный (внутри или под твердую мозговую оболочку), интраэпидермальный (в эпидермисе), интраэзофагальный (в пищевод), внутрижелудочный (внутри желудка), внутригингивальный (внутри десны), внутри подвздошной кишки (внутри дистальной части тонкой кишки), внутриочаговый (внутри или прямо в локализованное поражение), внутрипросветный (внутри просвета трубки), внутрилимфатический (внутри лимфатического узла), интрамедуллярный (внутри полости костного мозга кости), интраменингеальный (внутри мозговых оболочек), интрамиокардиальный (внутри миокарда), внутриглазной путь (внутри глаза), интраовариальный (внутри яичника), интраперикардиальный (внутри перикарда), внутриплевральный (внутри плевры), интрапростатный (внутри предстательной железы), внутрилегочный (внутри легких или его бронхов), интраназальный (внутри носовых или окологлазничных пазух), интраспинальный (внутри позвоночного столба), внутрисуставный (внутри синовиальной полости сустава), внутрисухожильный (внутри сухожилия), интратестикулярный (внутри яичка), интратекальный (внутри спинномозговой жидкости на любом уровне спинно-мозговой оси), интраторакальный (внутри грудной клетки), интратубулярный (внутри канала органа), внутриопухолевый (внутри опухоли), интратимпанальный (внутри барабанной полости), интраваскулярный (внутри сосуда или сосудов), интравентрикулярный (внутри желудочка), введение ионофорезом (с помощью электрического тока, где ионы растворимых солей перемещаются в ткани тела), орошение (омывание или споласкивание открытых ран или полостей тела), ларингальный (нанесение прямо на глотку), назогастральный (через нос и в желудок), введение через герметичную повязку (местный путь введение, который затем покрывают повязкой, которая закрывает область), офтальмологический (на внешнюю часть глаза), ротоглоточный (напрямую в полость рта и глотку), парентеральный, чрескожный, околосуставный, перидуральный, перинеуральный, околозубной, ректальный, респираторный (внутри дыхательных путей при вдыхании перорально или назально для локального или системного эффекта), ретробульбарный (за мост или позади глазного яблока), интрамиокардиальный (вход в миокард), введение в мягкие ткани, субарахноидальный, субконъюнктивальный, подслизистый, местный, трансплацентарный (через или сквозь плаценту), транстрахеальный (через стенку трахеи), транстимпанный (через или сквозь барабанную полость), мочеточниковый (в мочеточник), уретральный (в уретру), вагинальный, каудальный, диагностический, через нервную блокаду, билиарную перфузию, сердечную перфузию, фотоферез или спинальный путь.

VII. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[00493] В различных местах в данном описании, признаки или функции композиций данного изобретения раскрыты группами или диапазонами. Специально предполагается, что данное изобретение включает в себя каждую отдельную субкомбинацию членов таких групп и диапазонов. Ниже приводится неограничивающий перечень определений терминов.

[00494] *Активность*: Как применяется в данном документе, термин «активность» относится к состоянию, в котором все происходит или случается. Композиции согласно изобретению могут обладать активностью, и эта активность может включать в себя одно или большее количество биологических событий. В некоторых вариантах осуществления, биологические события могут включать в себя события клеточного сигналинга. В некоторых вариантах осуществления, биологические события могут включать в себя события белковых взаимодействий, связанные с клеточным сигналингом, вовлекающие один или большее количество соответствующих белков, рецепторов, малых молекул, или любой из компонентов биоконтура, описанных в данном документе.

[00495] Адоптивная клеточная терапия (АКТ): Термины «адаптивная клеточная терапия» или «адаптивный перенос клеток», как они используются в данном документе, относятся к клеточной терапии, вовлекающей перенос клеток в организм пациента, причем клетки могут происходить из пациента, или от другого индивида, и быть сконструированы (изменены) перед переносом обратно в организм пациента. Терапевтические клетки могут быть получены из иммунной системы, например эффекторные клетки: CD4+ Т-лимфоциты; CD8+ Т-лимфоциты, клетки естественные киллеры (NK-клетки); и В-лимфоциты и инфильтрирующие в опухоль лимфоциты (TIL) полученные из иссеченных опухолей. Чаще всего перенесенные клетки являются аутологичными противоопухолевыми Т-лимфоцитами после *ex vivo* экспансии или манипуляции. Например, аутологичные лимфоциты периферической крови могут быть генетически сконструированы для распознавания специфических опухолевых антигенов путем экспрессии Т-клеточных рецепторов (ТКР) или химерного антигенного рецептора (ХАР).

[00496] *Агент*: Как применяется в данном документе, термин «агент» относится к биологическому, фармацевтическому, или химическому соединению. Не ограничивающие примеры включают в себя простые или сложные органические или неорганические молекулы, пептид, белок, олигонуклеотид, антитело, производное антитела, фрагмент антитела, рецептор, и растворимый фактор.

[00497] *Агонист*: термин «агонист», как применяется в данном документе, относится к соединению, которое, в комбинации с рецептором, может продуцировать клеточный ответ. Агонист может быть лигандом, который прямо связывается с рецептором. В качестве альтернативы, агонист может быть скомбинирован с рецептором косвенно, например, (а) формируя комплекс с другой молекулой, которая прямо связывается с рецептором, или (b) в обратном случае, приводит к модификации другого соединения, так что другое соединение прямо связывается с рецептором. Агонист может упоминаться как агонист конкретного рецептора или семейства рецепторов, например, агонист ко-стимулирующего рецептора.

[00498] *Антагонист*: термин «антагонист», используемым в данном документе, относится к любому агенту, который ингибирует или снижает биологическую активность мишени(ней), которую он связывает.

[00499] *Антиген*: термин «антиген», как применяется в данном документе, определяют как молекулу, которая вызывает иммунный ответ при введении в субъект, или которую производит субъект, например опухолевые антигены, которые возникают в процессе развития рака. Этот иммунный ответ может включать в себя либо продуцирование антител, или активацию специфических иммунологически-компетентных клеток, например цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-хелперных клеток, или тех и тех. Антиген может быть получен из организмов, субъединиц белков/антигенов, убитых или инактивированных целых клеток или лизатов. В контексте данного изобретения, термины «антигены интереса» или «желательные антигены» относятся к тем белкам и/или другим биомолекулам, предложенным в данном документе, которые иммуноспецифично связаны или взаимодействуют с антителами согласно данному изобретению и/или их фрагментами, мутантами, вариантами, и/или модификациями, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления, антигены интереса могут включать в себя любой из полипептидов или полезных грузов или белков, описанных в данном документе, или их фрагментов или частей.

[00500] *Примерно*: Как применяется в данном документе, термин «примерно» или «около», применительно к одному или большему количеству значений, представляющих интерес, относится к значению, которое аналогично указанному исходному значению. В некоторых вариантах осуществления, термин «примерно» или «около» относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, или меньше в любом направлении (больше чем или

меньше чем) от указанного исходного значения, если не указано иное или иным образом очевидно из контекста (кроме случаев, когда такое количество будет превышать 100 возможного значения).

[00501] *Связано с*: Как применяется в данном документе, термины «связанно с», «конъюгировано», «соединено», «присоединено», «ассоциировано» и «прицеплено», когда используются в отношении двух или большего количества фрагментов, означают, что фрагменты физически связаны или соединены друг с другом, либо прямо, либо через один или большее количество дополнительных фрагментов, которые служат в качестве соединяющих агентов, чтобы сформировать структуру, которая является достаточно стабильной, так что остатки остаются физически соединенными в условиях, в которых используется структура, например, физиологических условиях. «Объединение» не обязательно должно быть осуществлено через прямую ковалентную химическую связь. Оно может также предполагать наличие взаимодействия на основе ионных или водородных связей, или на основе гибридизации, достаточно стабильного, так что «объединенные» сущности остаются физически связанными.

[00502] *Аутологичный*: термин «аутологичный», как применяется в данном документе, предназначен для обозначения любого материала, полученного из одного и того же индивида, которому позднее он должен быть введен.

[00503] *Штрих-код*: термин «штрих-код», как применяется в данном документе, относится к полинуклеотидной или аминокислотной последовательности, которая дает возможность отличить один полинуклеотид или одну аминокислотную последовательность, от другого(ой).

[00504] *Рак*: термин «рак», как применяется в данном документе, относится к обширной группа различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводят к образованию злокачественных опухолей, которые проникают в соседние ткани, в конечном счете метастазируя в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровоток.

[00505] *Ко-стимулирующая молекула*: Как применяется в данном документе, в соответствии с ее значением в иммунной активации Т-лимфоцитов, относится к группе рецепторов/лигандов поверхности иммунных клеток, которые вовлекаются в интерфейс между Т-лимфоцитами и АПК, и создают стимулирующий сигнал в Т-лимфоцитах, который сочетается с стимулирующим сигналом в Т-лимфоцитах, который является результатом распознавания Т-клеточным рецептором (ТКР) антигена/комплекса ГКГС (рГКГС) на АПК.

[00506] *Цитокины*: термин «цитокины», как применяется в данном документе, относится к семейству малых растворимых факторов с плейотропными функциями, которые продуцируются многими типами клеток, которые могут влиять на и регулировать функции иммунной системы.

[00507] *Доставка*: термин «доставка», как применяется в данном документе, относится к акту или способу доставки соединения, вещества, объекта, сущности, груза или полезного груза. «Агент доставки» относится к любому агенту, который облегчает, по меньшей мере, частично, доставку *in vivo* одного или большего количества веществ (включая, но не ограничиваясь соединением и/или композициями согласно данному изобретению) в клетку, субъект или другие биологические клеточные системы.

[00508] *Дестабилизированный*: Как применяется в данном документе, термин «дестабилизировано», «дестабилизировать», «дестабилизирующая область» или «дестабилизирующий домен» обозначает область или молекулу, которая является менее стабильной, чем начальная, исходная, дикого типа или нативная форма одной и той же области или молекулы.

[00509] *Сконструированный*: Как применяется в данном документе, варианты осуществления данного изобретения являются «сконструированными», когда их проектируют так, чтобы они имели признак или свойство, структурный(ное) или химический(кое), которые отличаются от начальной, дикого типа или нативной молекулы.

[00510] *Экспрессия*: Как применяется в данном документе, термин «экспрессия» нуклеотидной последовательности относится к одному или большему количеству следующих событий: (1) получение матрицы РНК из последовательности ДНК (например, путем транскрипции); (2) процессинг транскрипта РНК (например, путем сплайсинга, редактирования, 5'-кэпирования, и/или процессинга 3'-конца); (3) трансляцию РНК в полипептид или белок; (4) сворачивание полипептида или белка; и (5) пост-трансляционную модификацию полипептида или белка.

[00511] *Признак*: Как применяется в данном документе, «признак» относится к характеристике, свойству или отличительному элементу.

[00512] *Готовая форма*: Как применяется в данном документе, «готовая форма» включает в себя, по меньшей мере соединение и/или композицию согласно данному изобретению, и агент доставки.

[00513] *Фрагмент*: «Фрагмент», как применяется в данном документе, относится к части. Например, фрагменты белков могут включать в себя полипептиды, полученные путем расщепления полноразмерного белка. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент белка включает в себя, по меньшей мере, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250 или большее количество аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, фрагменты антитела включают в себя части антитела.

[00514] *Функциональный*: Как применяется в данном документе, термин «функциональная» биологическая молекула представляет собой биологическую сущность с структурой, и в такой форме, в которой она проявляет свойство и/или активность, с помощью которой ее характеризуют.

[00515] *Иммунные клетки*: термин «иммунная клетка», как применяется в данном документе, относится к любой клетке иммунной системы, которая берет свое начало из гемопоэтической стволовой клетки в костном мозге, которая дает начало двум основным родословным, миелоидной клетке-предшественнице (которая дает начало миелоидным клеткам, таким как моноциты, макрофаги, дендритные клетки, мегакариоциты и гранулоциты), и лимфоидной клетке-предшественнице (которая дает начало лимфоидным клеткам, таким как Т-лимфоциты, В-лимфоциты и клетки естественные киллеры (NK)). Иллюстративные клетки иммунной системы включают в себя CD4+ Т-лимфоциты, CD8+ Т-лимфоциты, CD4- CD8- дважды отрицательные Т-лимфоциты, Т $\gamma\delta$ лимфоциты, Т $\alpha\beta$ лимфоциты, регуляторные Т-лимфоциты, клетки естественные киллеры, и дендритные клетки. Макрофаги и дендритные клетки могут быть названы «антиген-презентирующими клетками» или «АПК», которые являются специализированными клетками, которые могут активировать Т-лимфоциты, когда рецептор главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) на поверхности АПК, образующий комплекс с пептидом, взаимодействует с ТКР на поверхности Т-лимфоцита.

[00516] *Иммунотерапия*: термин «иммунотерапия», как применяется в данном документе, относится к типу лечения заболевания путем индукции или восстановления реакционной способности иммунной системы в отношении болезни.

[00517] *Иммунотерапевтический агент*: термин «иммунотерапевтический агент», как применяется в данном документе, относится к лечению заболевания путем индукции или восстановления реакционной

способностью иммунной системы в отношении болезни с помощью биологического, фармацевтического, или химического соединения.

[00518] *In vitro*: Как применяется в данном документе, термин «*in vitro*» относится к событиям, которые происходят в искусственной среде, например, в пробирке или реакционном сосуде, в клеточной культуре, в чашке Петри, и т. д., а не внутри организма (например, животном, растении или микробе).

[00519] *In vivo*: Как применяется в данном документе, термин «*in vivo*» относится к событиям, которые происходят в организме (например, животном, растении, или микробе, или их клетке или ткани).

[00520] *Линкер*: Как применяется в данном документе, линкер относится к остатку, который соединяет два или большее количество доменов, фрагментов или сущностей. В одном варианте, линкер может содержать 10 или большее количество атомов. В другом варианте осуществления, линкер может содержать группу атомов, например, 10-1000 атомов, и может состоять из атомов или групп, таких как, но не ограничиваясь лишь этими: углерод, amino, алкиламино, кислород, сера, сульфоксид, сульфонил, карбонил и имин. В некоторых вариантах осуществления, линкер может содержать одну или большее количество нуклеиновых кислот, содержащих один или большее количество нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, линкер может содержать аминокислоты, пептид, полипептид или белок. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент, присоединенный с помощью линкера, может включать в себя, но не ограничивается лишь этими: атом, химическую группу, нуклеозид, нуклеотид, нуклеооснову, сахар, нуклеиновую кислоту, аминокислоту, пептид, полипептид, белок, белковый комплекс, полезный груз (например, терапевтический агент) или маркер (в том числе, но не ограничиваясь лишь этим: химический, флуоресцентный, радиоактивный или биолюминесцентный маркер). Линкер может быть использован для любой полезной цели, например, для образования мультимеров или конъюгатов, а также для введения полезного груза, как описано в данном документе. Примеры химических групп, которые могут быть включены в линкер, включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: алкил, алкенил, алкинил, амид, амин, простой эфир, тиоэфир, сложный эфир, алкилен, гетероалкилен, арил или гетероцикл, каждый из которых может быть необязательно замещенным, как описано в данном документе. Примеры линкеров включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: ненасыщенные алканы, полиэтиленгликоли (например, мономерные звенья этилен или пропилен гликоля, например, диэтиленгликоль, дипропиленгликоль, триэтиленгликоль, трипропиленгликоль, тетраэтиленгликоль, или тетраэтиленгликоль), и полимеры декстрана. Другие примеры включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: расщепляемые фрагменты в пределах линкера, такие как, например, дисульфидная связь (-S-S-) или азо-связь (-N=N-), которые могут быть расщеплены с использованием восстанавливающего агента или фотоллиза. Не ограничивающие примеры выборочно расщепляемых связей включают в себя амидо связь, которая может быть расщеплена, например, путем использования трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР), или других восстанавливающих агентов, и/или фотоллизом, а также сложноэфирную связь, которая может быть расщеплена, например, путем кислотного или щелочного гидролиза.

[00521] *Контрольная точка/фактор*: Как применяется в данном документе, фактор контрольной точки представляет собой любой фрагмент или молекулу, чья функция срабатывает в точке разветвления процесса. Например, белок, лиганд или рецептор контрольной точки может функционировать для блокировки или ускорения клеточного цикла.

[00522] *Метаболит*: Метаболиты являются промежуточными продуктами метаболических реакций, катализируемых ферментами, которые закономерно встречаются в клетках. Этот термин, как правило,

используется для описания малых молекул, фрагментов более крупных биомолекул или процессированных продуктов.

[00523] *Модифицированный*: Как применяется в данном документе, термин «модифицированный» относится к измененному состоянию или структуре молекулы или сущности, по сравнению с исходной или начальной молекулой или сущностью. Молекулы могут быть модифицированы различными способами, включая химическую, структурную и функциональную модификацию. В некоторых вариантах осуществления, соединения и/или композиции согласно данному изобретению модифицируют путем введения неприродных аминокислот.

[00524] *Мутация*: Как применяется в данном документе, термин «мутация» относится к изменению и/или варианту. В некоторых вариантах осуществления, мутации могут представлять собой изменения и/или варианты белков (в том числе пептидов и полипептидов) и/или нуклеиновых кислот (в том числе полинуклеотидных кислот). В некоторых вариантах осуществления, мутация включает в себя изменения и/или варианты белка, и/или последовательности нуклеиновой кислоты. Такие изменения и/или варианты могут включать в себя добавление, замену и или удаление одной или большего количества аминокислот (в случае белков и/или пептидов) и/или нуклеотидов (в случае нуклеиновых кислот и/или полинуклеотидных кислот например, полинуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления, в которых мутации включают в себя добавление и/или замену аминокислот и/или нуклеотидов, такие добавления и/или замены могут содержать 1 или больше количество аминокислот и/или нуклеотидных остатков, и могут включать в себя модифицированные аминокислоты и/или нуклеотиды. Полученная конструкция, молекула или последовательность мутации, изменения или варианта может упоминаться в данном документе как мутант.

[00525] *Неоантиген*: термин «неоантиген», как применяется в данном документе, относится к опухолевому антигену, который присутствует в опухолевых клетках, но не нормальных клетках, и не индуцирует удаление Т-лимфоцитов в тимусе, специфичных к антигену, родственному ему (т. е. центральная толерантность). Эти опухолевые антигены могут обеспечивать «инородный» сигнал, подобный таковому патогенов, для вызова эффективного иммунного ответа, необходимого для иммунотерапии рака. Неоантиген может быть ограничен конкретной опухолью. Неоантиген представляет собой пептид/белок с миссенс-мутацией (миссенс неоантиген), или новый пептид с длинными, совершенно новыми участками аминокислот из новых открытых рамок считывания (neoORF). neoORF может создаваться в некоторых опухолях путем инсерций или делеций с выходом за рамку считывания (из-за дефектов в репарации ошибочно спаренных основ ДНК, вызывающих микросателлитную нестабильность), путем генного слияния, мутаций сквозного считывания в стоп-кодонах, или трансляцией неправильно сплайсированой РНК (например, Saeterdal et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 13255-13260).

[00526] *Попа мишенью*: Как применяется в данном документе, «попа мишенью» относится к любому непреднамеренному воздействию на любую одну или больше мишень, ген, клеточный транскрипт, клетку и/или ткань.

[00527] *Функционально связанный*: Как применяется в данном документе, фраза «функционально связанный» относится к функциональной связи между двумя или большим количеством молекул, конструкций, транскриптов, сущностей, фрагментов или т. п.

[00528] *Полезный груз или полезный груз интереса (ПГИ – POI – payload of interest)*: термины «полезный груз» и «полезный груз интереса (ПГИ)», как применяется в данном документе, используются взаимозаменяемо. Полезный груз интереса (ПГИ) относится к любому белку или соединению, функция

которого должна быть изменена. В контексте данного изобретения, ПИБ является компонентом в иммунной системе, включая обе - врожденную и адаптивную иммунную системы. Полезные грузы интереса могут представлять собой белки, гибридную конструкцию, кодирующую гибридный белок, или некодирующий ген, или вариант и его фрагмент. Полезный груз интереса может, когда состоит из аминокислот, упоминаться как белок интереса.

[00529] *Фармацевтически приемлемые наполнители:* термин «фармацевтически приемлемый наполнитель», как применяется в данном документе, относится к любому ингредиенту, кроме активных агентов (например, как описано в данном документе), присутствующему в фармацевтических композициях и имеющему свойство быть, по существу, нетоксичным и не вызывающим воспаление у субъектов. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтически приемлемые наполнители представляют собой переносчики, допускающие суспендирование и/или растворение активных агентов. Наполнители могут включать в себя, например: антиадгезивы, антиоксиданты, связующие вещества, покрытия, добавки сжатию, разрыхлители, красители (цвет), смягчающие вещества, эмульгаторы, наполнители (разбавители), пленкообразователи или покрытия, ароматизаторы, отдушки, глйданты (улучшатели скольжения), лубриканты, консерванты, печатные краски, сорбенты, суспендирующие или диспергирующие агенты, подсластители, и гидроксильную воду. Иллюстративные наполнители включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: бутилированный гидрокситолуол (БНТ), карбонат кальция, фосфат кальция (двухосновной), стеарат кальция, кроскармеллозу, сшитый поливинилпирролидон, лимонную кислоту, кросповидон, цистеин, этилцеллюлозу, желатин, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, лактозу, стеарат магния, мальтит, маннит, метионин, метилцеллюлозу, метилпарабн, микрокристаллическую целлюлозу, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, повидон, предварительно желатинизированный крахмал, пропилпарабен, ретинилпальмитат, шеллак, диоксид кремния, карбоксиметилцеллюлозу натрия, цитрат натрия, натрий крахмал гликолят, сорбит, крахмал (кукурузный), стеариновую кислоту, сахарозу, тальк, диоксид титана, витамин А, витамин Е, витамин С, и ксилит.

[00530] *Фармацевтически приемлемые соли:* Фармацевтически приемлемые соли соединений, описанных в данном документе, являются формами раскрытых соединений, причем кислотный или основной фрагмент представлен в его солевой форме (например, как получают путем взаимодействия группы свободного основания с подходящей органической кислотой). Примеры фармацевтически приемлемых солей включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: минеральные соли или соли органических кислот основных остатков, таких как амины, щелочные или органические соли кислотных остатков, такие как карбоновые кислоты; и тому подобное. Иллюстративные кислотно-аддитивные соли включают в себя ацетат, адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, гемисульфат, гептонат, гексаноат, гидробромид, гидрохлорид, гидроиодид, 2-гидрокси-этансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, толуолсульфонат, ундеканоат, валерат и т. п. Иллюстративные соли щелочных или щелочно-земельных металлов включают в себя натрий, литий, калий, кальций, магний и т. п., а также нетоксичные аммониевые, четвертичные аммониевые и аминные катионы, в том числе, но не ограничиваясь лишь этими:

аммоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин, этиламин и т. п. Фармацевтически приемлемые соли включают в себя обычные нетоксичные соли, например, из нетоксичных неорганических или органических кислот. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтически приемлемую соль получают из исходного соединения, которое содержит основную или кислотную группу, обычными химическими способами. В целом, как правило, такие соли могут быть получены взаимодействием свободных кислотных или основных форм этих соединений с стехиометрическим количеством соответствующего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе, или в смеси двух; в целом, как правило, предпочтительными являются неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил. Перечни подходящих солей можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, и Use, P.H. Stahl and C.G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008, и Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977), каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Фармацевтически приемлемый сольват: Термин «фармацевтически приемлемый сольват», как применяется в данном документе, относится к кристаллической форме соединения, в котором молекулы подходящего растворителя включены в кристаллическую решетку. Например, сольваты могут быть получены путем кристаллизации, перекристаллизации, или осаждением из раствора, что включает в себя органические растворители, воду или их смесь. Примерами подходящих растворителей являются этанол, вода (например, моно-, ди- и три-гидраты), N-метилпирролидинон (NMP), диметилсульфоксид (ДМСО), N,N'-диметилформамид (DMF), N,N'-диметилацетамид (DMAC), 1,3-диметил-2-имидазолидинон (DMEU), 1,3-диметил-3,4,5,6-тетрагидро-2-(1H) -пиримидин (DMPU), ацетонитрил (ACN), пропиленгликоль, этилацетат, бензиловый спирт, 2-пирролидон, бензилбензоат, и т. п. Когда вода является растворителем, сольват упоминается как «гидрат». В некоторых вариантах осуществления, растворитель, введенный в сольват, является типа, или на уровне, который является физиологически приемлемым для организма, которому вводят сольват (например, в форме единицы дозы фармацевтической композиции).

[00531] *Стабильный*: Как применяется в данном документе, термин «стабильный» относится к соединению или сущности, которое является достаточно устойчивым, чтобы выдержать выделение до пригодной степени чистоты из реакционной смеси, и предпочтительно пригодно для приготовления композиции в виде эффективного терапевтического агента.

[00532] *Стабилизированный*: Как применяется в данном документе, термин «стабилизировать», «стабилизированный», «стабилизированная область» означает сделать или стать стабильным. В некоторых вариантах осуществления, стабильность измеряется по отношению к абсолютной величине. В некоторых вариантах осуществления, стабильность измеряют относительно вторичного статуса или состояния, или исходного соединения или сущности.

[00533] *Стандартный ХАР*: Как применяется в данном документе, термин «стандартный ХАР» относится к стандартной конструкции химерного антигенного рецептора. Компоненты гибридного белка ХАР, включая внеклеточный фрагмент scFv, трансмембранный домен, и один или большее количество внутриклеточных доменов, являются линейно выстроенными в виде единого гибридного белка.

[00534] *Элемент ответа на стимул (ЭОС)*: термин «элемент ответа на стимул (ЭОС)», как применяется в данном документе, представляет собой компонент эффекторного модуля, который соединяют, присоединяют, связывают или объединяют с одним или большим количеством полезных грузов

эффекторного модуля, и в некоторых случаях отвечает за нативную способность эффекторного модуля реагировать на один или большее количество стимулов. Как применяется в данном документе, термин способность «реагировать» ЭОС на стимул может характеризоваться ковалентным или нековалентным взаимодействием, прямой или косвенной ассоциацией или структурной или химической реакцией на стимул. Кроме того, ответ любого ЭОС на стимул может быть вопросом степени или вида. Ответ может быть частичным ответом. Ответ может быть обратимым ответом. Ответ может в конечном итоге привести к регулируемому сигналу или эффекту. Такой выходной сигнал может иметь относительный характер в отношении стимула, например, продуцируя модулирующий эффект между 1 и 100, или кратное увеличение или уменьшение, например в 2 раза, 3 раза, 4 раза, в 5 раз, 10 раз или больше. Один неограничивающий пример ЭОС представляет собой дестабилизирующий домен (ДД).

[00535] *Субъект:* Как применяется в данном документе, термин «субъект» или «пациент» относится к любому организму, которому композиция согласно изобретению, может быть введена, например, в экспериментальных, диагностических, профилактических и/или терапевтических целях. Типичные субъекты включают в себя животных (например, млекопитающих, таких как мыши, крысы, кролики, отличных от человека приматов, и человека) и/или растения.

[00536] *Т-лимфоциты:* Т-лимфоцит является иммунной клеткой, которая продуцирует Т-клеточные рецепторы (ТКР). Т-лимфоциты могут быть наивным (не подвергавшимся воздействию антигена; повышенная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 и CD45RA, а также уменьшенная экспрессия CD45RO по сравнению с T_{CM}), Т-лимфоцитами памяти (T_M) (подвергавшимся воздействию антигена и долгоживущие) и эффекторными клетками (подвергавшимся воздействию антигена, цитотоксические). T_M могут быть дополнительно разделены на подмножества центральных Т-лимфоцитов памяти (T_{CM}, повышенная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO, и CD95, а также уменьшенная экспрессия CD54RA по сравнению с наивным Т-лимфоцитами) и эффекторные Т-лимфоциты памяти (T_{EM}, уменьшенная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD45RA и повышенная экспрессия CD127 по сравнению с наивными Т-лимфоцитами или T_{CM}). Эффекторные Т-лимфоциты (T_E) относятся к подвергавшимся воздействию антигена CD8⁺ цитотоксическим Т-лимфоцитам, которые имеют уменьшенную экспрессию CD62L, CCR7, CD28, и являются положительными по гранзиму и перфорино по сравнению с T_{CM}. Другие иллюстративные Т-лимфоциты включают в себя регуляторные Т-лимфоциты, такие как CD4⁺ CD25⁺ (Foxp3⁺) регуляторные Т-лимфоциты, и клетки Treg17, а также TR1, Th3, CD8⁺ CD28⁻ и Qa-1 ограниченные Т-лимфоциты.

[00537] *Т-клеточный рецептор:* Т-клеточный рецептор (ТКР) обозначает члена суперсемейства иммуноглобулинов, имеющего переменный антиген-связывающий домен, константный домен, трансмембранную область, и короткий цитоплазматический хвост, который способен специфически связываться с антигенным пептидом, связанным с рецептором ГКГС. ТКР, может быть обнаружен на поверхности клетки или в растворимой форме и, как правило, состоит из гетеродимера, имеющего α и β цепи (также известные как ТКР α и ТКР β , соответственно), или γ и δ цепи (также известные как ТКР γ и ТКР δ , соответственно). Внеклеточная часть цепей ТКР (например, α -цепи, β -цепи) содержит два иммуноглобулиновых домена, переменный домен (например, переменный домен α -цепи или V $_{\alpha}$, переменный домен β -цепи или V $_{\beta}$) на N-конце, и один константный домен (например, константный домен α -цепи или C $_{\alpha}$, и константный домен β -цепи или C $_{\beta}$), связанный с клеточной мембраной. Подобно иммуноглобулинам, переменные домены содержат гиперпеременные участки (CDR), разделенные

каркасными областями (FR). ТКР, как правило, связан с комплексом CD3, с образованием комплекса ТКР. Как применяется в данном документе, термин «комплекс ТКР» относится к комплексу, сформированному объединением CD3 с ТКР. Например, комплекс ТКР может состоять из цепи CD3 γ , цепи CD3 δ , двух цепей CD3 ϵ , гомодимер из цепей CD3 ζ , цепи ТКР α , и цепи ТКР β . В альтернативном варианте, комплекс ТКР может состоять из цепи CD3 γ , цепи CD3 δ , двух цепей CD3 ϵ , гомодимера из цепей CD3 ζ , цепи ТКР γ , и цепи ТКР δ . А «компонент комплекса ТКР», как применяется в данном документе, относится к цепи ТКР (т. е. ТКР α , ТКР β , ТКР γ или ТКР δ), цепи CD3 (т. е. CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 ζ), или комплексу, сформированному двумя или большим количеством цепей ТКР или цепей CD3 (например, комплексу ТКР α и ТКР β , комплексу ТКР γ и ТКР δ , комплексу CD3 ϵ и CD3 δ , комплексу CD3 γ и CD3 ϵ или комплексу суб-ТКР из ТКР α , ТКР β , CD3 γ , CD3 δ и двух цепей CD3 ϵ).

[00538] *Терапевтически эффективное количество:* Как применяется в данном документе, термин «терапевтически эффективное количество» обозначает количество агента доставки (например, нуклеиновой кислоты, лекарственного средства, терапевтического агента, диагностического агента, профилактического средства и т. д.), которого достаточно при введении субъекту, страдающему от или восприимчивому к инфекции, заболеванию, нарушению и/или патологии, для лечения, улучшения симптомов, диагностики, профилактики и/или отсрочки начала возникновения инфекции, заболевания, нарушения и/или патологии. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество предоставляется в виде разовой дозы. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество вводят с помощью схемы дозирования, включающей в себя множество доз. Специалистам в данной области техники будет понятно, что в некоторых вариантах осуществления, форма единицы дозирования может рассматриваться как содержащая терапевтически эффективное количество конкретного агента или сущности, если она содержит такое количество, которое эффективно при введении как часть такой схемы дозирования.

[00539] *Лечение или лечить:* Как применяется в данном документе, термины «лечение» или «лечить» обозначают подход к получению полезного или желаемого результата, включающего в себя клинический результат, предпочтительно, полезный или желательный. Такие полезные или желаемые клинические результаты включают в себя, но не ограничиваются одним или большим количеством из следующего: уменьшение пролиферации (или разрушение) раковых клеток или подверженных другой болезни, уменьшение метастазирования раковых клеток, обнаруженных в злокачественных новообразованиях, сокращение размера опухоли, уменьшение симптомов, вызванных заболеванием, повышение качества жизни тех, кто страдает от данной болезни, уменьшение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания, замедление развития заболевания, и/или увеличения срока выживаемости индивидов.

[00540] *Настройка:* Как применяется в данном документе, термин «настройка» означает корректировку, балансирование или адаптирование одного элемента в ответ на стимул, или по отношению к определенному результату. В одном неограничивающем примере, ЭОС и/или ДД согласно данному изобретению корректируют, балансируют или адаптируют функцию или структуру композиций, к которым они присоединены, прикреплены или прицеплены с ответом на определенные стимулы и/или окружающую среду.

ЭКВИВАЛЕНТЫ И ОБЪЁМ

[00541] Специалистам в данной области техники будет понятно, или они будут в состоянии определить, используя не более чем рутинные эксперименты, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления согласно данному изобретению, описанному в данном документе. Объем данного изобретения не предназначен для ограничения приведенным выше ОПИСАНИЕМ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ, а скорее изложен в прилагаемой ФОРМУЛЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ.

[00542] В формуле изобретения, единственное число существительных может обозначать один или больше чем один, до тех пор пока противоположное или иное не является очевидным из контекста. Требования или описания, которые включают в себя «или» между одним или большим количеством членов группы считаются выполненными, если один, больше чем один, или все члены группы присутствуют в, используются в, или иным образом относятся к данному продукту или процессу, если противоположное или иное не следует из контекста. Изобретение включает в себя варианты осуществления, в которых ровно один член группы присутствует в, используется в, или иным образом относится к данному продукту или процессу. Изобретение включает в себя варианты осуществления, в которых больше чем один, или целая группа членов присутствует в, используется в, или иным образом относится к данному продукту или процессу.

[00543] Следует также отметить, что термин «содержащий» предназначен быть открытым и допускает, но не требует включения дополнительных элементов или этапов. Когда термин «содержащий» используется в данном документе, термин «состоящий из», таким образом, также охвачен и раскрыт.

[00544] Там, где приведены диапазоны, включены крайние значения. Кроме того, следует понимать, что если не указано иное или иное не очевидно из контекста, и как понимается обычным специалистом в данной области техники, значения, которые выражены в виде диапазонов могут подразумевать любое конкретное значение или поддиапазон в пределах указанных диапазонов в различных вариантах осуществления изобретения, до десятой единицы нижнего предела диапазона, если из контекста явно не следует иное.

[00545] Кроме того, следует понимать, что любой конкретный вариант осуществления данного изобретения, который относится к предшествующему уровню техники, может быть явно исключен из любого одного или большего количества пунктов формулы. Поскольку такие варианты осуществления считаются известными обычному специалисту в данной области техники, они могут быть исключены, даже если исключение не указано явно в данном документе. Любой конкретный вариант осуществления композиций согласно данному изобретению (например, любой антибиотик, терапевтический или активный ингредиент; любой способ производства, любой способ использования, и т. д.) может быть исключен из любого одного или большего количества пунктов формулы, по какой-либо причине, независимо от того, связано это или нет с наличием в предшествующем уровне техники.

[00546] Следует понимать, что слова, которые были использованы, скорее являются словами описания, а не ограничения, и что могут быть внесены изменения в пределах прилагаемой формулы изобретения без отхода от истинного объема и сущности данного изобретения в его более широких аспектах.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение новых, отвечающих на действие лигандов, ЭОС или ДД путем мутационного скрининга

План исследования

[00547] Для того, чтобы сконструировать конструкции, которые демонстрируют зависимость от лиганда стабильность, выбирают кандидата лиганд-связывающего домена (LBD) и планируют скрининг на стабильность белка на основе клеток с использованием желтого флуоресцентного белка (YFP) в качестве репортера, чтобы идентифицировать мутанты кандидата LBD, обладающие желаемыми характеристиками дестабилизирующего домена: низкий уровень белка в отсутствие лиганда LBD, (то есть, низкая исходная стабильность), большой динамический диапазон, надежный и предсказуемый режим работы доза-ответ, а также быстрая кинетика деградации (Banaszynski, *et al.*, (2006) *Cell*; 126(5): 995–1004). Кандидат LBD связывается с желаемым лигандом, но не эндогенными сигнальными молекулами.

[00548] Последовательность кандидата LBD (в качестве матрицы) сначала подвергают мутированию с использованием комбинации мутагенеза нуклеотидными аналогами и подверженной ошибкам ПЦР, чтобы получить библиотеки мутантов, основанных на шаблонной последовательности домена-кандидата. Полученные библиотеки клонируют в рамку считывания либо в 5'- или 3'-конец гена YFP, и применяют ретровирусную систему экспрессии для стабильной трансдукции библиотек гибридов YFP в фибробласты NIH3T3.

[00549] Трансдуцированные клетки NIH3T3 подвергают сортировке с от трех до четырех раундами сортировки клеток на проточном цитометре (FACS) для скрининга библиотек кандидатов ДД. Трансдуцированные NIH3T3 клетки культивируют в отсутствие лиганда с высокой аффинностью к домену связывания лиганда (LBD), и клетки, которые демонстрируют низкие уровни экспрессии YFP отбирают с помощью FACS.

Стратегия скрининга I

[00550] Выбранную популяцию клеток культивируют в присутствии высоко-аффинного лиганда лиганд-связывающего домена в течение периода времени (например, 24 часов), после чего клетки сортируют снова с помощью FACS. Клетки, которые демонстрируют высокие уровни экспрессии YFP отбирают посредством FACS и выбранную клеточную популяцию разделяют на две группы, и снова обрабатывают высоко-аффинным лигандом лиганд-связывающего домена в различных концентрациях; одну группу обрабатывают более низкой концентрацией лиганда, а другую обрабатывают высокой концентрацией лиганда, в течение определенного периода времени (например, 24 часов), после чего клетки сортируют снова с помощью FACS. Выделяют экспрессирующие мутанты клетки, которые отвечают на более низкие концентрации лиганда.

[00551] Выделенные клетки, отвечающие на более низкую концентрацию лиганда обрабатывают лигандом снова, и клетки, проявляющие низкие уровни флуоресценции собирают спустя 4 часа после удаления лиганда из среды. Это четвёртая сортировка предназначена для обогащения клеток, которые демонстрируют быструю кинетику деградации (Iwamoto *et al.*, *Chem Biol.* 2010 Sep 24; 17(9): 981–988).

Стратегия скрининга II

[00552] Выбранная клеточная популяция подвергается дополнительным одной или большему количеству сортировок посредством FACS в отсутствие высоко-аффинного лиганда LBD, и для дальнейшего анализа отбирают клетки, которые демонстрируют низкие уровни экспрессии YFP. Клетки обрабатывают высоко-

аффинным лигандом лиганд-связывающего домена, в течение периода времени (например, 24 часа), и сортируются снова с помощью FACS. Клетки, экспрессирующие высокие уровни YFP отбирают посредством FACS. Клетки с высокой экспрессией YFP обрабатывают лигандом снова, и клетки, проявляющие низкие уровни флуоресценции собирают спустя 4 часа после удаления лиганда из среды для обогащения клеток, которые демонстрируют быструю кинетику деградации. Любой из сортировочных шагов может быть повторен для идентификации ДД с стабильностью, зависимой от лиганда

[00553] Клетки выделяют после сортировки. Собирают идентифицированные клетки-кандидаты и выделяют геномную ДНК. Кандидаты ДД амплифицируют с помощью ПЦР и выделяют. Секвенируют кандидаты ДД и сравнивают с шаблонным LBD для выявления мутаций в ДД-кандидатах.

Пример 2. ДД-регулируемая экспрессия рекомбинантного ИЛ-12

[00554] Конструкции (ДД)-ИЛ12 FKBP и (ДД)-ИЛ12 DHFR были упакованы в pLVX IRES-Puro лентивирусные векторы с промоторами CMV, EF1a или PGK или без промотора. ИЛ12, состоит из двух субъединиц, p40 и p35, которые разделены линкером. Сигнальная последовательность p40 был вставлен рядом с ДД или ИЛ12. В некоторых конструкциях присутствовал сайт расщепления протеазой фурином или модифицированный сайт фурина.

[00555] НЕК293Т клетки временно трансфицировали с помощью 200 нг или 1 мкг плазмид FKBP-ИЛ12 (OT-IL12-001 к OT-IL12-005), а затем обрабатывали с помощью 10 мкМ Shield-1, или контрольного носителя в течение 6 часов. Питательные среды собирали из трансфицированных клеток и разводили 1:50 для измерения уровня ИЛ12 с помощью ИФА p40. Коэффициент стабилизации был определен как кратное изменение в экспрессии ИЛ12 с обработкой лигандом по сравнению с обработкой ДМСО (т. е. в отсутствие лиганда) с одной и той же конструкцией. Желательным является коэффициент стабилизации больше 1. Средние значения сигнала ИФА ИЛ-12 и коэффициента стабилизации, представлены в Таблице 15.

Таблица 15: Лиганд-зависимая индукция ИЛ12

Конструкция ID	Носитель	10 мкМ Shield-1	Коэффициент стабилизации
OT-IL12-001	1289,61	1748,95	1,36
OT-IL12-002	18,01	50,73	2,82
OT-IL12-003	1762,55	2138,25	1,21
OT-IL12-004	385,95	1567,62	4,06
OT-IL12-005	1188,42	2670,80	2,25
НЕК293Т	-12,921	-22,015	

[00556] OT-IL12-002 и OT-IL12-004 показали низкий уровень экспрессии ИЛ12 в отсутствие лиганда по сравнению с уровнями ИЛ12 в НЕК 293Т исходных клетках. Обработка Shield-1 приводила к увеличению уровней ИЛ12 в конструкциях OT-IL12-002, OT-IL12-004 и OT-IL12-005 и давала коэффициент стабилизации от 2 до 4. Эти данные показывают, что OT-IL12-002 и OT-IL12-004 дестабилизированные в отсутствие данных конструкций, стабилизируются Shield-1.

[00557] Экспрессию ИЛ12 измеряли в клетках после стабильной трансдукции. 500000 клеток, стабильно трансдуцированных OT-IL12-004, высевали в 12-луночную плашку и инкубировали в течение ночи в культуральной среде, состоящей из модифицированной Дульбекко среды Игла (DMEM) и 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС). На следующий день клетки обрабатывали 1мкМ Shield-1, или контрольным

носителем в течение 6 или 24 часов. После обработки Shield-1, среду в которой росли клетки отделяли от клеток и разбавляли с кратностью 10, 40, 160 или 640, и количественно измеряли уровни ИЛ12 с использованием ИФА ИЛ12-р40. Коэффициент стабилизации был определен как кратное изменение в экспрессии ИЛ12 с обработкой лигандом по сравнению с обработкой ДМСО (т. е. в отсутствие лиганда) с одной и той же конструкцией. Желательным является коэффициент стабилизации больше 1. Средние значения сигнала ИФА ИЛ12 и коэффициента стабилизации через 6 часов представлены в Таблице 16.

Таблица 16: Лиганд-зависимая индукция ИЛ-12 (6 часов)

Разбавление среды (кратность)	6 часов		
	Носитель	Shield-1	Коэффициент стабилизации
10	0,17	0,58	3,35
40	0,10	0,26	2,62
160	0,08	0,12	1,41
640	0,09	0,08	0,93

[00558] Наблюдали коэффициент стабилизации ИЛ12 больше чем 1 при разведениях среды, кратных 10, 40 и 160, что свидетельствует о том, что ИЛ-12 стабилизируется обработкой Shield-1 при этих разведениях, в течение 6 часов.

[00559] Средние значения сигнала ИФА ИЛ12 и коэффициента стабилизации на 24 часу представлены в Таблице 17.

Таблица 17: Лиганд-зависимая индукция ИЛ-12 (24 часов)

Разбавление среды (кратность)	24 часа		
	Носитель	Shield-1	Коэффициент стабилизации
10	0,28	1,33	4,69
40	0,12	0,79	6,39
160	0,09	0,30	3,44
640	0,08	0,12	1,46

[00560] Коэффициент стабилизации ИЛ12 был больше чем 1 при всех протестированных разведениях среды, и самый высокий коэффициент стабилизации наблюдали при 40-кратном разведении среды на 24 часу, что свидетельствует о лиганд-зависимой стабилизации.

[00561] Для того, чтобы оценить Shield-1 зависимую индукцию FKBP-ИЛ-12 с течением времени, 2 миллиона клеток высевали в среду для роста и инкубировали в течение ночи в присутствии 1мкМ Shield-1, или контрольного носителя. Клетки затем инкубировали с лигандом в течение 2, 4, 6, 8, 24, 48 или 72 часов и ростовую среду собирали для клеток во всех моментах времени. Ростовую среду разбавляли в 400 раз, и уровни ИЛ12 измеряли с использованием ИФА ИЛ12 р40. Коэффициент стабилизации был определен как

кратное изменение в экспрессии ИЛ12 с обработкой лигандом по сравнению с обработкой ДМСО (т. е. в отсутствие лиганда) с одной и той же конструкцией. Желательным является коэффициент стабилизации больше 1. Средние значения сигнала ИФА ИЛ-12 и коэффициента стабилизации, представлены в Таблице 18.

Таблица 18: Индукция ИЛ12 с течением времени

Время (ч)	Носитель	Shield-1	Коэффициент стабилизации
2	0,13	0,18	1,41
4	0,14	0,26	1,89
6	0,13	0,29	2,30
8	0,14	0,28	1,99
24	0,18	0,99	5,47
48	0,23	1,79	7,71
72	0,26	1,63	6,28

[00562] Коэффициент стабилизации увеличивался с течением времени и достигал максимума на 48 час, предполагая, что ИЛ-12 стабилизируется Shield-1 с увеличением продолжительности обработки лигандом.

[00563] Для того, чтобы оценить зависимость продуцирования FKBP-ИЛ12 от уровней дозы Shield-1, клетки НЕК293Т, трансдуцированные ОТ-ИЛ12-004, высевали с различными плотностями (40000 клеток, 20000, 10000 клеток или 5000 клеток/лунка) в 96-луночную плашку. После инкубации в течение ночи, клетки обрабатывали ростовой средой, содержащей от 0 до 10 мкМ Shield-1 в течение 24 часов. Среду затем собирали, разводили в 400 раз и уровни FKBP-ИЛ12 измеряли с использованием ИФА ИЛ12-p40. Средние значения сигнала ИФА ИЛ-12 представлены в Таблице 19.

Таблица 19: Зависимая от дозы и числа клеток индукция ИЛ12

Shield-1 (мкМ)	40000 клеток/лунка	20000 клеток/лунка	10000 клеток/лунка	5000 клеток/лунка
10	623,77	656,70	214,11	193,62
3,333333	670,64	618,10	273,74	207,55
1,111111	677,27	872,24	322,56	203,71
0,37037	368,17	582,71	250,49	172,50
0,123457	197,29	343,34	156,98	95,92
0,041152	171,50	205,68	63,79	48,89
0,013717	117,25	103,56	13,30	-2,35
0,004572	66,34	60,58	2,11	-8,53
0,001524	100,43	39,55	-13,58	-21,76
0	83,49	7,92	-21,76	-26,97

[00564] Наблюдали зависимую от дозы индукцию ИЛ12 при всех протестированных количествах клеток. Индукция ИЛ12 увеличивалась с Shield-1 вплоть до дозы 1 мкМ; после чего индукция ИЛ12

стабилизировалась. Следует отметить, что наблюдалась большая индукция ИЛ-12 при 2000 и 4000 клеток/лунка.

Пример 3. Регулируемые ДД опосредованные рекомбинантным ИЛ12 функции в клетках HEK293T

[00565] Были использованы клетки HEK-Blue sensor (Invivogen, Сан-Диего, Калифорния), чтобы оценить, способен ли ИЛ12, регулируемый ДД, регулировать нисходящий сигналинг ИЛ12. В данных клетках рецептор ИЛ-12, STAT4 и нисходящие элементы транскрипции соединяли с геном-репортером, для того, чтобы можно было наблюдать сигналинг ИЛ-12. Один миллион HEK 293T трансфицировали 200 нг плазмиды OT-IL12-003 с использованием Липофектамина 2000 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Через 48 часов после трансфекции клетки обрабатывали ростовой средой, содержащей 10 мкМ Shield-1, инкубировали в течение 24 часов, после чего среду собирали. 50000 клеток HEK 293 Blue sensor высевали в 96-луночные плашки и инкубировали в течение ночи со средой (при различных разведениях) от Shield-1 обработанных OT-IL12-003 экспрессирующих ИЛклеток HEK293T. После инкубации в течение ночи, 20 мкл среды удаляли из каждой лунки и инкубировали с 180 мкл реагента Quanti-Blue (Invivogen, Сан-Диего, Калифорния) в течение 30 минут при 37 °С. Поглощение измеряли при 620 нм с использованием спектрофотометра. Для получения стандартной кривой, 180 мкл реагента Quanti-Blue смешивали с 20 мкл рекомбинантного ИЛ-12 при следующих концентрациях 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,8 и 3,9 пг/мл. Концентрации функционального ИЛ12 были определены путем сравнения оптической плотности каждого образца с стандартной кривой ИЛ12. Измеряемые уровни функционального ИЛ-12 были достигнуты с 640-кратными разведениями ИЛ-12-содержащей ростовой среды и далее было плато при более высоких концентрациях среды (Фиг. 19А).

[00566] Была измерена зависимость продукции функционального ИЛ-12 от используемой дозы Shield-1. 10000 клеток HEK293T, стабильно трансдуцированных OT-IL12-004, высевали в 96-луночные плашки и обрабатывали ростовой средой, содержащей 10, 3,33, 1,11, 0,37, 0,12, 0,04, 0,01, 0,005, 0,002 или 0 мкМ Shield-1 в течение 24 часов. После обработки Shield-1, среду отделенную от клеток разводили в 200 раз и 20 мкл разбавленной среды добавляли к клеткам HEK Blue sensor. После инкубации в течение ночи, 20 мкл среды удаляли из каждой лунки и инкубировали с 180 мкл реагента Quanti-Blue (Invivogen, Сан-Диего, Калифорния) в течение 30 минут при 37 °С. Поглощение измеряли при 620 нм с использованием спектрофотометра. Для получения стандартной кривой, 180 мкл реагента Quanti-Blue смешивали с 20 мкл рекомбинантного ИЛ-12 при следующих концентрациях 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,8 и 3,9 пг/мл. Концентрации функционального ИЛ12 были определены путем сравнения оптической плотности каждого образца с стандартной кривой ИЛ12. Наблюдали зависимость от дозы увеличение уровней функционального ИЛ12 (Фиг. 19В).

Пример 4. ДД-регулируемая экспрессия рекомбинантного ИЛ-12 *in vivo*

[00567] Опухолевые клетки SKOV3, экспрессирующие FBP-регулируемый ИЛ12 (№ OT-IL12-009) или исходные клетки имплантировали мышам SCID Beige (День 0). Мышам с имплантированным FКВР ИЛ12 вводили внутривенно Shield-1 (10 мг/кг) или носитель-контроль в День 2 и День 7, в то время как исходные клетки оставляли необработанными. Пробы крови отбирали на 0, 2, 4, 6, 8 и 24 ч после введения Shield-1 и уровни ИЛ12 человека в плазме измеряли с помощью ИФА. Средняя скорректированная концентрация в плазме ИЛ12 представлена на Фиг. 19С. На 2-й день, уровни ИЛ12 увеличивались в обработанных Shield-1, и уровни были выше, чем таковые для носителя-контроля на 4, 6, 8 и 24 час. Максимальные уровни ИЛ12 были обнаружены в обработанных Shield-1 мышей через 8 ч после обработки.

В противоположность этому, на 7-й день, уровни ИЛ12 были очень низкими и почти сопоставимы с уровнями ИЛ12 в исходных клетках SKOV3.

[00568] Эксперимент повторяли спустя 28 дней после имплантации опухолевых клеток SKOV3. Мыши были разделены на три группы, с группами, получавшими 1, 2 или 3 дозы лиганда или носителя-контроля. Мыши получали многократные дозы с двухчасовым интервалом. Образцы крови собирали непосредственно перед первой дозой (0 часов) и через 6 часов и через 24 часа после первого введения дозы. Были измерены уровни ИЛ12 в плазме и средние концентрации ИЛ12 показаны на Фиг. 19D. Схема введение - две дозы и три дозы, давала более высокие уровни ИЛ12 в плазме по сравнению с образцами, обработанными носителем. Пиковые уровни ИЛ12 в плазме были обнаружены на 6 час после обработки Shield-1 для всех схем дозирования, а самые высокие уровни ИЛ-12 были обнаружены в плазме со схемой из трёх доз. Это свидетельствует о лиганд-зависимой стабилизации ИЛ12 *in vivo*.

Пример 5. ДД-регулируемый ИЛ15

[00569] Для тестирования лиганда-зависимого продуцирования ИЛ15, 1 миллион клеток НЕК-293Т высевали в 6-луночную плашку в ростовой среде, содержащей DMEM и 10% ФБС, и инкубировали в течение ночи при 37 °C в 5% CO₂. Затем клетки трансфицировали 100 нг ОТ-IL15-001 (конститутивный) или ОТ-IL15-002 (сDHF-ИЛ15) с использованием Липофектамина 2000 и инкубировали в течение 48 часов. После инкубации среду заменяли на ростовую среду с 10 мкМ триметоприма или носителем-контролем, и дополнительно инкубировали в течение 24 часов. Среду собирали и неразбавленные образцы или образцы, разведенные в 4, 16, 256, 1024, 4096 или 16384 раз, были протестированы с использованием ИФА ИЛ-15 человека. Коэффициент стабилизации был определен как кратное изменение в экспрессии ИЛ15 с обработкой лигандом по сравнению с обработкой ДМСО (т. е. в отсутствие лиганда) с одной и той же конструкцией. Желательным является коэффициент стабилизации больше 1. Средние значения сигнала ИФА ИЛ-15 и коэффициента стабилизации, представлены в Таблице 20.

Таблица 20: Индукция ДД-ИЛ15

Разведение среды (кратность)	Носитель	10 мкМ TMP	Коэффициент стабилизации
1	0,396	0,820	2,073
4	0,154	0,287	1,867
16	0,074	0,116	1,567
64	0,056	0,073	1,301
256	0,053	0,057	1,075
1024	0,053	0,048	0,910
4096	0,049	0,049	0,995
16384	0,050	0,049	0,994

[00570] Разбавленные в 16 раз, 4 раза, и неразбавленные образцы среды показали степень стабилизации больше чем 1,5, что свидетельствует о триметоприм-зависимой стабилизации ИЛ15 при данных разведениях.

Пример 6. ДД-регулируемая экспрессия гибридной молекулы ИЛ-15-ИЛ-15Ra

[00571] Гибридную молекулу получают путем слияния связанного с мембраной ИЛ-15, субъединицы альфа рецептора ИЛ-15 (ИЛ15Ra) и ДД, таких как ecDHFR (ДД), FKBP (ДД), или DHFR человека (ДД). Эти гибридные молекулы клонировали в вектор pLVX-EF1a-IRES-Puro.

[00572] Для тестирования лиганда-зависимого продуцирования ИЛ15-ИЛ15Ra, 1 миллион клеток НЕК-293Т высевали в 6-луночную плашку в ростовой среде, содержащей DMEM и 10 ФБС, и инкубировали в течение ночи при 37 °C в 5% CO₂. Затем клетки трансфицировали 100 нг конститутивного ИЛ15-ИЛ15Ra (OT-IL15-008) или ДД-связанного ИЛ15-ИЛ15Ra (OT-IL15-006, OT-IL15-007, OT-IL15-009, OT-IL15-010, OT-IL15-011) с использованием Липофектамина 2000 и инкубировали в течение 24 часов. После инкубации среду заменяли на ростовую среду с или без 10 мкМ триметоприма или 1 мкМ Shield-1, и дополнительно инкубировали в течение 24 часов. Клетки собирали и уровни ИЛ15 анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием человеческого ИЛ-15 антитела (Abscam, Кембридж, Великобритания). OT-IL15-009 продемонстрировала сильную лиганд-зависимую (триметоприт) стабилизацию ИЛ15, в то время как OT-IL15-006 и OT-IL15-007 продемонстрировали умеренную лиганд-зависимую стабилизацию ИЛ15 (Фиг. 20а).

[00573] Поверхностную экспрессию мембран-связанных конструкций ИЛ15-ИЛ15Ra (OT-IL15-006, OT-IL15-007, OT-IL15-008, OT-IL15-009, OT-IL15-010, OT-IL15-011) определяли с помощью FACS с использованием анти-ИЛ-15 и анти-ИЛ15Ra антител. Клетки НЕК293Т трансфицировали конструкциями ИЛ15-ИЛ15Ra, а затем обрабатывали подходящим лигандом (Shield-1 или триметоприм). Спустя 48 часов после трансфекции клетки анализировали с помощью FACS. Как и следовало ожидать, конструкция OT-IL15-008 конститутивного ИЛ15-ИЛ15Ra продемонстрировала высокую поверхностную экспрессию ИЛ15 и ИЛ15Ra как в присутствии, так и в отсутствие лиганда. В соответствии с результатами Вестерн-блоттинга, OT-IL15-009 продемонстрировала сильную лиганд-зависимую (триметоприм) поверхностную экспрессию ИЛ15 и ИЛ15Ra (Фиг. 20В, Фиг. 20С).

[00574] Конструкции мембран-связанного ИЛ15-ИЛ15Ra (OT-IL15-008 к OT-IL15-011) трансдуцировали в клеточную линию карциномы ободочной и прямой кишки человека, НСТ-116, и стабильные интегранты были отобраны с помощью 2 мкг пуромицина. Клетки с стабильной интеграцией затем инкубировали в течение 24 часов в присутствии или в отсутствие 10 мкМ триметоприма или 1 мкМ метотрексата.

[00575] Поверхностную экспрессию гибридных конструкций ИЛ15-ИЛ15Ra исследовали путем окрашивания PE-конъюгированным антителом к ИЛ15Ra (кат. № 330207, BioLegend, Сан-Диего, Калифорния). Медианная интенсивность флуоресценции, полученная для различных конструкций в присутствии или в отсутствие соответствующего лиганда, представлена в Таблице 21.

Таблица 21: Поверхностная экспрессия гибридных конструкций ИЛ15-ИЛ15Ra

Конструкция	Медианная интенсивность флуоресценции		
	ДМСО	10 мкМ TMP	1 мкМ MTX
Клетки НСТ-116 (контроль)	273		
OT-IL15-008 (конститутивная)	5315	7019	
OT-IL15-006 (ecDHFR (R12Y, E129K))	764	2978	
OT-IL15-010 (hDHFR (Y122I, A125F))	2657	5775	15864
OT-IL15-011(hDHFR (Q36F, N65F, Y122I))	1560	4010	14509

[00576] Коэффициент стабилизации был определен как кратное изменение в интенсивности GFP для образцов, обработанных лигандом, по сравнению с обработкой ДМСО (т. е. в отсутствие лиганда) с одной и той же конструкцией. Коэффициент дестабилизации был определен как кратное изменение в интенсивности GFP для регулируемых ДД конструкций, по сравнению с конститутивными конструкциями (OT-IL15-008) в отсутствие лиганда. Для ДД желательны коэффициенты дестабилизации меньше чем 1 и коэффициенты стабилизации больше чем 1. Коэффициенты представлены в Таблице 22.

Таблица 22: Коэффициенты дестабилизации и стабилизации ИЛ15-ИЛ15Ra

Конструкция	Коэффициент дестабилизации	Коэффициент стабилизации	
		TMP	MTX
OT-IL15-008 (конститутивная)	19,47	1,32	
OT-IL15-006 (ecDHFR (R12Y, E129K))	0,14	3,90	-
OT-IL15-010 (hDHFR (Y122I, A125F))	3,48	2,17	5,97
OT-IL15-011(hDHFR (Q36F, N65F, Y122I))	0,59	2,57	9,30

[00577] Наблюдали коэффициенты дестабилизации менее чем 1 с OT-IL15-006 (ecDHFR (R12H, E129K)) и OT-IL15-011 (hDHFR (Q36F, N65F, Y122I)), что указывает на сильную дестабилизацию в отсутствие лиганда. Коэффициент стабилизации больше чем 1 наблюдали для всех конструкций с обработкой TMP, и с обеими - OT-IL15-010 и 11, с обработкой метотрексатом. Эти данные показывают, что OT-IL15-006 и OT-IL15-011 обе сильно дестабилизированы в отсутствие лиганда и сильно стабилизированы в присутствии лиганда.

[00578] Экспрессию и лиганд-зависимую стабилизацию конструкций ИЛ15-ИЛ15Ra (OT-IL15-008 к OT-IL15-011) измеряли в НСТ-116. Клетки инкубировали с 10 мкМ триметоприма, или 1 мкМ метотрексата или ДМСО, в течение 24 часов. После инкубации клетки собирали и готовили клеточные экстракты. Клеточные экстракты прогоняли на ДНС-ПААГ и проводили Вестерн-блоттинг с анти-ИЛ15 антителом (кат. № 7213, Abscam, Кембридж, Великобритания). Как показано на Фиг. 20D, конститутивная конструкция (OT-IL15-008) ИЛ15/ИЛ15Ra продемонстрировала независимую от лиганда экспрессию ИЛ15, в то время как ДД-регулируемые конструкции (OT-IL15-009 к OT-IL15-011) продемонстрировали зависимость от лиганда экспрессию ИЛ15. Идентичность полос для ИЛ15 была также подтверждена с помощью иммуноблоттинга с анти-человеческий DHFR антителом (кат. № 117705, Genetex, Ирвин, Калифорния). Как показано на Фиг. 20D, обе гибридные конструкции ИЛ15-ИЛ15Ra (OT-IL15-010 и 011) продемонстрировали зависимость от лиганда экспрессию DHFR.

[00579] Для того, чтобы оценить зависимость от дозы лиганд-индуцированную стабилизацию, гибридные конструкции ИЛ15-ИЛ15Ra, а именно, OT-IL15-009 (ecDHFR (R12Y, Y100I)), OT-IL15-010 (hDHFR (Y122I, A125F)), и OT-IL15-011 (hDHFR (Q36F, N65F, Y122I)) стабильно трансдуцировали в клетки НСТ-116 и инкубировали с возрастающими концентрациями триметоприма в течение 24 часов. Поверхностную экспрессию конструкции гибридного ИЛ15-ИЛ15Ra количественно определяли с помощью FACS с использованием ИЛ15Ra-PE антитела. Медианная интенсивность флуоресценции с увеличением дозы TMP представлена в Таблице 23.

Таблица 23: Поверхностная экспрессия ИЛ15-ИЛ15Ra

Доза (мкМ)	Медианная интенсивность флуоресценции		
	ecDHFR (R12Y, 100I)	hDHFR (Y122I, A125F)	hDHFR (Q36F, N65F, Y122I)
ДМСО	1260	3034	2357
0,01	1384	2791	2291
0,02	1492	2833	2216
0,05	1947	2924	2054
0,14	2741	2740	2150
0,41	3360	2817	2400
1,23	4014	2890	2251
3,7	4265	3117	2494
11,11	4267	3473	2841
33,33	4485	4019	3409
100	4633	5227	4592

[00580] Как показано в Таблице 23, все три конструкции показали зависимость от дозы увеличения медианной интенсивности флуоресценции, указывающее на зависимость от дозы увеличения поверхностной экспрессии гибрида ИЛ15-ИЛ15Ra при добавлении лиганда, стабилизирующего ДД.

[00581] Зависимость от времени лиганд-зависимую стабилизацию гибридных конструкций ИЛ15-ИЛ15Ra измеряли в клетках НСТ-116. Клетки трансдуцировали конструкцией OT-IL15-009 (ecDHFR (R12Y, Y100I)) и инкубировали с 10 мкМ триметоприма в течение 0, 12, 16, 24, 48 или 72 часов. После инкубаций, количественно определяли поверхностную экспрессию гибрида ИЛ15-ИЛ15Ra с помощью FACS с использованием ИЛ15Ra-PE антител и сравнивали с исходными нетрансфицированными клетками. Медианная интенсивность флуоресценции (МИФ) с течением времени представлена в Таблице 24.

Таблица 24: Зависимость от времени поверхностная экспрессия ИЛ15-ИЛ15Ra

Время (часы)	МИФ
Исходные	3054
0	4004
12	7054
16	9390
24	14056
48	28644
72	35303

[00582] Как показано в Таблице 24, OT-IL15-009 (ecDHFR (R12Y, Y100I)) продемонстрировала зависимость от времени увеличение медианной интенсивности флуоресценции, означая то, что поверхностная экспрессия гибрида ИЛ15-ИЛ15Ra возрастает с увеличением продолжительности обработки лигандом, стабилизирующем ДД.

Пример 7. Регулируемая ДД экспрессия ХАР CD19

[00583] Гибридный полипептид ХАР CD19 был соединен либо с FKBP-ДДД, ecDHFR-ДД или DHFR-ДД человека, и конструкции были клонированы в вектор pLVX-IRES-Puro.

[00584] ДД FKBP, ecDHFR и hDHFR были расположены либо между scFv CD19 и шарниром CD8 α (OT-CD19C-002, OT-CD19C-003), между шарниром CD8 α и трансмембранным доменом (OT-CD19C-004, OT-CD19C-005) или на С-конце конструкции (OT-CD19C-007, OT-CD19C-008, OT-CD19C-009, OT-CD19C-010, OT-CD19C-011). В некоторых случаях, сайт расщепления фурина был добавлен между ДД и scFv CD19. Конститутивно экспрессирующаяся конструкция ХАР, OT-CD19C-001 была использована в качестве положительного контроля.

[00585] Для тестирования лиганд-зависимой экспрессии конструкций ХАР ДД-CD19, 1 миллион клеток НЕК 293Т культивировали в ростовой среде, содержащей DMEM и 10% ФБСЮ, и трансфицировали с помощью конструкций ХАР с использованием липофектамина 2000. Через 48 часов после трансфекции клетки обрабатывали 1 мкМ или 10 мкМ Shield-1, 10 мкМ триметоприма, 1 мкМ метотрексата или носителем-контролем и инкубировали в течение 24 часов. Клетки собирали, лизировали и проводили иммуноблоттинг для CD3 дзета, компонента ХАР, с использованием анти-CD247 (BD Pharmingen, Франклин Лейнс, Нью-Джерси) и Alexa 555-конъюгированного козьего анти-мышинного антитела (красное) (Li-Kor, Линкольн, Небраска). Для лизатов также был выполнен иммуноблоттинг на актин с Alexa 488-конъюгированным вторичным антителом (зеленое), чтобы подтвердить равномерную нагрузку белка во всех образцах. По сравнению с необработанным контролем, OT-CD19C-002 и OT-CD19C-003 показали повышенные уровни CD3 дзета в присутствии лигандов Shield-1 и TMP, соответственно указывающее на стабилизацию ХАР CD19 (Фиг. 21А). Как показано на Фиг. 21В, конструкции OT-CD19C-008 и OT-CD19C-010 продемонстрировали сильное увеличение уровней CD3 дзета в присутствии метотрексата и низкие уровни в отсутствие лиганда, что указывает на сильную лиганд-зависимую стабилизацию ХАР CD19. OT-CD19C-007 и OT-CD19C-009 продемонстрировали умеренное увеличение уровней CD3 дзета в присутствии Shield-1 и метотрексата соответственно, что указывает на умеренную лиганд-зависимую стабилизацию ХАР CD19. Как и ожидалось, конструктивно экспрессируемая OT-CD19C-001 продемонстрировала сильную экспрессию ХАР CD19 при отсутствии обработки лигандом.

[00586] Для лизатов из клеток, экспрессирующих конструкции ХАР CD19 также был проведен иммуноблоттинг на 41-BB, компонент ХАР. Как показано на Фиг. 21С, OT-CD19C-008, OT-CD19C-009, OT-CD19C-010 и OT-CD19C-011 продемонстрировали низкие уровни 4-1 BB в отсутствие лиганда и высокие уровни 4-1 BB в присутствии лиганда, метотрексата, что указывает на сильную лиганд-зависимую стабилизацию ХАР CD19 с использованием данных конструкций. OT-CD19C-003, OT-CD19C-006 и OT-CD19C-007 продемонстрировали незначительное увеличение уровней экспрессии 4-1BB при обработке соответствующими лигандами - TMP и Shield-1, что указывает на умеренную лиганд-зависимую стабилизацию ХАР CD19. Конструкции OT-CD19N-014 и OT-CD19N-015, которые содержат сайт расщепления фурина, продемонстрировали дополнительные, меньшие белковые продукты 4 1BB при обработке с помощью MTX. Эту меньшего размер полосу белка 4-1BB наблюдали только с добавлением лиганда, и его молекулярная масса соответствует размеру ХАР CD19 в OT-CD19-001. Эти данные указывают на то, что расщепление фурином происходит только при обработке лигандом.

[00587] Поверхностную экспрессию конструкций ХАР ДД-CD19 в клетках 293Т НЕК измеряли с использованием сортировки на проточном цитометре (FACS) с Белок L-биотин-стрептавидин-

аллофикоцианин, которое связывается с легкой каппа-цепью XAP (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Клетки обрабатывали 1 мкМ Shield-1, 1 мкМ метотрексата, 10 мкМ триметоприма или носителя-контроля в течение 24 часов, и подвергали анализу FACS. Как показано на Фиг. 21D, поверхностную экспрессию OT-CD19C-002 с FKBP-ДД обнаруживали только в присутствии Shield-1, в то время как OT-CD19C-003 с есDHFR-ДД продемонстрировала поверхностную экспрессию только в присутствии триметоприма. Как и следовало ожидать, конститутивно экспрессируемая конструкция OT-CD19C-001 продемонстрировала высокий уровень экспрессии, как в обработанных лигандом, так и контролем-носителем клеток. Дополнительные конструкции были проанализированы с помощью FACS с соединением Белок L-биотин-стрептавидин-аллофикоцианин в отдельном эксперименте. Процент GFP-положительных клеток, полученных с помощью каждой конструкции в присутствии или в отсутствие лиганда представлен в Таблице 25. В Таблице 25, Н/П обозначает «не применимо».

Таблица 25: Процент GFP-позитивных клеток

Конструкция	Лиганд	Процент GFP-позитивных клеток	
		Нет лиганда	Лиганд
OT-CD19C-001	Н/П	46,8	45,4
OT-CD19C-006	TMP	46,6	43,6
OT-CD19C-007	Shield-1	28,9	34
OT-CD19C-008	MTX	15,8	31,3
OT-CD19C-009	MTX	16,5	34,2
OT-CD19C-010	MTX	14,8	33
OT-CD19C-011	MTX	14,5	32,9
OT-CD19C-012	TMP	19,1	18,7
OT-CD19C-013	Shield-1	0,91	0,4
OT-CD19C-014	MTX	4,68	16,2
OT-CD19C-015	MTX	3,04	18,2

[00588] Увеличение доли GFP позитивных клеток наблюдали с OT-CD19C-007, OT-CD19C-008, OT-CD19C-009, OT-CD19C-010, OT-CD19C-011, OT-CD19C-014, и OT-CD19C-015. Наибольшее увеличение доли GFP позитивных клеток наблюдали с конструкциями OT-CD19C-014 и OT-CD19C-015.

[00589] Значения средней интенсивности флуоресценции представлены в Таблице 26. В Таблице 26, СИФ, представляет собой среднюю интенсивность флуоресценции. Коэффициент стабилизации был определен как кратное изменение в интенсивности GFP для образцов, обработанных лигандом, по сравнению с обработкой ДМСО (т. е. в отсутствие лиганда) с одной и той же конструкцией. Коэффициент дестабилизации был определен как кратное изменение в интенсивности GFP для регулируемых ДД конструкций, по сравнению с конститутивными конструкциями (OT-CD19C-001) в отсутствие лиганда. Являются желательными коэффициенты дестабилизации меньше чем 1 и коэффициенты стабилизации больше чем 1.

Таблица 26: Поверхностная экспрессия ХАР CD19

Конструкция	Лиганд	МИФ		Коэффициент дестабилизации	Коэффициент стабилизации
		Нет лиганда	Лиганд		
OT-CD19C-001	H/П	453	407		0,90
OT-CD19C-006	TMP	425	325	0,94	0,76
OT-CD19C-007	Shield-1	132	123	0,29	0,93
OT-CD19C-008	MTX	89,4	148	0,20	1,66
OT-CD19C-009	MTX	93,3	200	0,21	2,14
OT-CD19C-010	MTX	85,6	160	0,19	1,87
OT-CD19C-011	MTX	83,3	172	0,18	2,06
OT-CD19C-012	TMP	112	105	0,25	0,94
OT-CD19C-013	Shield-1	61	49,5	0,13	0,81
OT-CD19C-014	MTX	78,6	124	0,17	1,58
OT-CD19C-015	MTX	73,3	143	0,16	1,95

[00590] Коэффициент дестабилизации меньше чем 1 наблюдался для всех конструкций, что указывает на то, что все ДД-регулируемые конструкции дестабилизируются в отсутствие лиганда. Коэффициент стабилизации больше чем 1 наблюдали для OT-CD19C-008, OT-CD19C-009, OT-CD19C-010, OT-CD19C-011, OT-CD19C-014 и OT-CD19C-015. Следует отметить, что данные конструкции также дестабилизируются в отсутствие лиганда и, следовательно, представляют собой подходящую конструкцию CD19-ДД.

Пример 8. *In vitro* анализ развития Т-лимфоцитов

[00591] Цель исследования состояла в том, чтобы определить схему стимуляции Т-лимфоцитов и дозу ИЛ-12, необходимые для максимизации устойчивости Т-лимфоцитов и дифференциации Т-лимфоцитов *in vitro*. Исследование воспроизводит план схемы адаптивной клеточной терапии, причем Т-лимфоциты первоначально подвергали воздействию антигена *in vitro*, что приводило к активации с последующей фазой покоя и, наконец, переносу *in vivo*, когда Т-лимфоциты снова сталкивались с антигеном. Т-лимфоциты стимулировали гранулами CD3/CD28 или растворимым CD3/CD28 в День 0, и агент-стимул CD3/CD28 смывали в конце 48 часов. Клетки обрабатывали дозой ИЛ12 в диапазоне от 0,01-1000 нг/мл. В День 9, клетки с фенотипом Th1 оценивали путем проверки частоты ИФН-гамма положительных CD4+ клеток и CD8+ клеток. В День 14 клетки разделяли на две группы, одна группа получила вторую стимуляцию CD3/CD28, а вторая группа оставалась не стимулированной. В День 16, фенотип Th1 оценивали в обеих группах с помощью FACS. Результаты для Дня 16 представлены на Фиг. 22. Экспрессия ИФН-гамма была выше в клетках, которые получили рестимуляцию CD3/CD28 в День 14 по сравнению с клетками, которые не получали вторую стимуляцию. Это указывает на то, что как рестимуляция антигеном, так и воздействие ИЛ12, были необходимы для фенотипа Th1. Кроме того, так мало, как 0,1 нг/мл ИЛ-12 было достаточно,

чтобы вызвать смещение к Th1 и продуцирование ИФН-гамма из Т-лимфоцитов *in vitro*, а более высокие дозы ИЛ12 дополнительно улучшили этот эффект.

Пример 9. Измерение ответов Т-лимфоцитов человека *in vitro* и *in vivo*

[00592] ИЛ12 способствует дифференциации наивных Т-лимфоцитов в клетки Th1, что приводит к секреции ИФН-гамма Т-лимфоцитами. Т-лимфоциты человека обрабатывали ИЛ12 или оставляли необработанными, и анализировали с помощью проточной цитометрии на экспрессию ИФН-гамма и Т-клеточного маркера CD3. Обработка ИЛ12 приводила к дифференциации Т-лимфоцитов, как измерено по увеличению доли ИФН-гамма-положительных Т-лимфоцитов с 0,21 до 22,3 (смотрите вставку на Фиг. 23А).

[00593] Чтобы проверить, может ли связанный с мембраной гибридный белок ИЛ15/ИЛ15Ra (ОТ-IL15-008) вызвать экспансию Т-лимфоцитов человека, Т-лимфоциты человека трансдуцировали с помощью конструкции. Пролиферацию Т-лимфоцитов измеряли путем оценки прямого и бокового рассеивания популяции Т-лимфоцитов с использованием проточной цитометрии. Трансдукция конструкцией мембран-связанного гибрида ИЛ15/ИЛ15Ra приводила к экспансии Т-лимфоцитов человека (58,9) по сравнению с контрольными нетрансфицированными клетками (37,8) (Фиг. 23В).

[00594] Отслеживание Т-лимфоцитов после их адаптивного переноса имеет решающее значение для определения их распространения в различных зонах в хозяине, их идентичности и устойчивости с течением времени. Т-лимфоциты человека стимулировали гранулами CD3/CD28 и инкубировали с 50 Ед/мл ИЛ-2. Клетки размножали *in vitro* в течение 7 дней с добавлением ИЛ-2 в День 3 и День 5. В День 5, гранулы CD3/CD28 удаляли, и клетки культивировали в течение двух дней. В День 7, клетки промывали, чтобы удалить ИЛ2, и 5 миллионов Т-лимфоцитов человека вводили внутривенно иммунодефектным мышам NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ. Образцы крови были получены спустя 4, 24, 120 и 168 часов после переноса клеток. Мыши были умерщвлены спустя 168 часов после переноса клеток, и были собраны костный мозг и селезенка. Иммунные клетки выделяли из всех образцов и анализировали на наличие Т-лимфоцитов человека с использованием маркеров клеточной поверхности CD3 и CD45. Как показано на Фиг. 23С, процент CD3-положительных, CD45-положительных Т-лимфоцитов человека в крови был выше у животных, которым вводили Т-лимфоциты человека, особенно на 120 и 168 часу. CD3-положительные, CD45-положительные Т-лимфоциты человека были также обнаружены в селезенке и костном мозге животных, которым вводили Т-лимфоциты человека. Как и ожидалось, не было обнаружено CD3-положительных, CD45-положительных Т-лимфоцитов человека у контрольных животных, которым не вводили Т-лимфоциты человека.

[00595] Для того, чтобы определить идентичность Т-лимфоцитов после адаптивного переноса, брали пробы крови из мышей через 48 часов после инъекции. CD4 и CD8 Т-лимфоциты анализировали на поверхностную экспрессию CD45RA и CD62L. Оба маркера имели высокий уровень экспрессии в наивных Т-лимфоцитах, но теряются тогда, когда Т-лимфоциты подвергаются воздействию антигена. Как показано на Фиг. 23D, CD4 и CD8 Т-лимфоциты человека продемонстрировали высокую поверхностную экспрессию обоих маркеров до инъекции мышам, но потеряли их спустя 48 часов после переноса клеток *in vivo*, указывая на то, что Т-лимфоциты человека подвергаются воздействию антигена *in vivo*.

Пример 10. ДД-регулируемые опосредованные ИЛ12 функции

[00596] Функцию ДД-ИЛ12 охарактеризовали *in vivo* путем оценки способности опухолевых клеток, экспрессирующих эти конструкции, давать начало новым опухолям и пролиферировать при обработке соответствующими синтетическими лигандами, например, Shield-1, триметопримом или метотрексатом. 2-

10 миллионов клеток НСТ-116, стабильно трансдуцированных конструкциями, вводили подкожно в виде ксенотрансплантата с 50 матригеля мышам, способным продуцировать функциональные В-лимфоциты и НК-клетки. Примерно через две недели после инъекции, когда опухоли достигают размера примерно 300 кубических мм, мышам вводили соответствующие стабилизирующие лиганды, например, Shield-1, триметоприм или метотрексат в различных концентрациях каждые два дня. Shield-1 вводят с носителем, состоящим из 10 диметилацетамида, 10 Solutol HS15 и 80 физиологического раствора. Объем опухоли и массу тела измеряют два раза в неделю, и эксперимент прекращается, как только опухоли достигают 1000 кубических мм. Собирают образцы плазмы и опухоли через 8 часов после последней дозы лиганда и ИЛ12, а также измеряют уровни лиганда.

[00597] Для того, чтобы оценить способность ИЛ12-экспрессирующих клеток формировать опухоли, клетки НСТ-116, стабильно трансдуцированные конструкциями ДД-ИЛ12, предварительно обрабатывают соответствующими стабилизирующими лигандами, Shield-1, триметоприм или метотрексат, и далее вводят ксенотрансплантаты мышам. Уменьшение роста опухоли и сопутствующее увеличение уровней ИЛ12 у обработанных мышей, по сравнению с необработанными контролями, свидетельствуют об зависимой от условий регуляции ИЛ12 *in vivo*.

Пример 11. ДД-регулируемые опосредованные рекомбинантным ИЛ-12 функции в Т-лимфоцитах

[00598] Функциональные ответы на ДД-ИЛ12 оценивают в первичных Т-лимфоцитах человека, и в линиях клеток человека/трансформированных гемопоэтических клеточных линиях, например, клетках Raji. Т-лимфоциты человека очищали от мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) путем негативной селекции с использованием набора для выделения CD4⁺ Т-лимфоцитов (Miltenyi Biotec, Германия). Т-лимфоциты обрабатывают питательной средой от клеток НЕК 293Т, экспрессирующих конструкции ДД-ИЛ12, в течение 5 дней. Затем клетки активируют гранулами, конъюгированными с гранулами CD3/CD28 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс), в соотношении 3 гранулы на Т-лимфоцит, и культивируют в течение 3-х дней. Функциональный ответ на ДД-ИЛ12 определяют путем измерения гамма-интерферона в CD3-положительных клетках с помощью проточной цитометрии после обработки лигандом или носителем-контролем. ИЛ12 способствует дифференциации наивных Т-лимфоцитов в клетки Th1, что приводит к секреции ИФН-гамма Т-лимфоцитами.

[00599] Для оценки фосфорилирования STAT4 (передатчик сигнала и активатор транскрипции 4), индуцированного ИЛ12, Т-лимфоциты человека выделяют из МКПК и активируют фитогемагглютинином (ФГГ, 2 мкг/мл) в течение 3 дней, с последующей обработкой 50 МЕ/мл интерлейкина 2 (ИЛ-2) в течение 24 часов. Затем клетки промывали, ресуспендировали в свежей среде и оставляли на 4 часа в присутствии лиганда или носителя-контроля. Супернатант из ДД-ИЛ12 экспрессирующих НЕК293Т клеток добавляют к первичным клеткам, с последующей инкубацией в течение 30 минут. Затем клетки собирают и STAT4-фосфорилирование анализируют с использованием антитела к STAT4 (Cell Signaling Technology, Данверс, Массачусетс).

Пример 12. Функциональный анализ ДД-регулируемой гибридной молекулы ИЛ15-ИЛ15Ra

[00600] Активация посредством ИЛ15 может поддерживать устойчивость Т-лимфоцитов путем обеспечения преимущества в выживании. Кроме того, как было показано, гибридная молекула ИЛ15/ИЛ15Ra наделяет Т-лимфоциты фенотипом клеток памяти и увеличивает пролиферацию клеток НК (Hurton (2016), PNAS, 113: E7788-7797; содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

[00601] Для оценки сигналинга с помощью ДД-регулируемых гибридных конструкций ИЛ15-ИЛ15Ra, клетки NK-92 инкубировали с клетками НСТ-116, экспрессирующими ДД-регулируемые гибридные конструкции ИЛ15-ИЛ15Ra. Ожидается, что транс сигналинг от ИЛ15/ИЛ15Ra увеличивает Stat5 фосфорилирование в NK92, которое измеряют с помощью Вестерн-блоттинга и FACS. Также измеряют пролиферацию клеток NK92.

[00602] Для того, чтобы оценить эффект ДД-регулируемых конструкций гибрида ИЛ15-ИЛ15Ra на первичные Т-лимфоциты, лимфоциты трансдуцируют гибридными конструкциями. Измеряют пролиферацию Т-лимфоцитов в отсутствие экзогенной добавки ИЛ15. Фенотип клеток памяти Т-лимфоцитов измеряют путем количественного определения CD62L с помощью FACS.

[00603] Для того, чтобы оценить, могут ли экспрессирующие ДД-ИЛ15/ИЛ15R Т-лимфоциты поддерживать продленную устойчивость *in vivo*, ДД-модифицированные Т-лимфоциты вводили мышам. К конструкциям прицепляли тэг в виде люциферазы делая возможным *in vivo* отслеживание в мышах. Мышей обрабатывал носителем-контролем или соответствующим лигандом, Shield-1, триметопримом или метотрексатом в зависимости от используемой конструкции, и наблюдали в течение периода 40-50 дней с использованием биолюминесцентной визуализации (PerkinElmer, Массачусетс). Мыши, обработанные лигандом, как ожидается, сохраняют Т-лимфоциты, экспрессирующие ДД-ИЛ15/ИЛ15Ra, в то время как Т-лимфоциты обработанных носителем-контролем животных, как ожидается, не будут сохраняться.

Пример 13. ДД-регулируемые экспрессия и функция ХАР CD19 в Т-лимфоцитах

[00604] Лиганд зависимую экспрессию конструкций ХАР ДД-CD19 оценивают в первичных Т-лимфоцитах человека, и в immortalized/трансформированных гемопоэтических клеточных линиях, например, клетках Raji, клетках Jurkat и клетках K562. Т-лимфоциты человека очищали от мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) путем негативной селекции с использованием набора для выделения CD4+ Т-лимфоцитов (Miltenyi Biotec, Германия). Первичные Т-лимфоциты и гемопоэтические клеточные линии стабильно трансдуцируют конструкциями ХАР ДД-CD19. Клетки обрабатывают 10 мкМ Shield-1, 10 мкМ триметоприма, 1 мкМ метотрексата или носителем-контролем, и выполняют иммуноблоттинг для CD3 дзета с использованием анти-CD247 антитела.

[00605] Продукцию функциональной ХАР ДД-CD19 анализируют в Т-лимфоцитах человека или первичных клеточных линий человека (клетки NALM6, K562, Jurkat и Raji). Клетки инкубируют с CD19-экспрессирующими антиген-презентирующими клетками или гибридным белком CD19/Fc в присутствии ДД-стабилизирующих лигандов - Shield-1, TMP или MTX. После инкубации клетки окрашивают флуоресцентно мечеными анти-CD69 антителами и анализируют с помощью проточной цитометрии. Клетки с высокой экспрессией CD69 рассматриваются как имеющие функциональную ХАР ДД-CD19. Функциональный ответ на ХАР ДД-CD19 также определяют путем измерения уровней гамма-интерферона с помощью ИФА. Экспрессирующие ХАР ДД-CD19 клетки должны демонстрировать более высокие уровни гамма-интерферона в присутствии лиганда, чем необработанные клетки.

[00606] Цитолитический потенциал клеток, экспрессирующих ХАР ДД-CD19, оценивали в первичных Т-лимфоцитах человека или первичных клеточных линиях человека (например NALM6, K562 и Raji) с использованием анализа высвобождения хрома-51. Клетки-мишени загружали с $\text{Na}_2 \text{}^{51}\text{CrO}_4$, дважды промывали и ресуспендировали в ростовой среде Phenol Red-Free. Необработанные или обработанные лигандом ХАР ДД-CD19 и трансдуцированные пустым вектором клетки совместно инкубировали с CD 19-экспрессирующими клетками-мишенями с различными эффекторами; с помощью жидкостного

сцинтилляционного счетчика измеряли соотношения клеток мишеней, а также высвобождение хрома в супернатант. Клетки с ХАР ДД-CD19 должны демонстрировать специфический цитоллиз только в присутствии лиганда. Клетки с ХАР ДД-CD19 в отсутствие лиганда или клетки, трансфицированные пустым вектором, как ожидается, демонстрируют минимальную цитолитическую активность.

[00607] Также оценивают противоопухолевую эффективность ХАР ДД-CD19 *in vivo*. Иммунодефектным мышам также вводят экспрессирующие люцифразу лейкозные клеточные линии человека (NALM-6). Затем мышам вводят Т-лимфоциты ХАР ДД-CD19 через хвостовую вену. Мышей делят на группы обработки, и обрабатывают диапазоном доз лиганда. Две контрольные группы также включены в исследование: контрольная группа, которая не получала какой-либо лиганд, и другая группа, не получавшая каких-либо Т-лимфоцитов. Наблюдают за опухолевой нагрузкой, как измерено по активности люциферазы, с течением времени с помощью биолуминесцентной визуализации. Мыши, обработанные с помощью Т-лимфоцитов ХАР ДД-CD19 и лиганда, как ожидается, имеют уменьшенную опухолевую нагрузку по сравнению с контрольными животными.

Пример 14. Оценка противоопухолевого ответа ДД-регулируемых полезных грузов в сингенных мышинных моделях

[00608] Эффективность иммунотерапии рака у организмов с интактными иммунными клетками оценивают с использованием сингенных мышинных моделей, например, мышинных моделей pMEL-1 и 4T1. Иммунные клетки, такие как Т-лимфоциты и NK-клетки выделяют из сингенных мышей и трансдуцируют ДД-регулируемыми полезными грузами, такими как ДД-ИЛ12, ДД-ИЛ15, ДД-ИЛ15-ИЛ15Ra, и ХАР ДД-CD19. Затем клетки вводят мышам подкожно, несущим сингенные опухоли, и обрабатывают различными концентрациями лиганда, Shield-1, триметоприма или метотрексата, в зависимости от используемого ДД. Мыши, обработанные иммунными клетками, трансдуцированными ДД-регулируемым полезным грузом, как ожидается, имеют уменьшенную опухолевую нагрузку, по сравнению с контрольными животными.

Пример 15. Оптимизация рабочего процесса для обнаружения ДД-регулируемых иммунотерапевтических агентов

[00609] Для того, чтобы определить подходят ли конструкции ХАР ДД-CD19 для иммунотерапии, конструкции вводят в клеточные линии, например клетки НЕК293Т и клетки Jurkat. Проверяют экспрессию конструкции в присутствии или в отсутствие соответствующего лиганда. Конструкции, которые показывают низкую базовую экспрессию в отсутствие лиганда, и надежную, зависимую от дозы лиганда экспрессию, выбирают для дополнительного анализа. Если ни одна конструкция ХАР ДД-CD19 не показывает лиганд-зависимой экспрессии, то конструкции изменяют, и эксперимент повторяют до тех пор, пока не идентифицируют регулируемую конструкцию. Затем лиганд-зависимую регуляцию конструкций ХАР ДД-CD19 анализируют *in vitro* в первичных Т-лимфоцитах. Если эти конструкции демонстрируют низкую базовую экспрессию в отсутствие лиганда, и зависимую от дозы лиганда экспрессию, их подвергают ФК/ФД экспериментальной проверке концепции *in vivo*. В противном случае, эти конструкции переделывают и новые конструкции подвергают подобному анализу. Конститутивно экспрессирующиеся конструкции ХАР CD19 трансдуцируют в Т-лимфоциты и экспрессию ХАР CD19 измеряют параллельно с таковой регулируемой конструкцией. Если не обнаружено экспрессии *in vitro* усилия переключают на тестирование конструкций ХАР ДД-CD19 *in vitro* в Т-лимфоцитах. В противоположность этому, если конститутивные конструкции демонстрируют экспрессию, то экспрессию ХАР CD19 измеряют *in vivo*.

[00610] Для тестирования *in vivo* ФК/ФД, мышам вводят Т-лимфоциты, экспрессирующие конструкции ХАР ДД-CD19, и тестовой группе вводят дозу лиганда, соответствующего ДД, в то время как контрольной группе вводят дозу подходящего носителя-контроля. Конструкции, которые демонстрируют лиганд-зависимую экспрессию ХАР CD19, отбирают для функциональной экспериментальной проверки концепции. Параллельные эксперименты также проводят с использованием конститутивных конструкций ХАР CD19. Если обнаруживают конститутивную экспрессию ХАР CD19 *in vivo*, то эти конструкции отбирают для экспериментов функционирования. Если не обнаруживают экспрессии *in vivo*, то тогда конструкции переделывают.

[00611] Функциональный анализ *in vivo* осуществляют путем тестирования, если Т-лимфоциты, экспрессирующие конститутивный и ДД-регулируемый ХАР CD19, демонстрируют противоопухолевую активность конститутивным или лиганд-зависимым образом, соответственно. Если да, то получают *in vivo* доказательство концепции и идентифицируют конструкции, пригодные для иммунотерапии. Если ни одна из ДД-регулируемых конструкций не демонстрирует противоопухолевую активность, тогда исследуют альтернативные схемы введения доз. Если конститутивные конструкции ХАР ДД-CD19 не демонстрируют противоопухолевую активность, то усилия сосредоточивают на идентификации конструкций ХАР ДД-CD19, которые демонстрируют экспрессию *in vivo* в Т-лимфоцитах.

Пример 16. Ко-экспрессия ДД-регулируемых полезных грузов

[00612] Токсичность, связанная с системным введением интерлейкинов можно обойти с помощью ХАР-Т-лимфоцитов, чтобы доставить интерлейкины к ткани-мишени. Этот комбинаторный подход также обладает большей противоопухолевой активностью, чем интерлейкин и ХАР-терапия по отдельности. Клетки ко-трансфицируют ХАР CD19 (конститутивной или ДД-регулируемой) и ДД-интерлейкином, например конструкциями ДД-ИЛ12, ДД-ИЛ15, ДД-ИЛ15/ИЛ15Ra. Трансфицированные клетки обрабатывают стабилизирующими лигандами в зависимости от используемого ДД. Экспрессию ХАР CD19 оценивают с помощью иммуноблоттинга для CD3 дзета. Экспрессию ДД-ИЛ12, ДД-ИЛ15 и ДД-ИЛ15/ИЛ15Ra в среде измеряют с помощью ИФА.

Пример 17. Экспрессия и функционирование ХАР в Т-лимфоцитах

[00613] Первичные Т-лимфоциты трансдуцировали конструкциями ХАР CD19. Поверхностную экспрессию конструкции ХАР CD19 измеряли с помощью проточной цитометрии (FACS) с соединением Белок L-биотин-стрептавидин-аллофикоцианин, которое связывается с легкой каппа-цепью ХАР (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Для того, чтобы определить долю субпопуляций CD4 и CD8 в Т-лимфоцитах ХАР, клетки анализировали с помощью анти-CD4, анти-CD8 антител и белка L. Как показано на Фиг. 24А, 67,3% полученных ХАР-положительных клеток, были CD4-положительными, в то время как только 14,2% клеток были CD8-положительными.

[00614] Для того, чтобы проверить способность клеток ХАР CD19 убивать клетки-мишени, популяции первичных Т-лимфоцитов, трансдуцированных ОТ-CD19N-001 или ОТ-CD19N-017, ко-культивировали с клетками K562, экспрессирующими CD19 (клетки-мишени) в соотношении 5:1. Были также созданы дополнительные комбинации контрольных Т-лимфоцитов и клеток-мишеней. Они включали в себя Т-лимфоциты, экспрессирующие ХАР, ко-культивированные с клетками K562, Т-лимфоциты ко-культивированные с клетками K562, экспрессирующими CD19, и клетки K562, экспрессирующие CD19, без ко-культивирования с Т-лимфоцитами. Клетки K562 метили флуоресцентно с помощью NucLight Red, и ко-

культивировали с Т-лимфоцитами в течение 30 часов. Гибель клеток наблюдали путем мечения клеток Аннексином V, и смерть клеток-мишеней K562 измеряли путем оценки окрашивания Аннексином V в NucLight Red-положительных клетках. Рассчитывали коэффициент окрашивания Аннексином V на единицу площади клеток-мишеней. Как показано на Фиг. 24В, Т-лимфоциты, экспрессирующие ОТ-CD19N-001 или ОТ-CD19N-017, эффективно уничтожали клетки-мишени K562, экспрессирующие CD19. Наблюдали низкий уровень уничтожения клеток-мишеней когда Т-лимфоциты ко-культивировали с клетками-мишенями, экспрессирующими CD19. Как и ожидалось, гибель клеток была минимальной в совместной культуре Т-лимфоцитов, экспрессирующих ОТ-CD19N-001, и клеток K562 (без экспрессии CD19). Эти данные показывают, что клетки ХАР CD19 эффективно уничтожают их соответствующие клетки-мишени.

Пример 18. Регулируемая экспрессия ИЛ15-ИЛ15Ra в Т-лимфоцитах

[00615] ДД-регулируемые конструкции ИЛ15-ИЛ15Ra, такие, как ОТ-IL15-009 или конститутивно экспрессируемые конструкции, такие как ОТ-IL15-008, были трансдуцированы в Т-лимфоциты, такие как первичные Т-лимфоциты или клетки SupT1. Трансдукцию проводили при двух различных концентрациях Лентивируса, 5 мкл и 20 мкл для ДД-регулируемой конструкции с использованием Lentiboost™ (Sirion Biotech, Германия). Спустя 4 дня после трансдукции клетки обрабатывали 10 мкМ TMP или контролем ДМСО в течение 24 и 48 часов. Образцы анализировали с анти-ИЛ15Ra антителами с использованием FACS. Дополнительные контрольные образцы, такие как клетки, обработанные только Lentiboost, нетрансдуцированные клетки, обработанные ДМСО или TMP, и изотипные контроли были включены в анализ FACS. Результаты FACS проиллюстрированы на Фиг. 25А для 24 часов обработки TMP и на Фиг. 25В для 48 часов обработки TMP. На обеих Фиг., ДМСО-А и TMP-А указывают на клетки, обработанные 5 мкл лентивируса, и ДМСО-В и TMP-В указывают на клетки, обработанные 20 мкл лентивируса. Обработка Т-лимфоцитов, экспрессирующих ОТ-IL15-009 с помощью TMP в течение 24 часов приводила к увеличению экспрессии ИЛ15Ra в Т-лимфоцитах с обеими используемыми дозами лентивируса. Кроме того, очень низкие уровни ИЛ15Ra были обнаружены в ДМСО-обработанных образцах при тех же условиях, а также в нетрансдуцированных Т-лимфоцитах. Как и ожидалось, конститутивно экспрессируемая конструкция ОТ-IL15-008 продемонстрировала высокую экспрессию ИЛ15Ra. TMP-зависимую экспрессию ОТ-IL15-009 не наблюдали в клетках SupT1 (Фиг. 25а). Аналогичные результаты наблюдали для Т-лимфоцитов и клеток SupT1 на 48 часу (Фиг. 25В). Эти результаты показывают, что может быть достигнута жесткая регуляция конструкций ИЛ15-ИЛ15Ra в первичных Т-лимфоцитах.

[00616] Поверхностную экспрессию ИЛ15 и ИЛ15Ra измеряли для ОТ-IL15-008 и ОТ-IL15-009. Доли клеток, экспрессирующих ИЛ15, ИЛ15Ra или то и то, на клеточной поверхности, представлены в Таблице 27.

Таблица 27: Поверхностная экспрессия ИЛ15 и ИЛ15Ra

	% положительных клеток	
	ОТ-IL15-008	ОТ-IL15-009
ИЛ15 и ИЛ15Ra положительные	2,03	0,51
ИЛ15Ra положительные	13,0	15,8
ИЛ15 положительные	0,29	0,60

[00617] Как показано в Таблице 27, доля клеток с обнаруживаемой поверхностной экспрессией ИЛ15 и ИЛ15Ra был меньше чем 5% с обеими конструкциями. Кроме того, доля клеток с поверхностной экспрессией ИЛ15Ra была значительно выше, чем доля клеток с обнаруживаемой поверхностной экспрессией ИЛ15.

[00618] Измеряли эффект увеличения дозы TMP на экспрессию ИЛ15Ra в Т-лимфоцитах, используя конструкцию OT-IL15-009. Т-лимфоциты обрабатывали диапазоном доз TMP, начиная с 0,156 мкМ до 160 мкМ в течение 24 часов. Экспрессию ИЛ15Ra измеряли с помощью FACS. Как показано на Фиг. 25С, доля Т-лимфоцитов, экспрессирующих ИЛ15Ra с клетками OT-IL15-009 была обнаружена даже при самой низкой концентрации TMP, и доля ИЛ15Ra-положительных клеток при низкой концентрации TMP был выше, чем в необработанном контроле. Доля клеток ИЛ15Ra увеличивалась с увеличением дозы TMP.

Пример 19. Экспрессия ИЛ15-ИЛ15Ra в ответ на дозу TMP

[00619] Гибридные конструкции ИЛ15-ИЛ15Ra - OT-IL15-008, OT-IL15-009, и OT-IL15-010 стабильно экспрессировали в клетках, обработанных НСТ116 с увеличением дозы TMP, варьирующей от 10 мкМ, 33 мкМ, и 100 мкМ TMP в течение 24 часов. Проводили иммуноблоттинг с клеточными лизатами с анти-ИЛ15Ra антителом. Как показано на Фиг. 26, экспрессию ИЛ15Ra OT-IL15-009 было практически невозможно обнаружить при отсутствии TMP, а добавление возрастающих доз TMP приводило к увеличению уровней ИЛ15Ra. Умеренное увеличение экспрессии ИЛ15Ra наблюдали с конструкцией OT-IL15-010 с добавлением TMP. Как и следовало ожидать, конститутивная конструкция OT-IL15-008 продемонстрировала сильную экспрессию ИЛ15Ra как в присутствии, так и в отсутствии лиганда.

Пример 20. Эффект ИЛ15-ИЛ15Ra на устойчивость Т-лимфоцитов и фенотип, в виде клеток памяти, Т-лимфоцитов

[00620] Эффект конститутивно экспрессируемой гибридной конструкции ИЛ15-ИЛ15Ra, OT-IL15-008 на клеточную устойчивость Т-лимфоцитов измеряли в мышах NSG. Т-лимфоциты трансдуцировали OT-IL15-008, и 4 миллиона клеток Т-лимфоцитов вводили внутривенно мышам NSG (число мышей = 3). В качестве контроля, дополнительным мышам вводили нетрансдуцированные Т-лимфоциты. Образцы крови были получены из мышей в возрасте 2, 3, 4, 5 и 6 недель после инъекции, и проанализированы с помощью FACS на присутствие CD8- и/или CD4-положительных Т-лимфоцитов человека, экспрессирующих ИЛ15 и ИЛ15Ra. Долю Т-лимфоцитов человека в крови рассчитывали как процент от общего числа Т-лимфоцитов, т. е. Т-лимфоцитов человека (измеряли с использованием анти-человеческий CD45 антитела) и Т-лимфоцитов мыши и эндотелиальных клеток (измеренный с использованием анти-мышиный CD45 антитело). Как показано на Фиг. 27А, доля Т-лимфоцитов в крови через 2 недели была выше у мышей, которым вводили Т-лимфоциты, трансдуцированные OT-IL15-008, по сравнению с контрольными мышами, которым вводили нетрансдуцированные Т-лимфоциты. Это наблюдаемое увеличение Т-лимфоцитов уменьшилось в течение 3, 4, и 5 недель, и доля Т-лимфоцитов была сравнима между этими двумя группами. Через 6 недель, одна из мышей, которой вводили OT-IL15-008-трансдуцированные Т-лимфоциты продемонстрировала более высокую долю Т-лимфоцитов в крови. Таким образом, за 2 недели, доля Т-лимфоцитов человека в крови увеличивается в крови у мышей, которым вводили OT-IL15-008-трансдуцированные Т-лимфоциты.

[00621] Количество Т-лимфоцитов в крови измеряли путем сравнения количества Т-лимфоцитов человека в 50 мкл крови мыши с использованием анти-человеческий CD45 антитела в качестве маркера для Т-

лимфоцитов человека, и анти-мышинный CD3 антитела в качестве маркера для мышинных эндотелиальных клеток. Как показано на Фиг. 27B, количество Т-лимфоцитов человека в крови увеличивается на 2-ую неделю у мышей, которым вводили ОТ-IL15-008-трансдуцированные Т-лимфоциты, по сравнению с мышами, которым вводили нетрансдуцированные Т-лимфоциты. Разница между этими двумя группами уменьшилась на 3-ей недели и 4-ой недели. На 6-ой неделе, одна из мышей, которым вводили ОТ-IL15-008-трансдуцированные Т-лимфоциты, продемонстрировала большее количество Т-лимфоцитов человека в крови. Таким образом, на 2-ой неделе, частота и количество Т-лимфоцитов человека в крови увеличивается в крови мышей, которым вводили ОТ-IL15-008-трансдуцированные Т-лимфоциты. Эти данные подтверждают роль гибридных белков ИЛ15-ИЛ15Ra в устойчивости Т-лимфоцитов. Увеличенную частоту и количество Т-лимфоцитов наблюдали на 6-ой неделе у одной из мышей, возможно из-за реакции трансплантата против хозяина.

[00622] Эффект экспрессии ОТ-IL15-008 на CD4 и CD8 субпопуляции Т-лимфоцитов измеряли до введения мышам (Неделя 0) и через 2 недели после инъекции. Как показано на Фиг. 27C, соотношение CD4 и CD8 клеток составляло 1:1 до введения мышам. Тем не менее, через 2 недели, доля CD4-положительных клеток была значительно выше, чем CD8-положительных клеток среди трансдуцированных клеток, что свидетельствует о том, что ОТ-IL15-008 вызывает предпочтительную экспансию CD4-положительных клеток. Экспрессию конструкции ОТ-IL15-008 в субпопуляциях CD4 и CD8 измеряли с использованием анти-ИЛ15Ra антител. Как показано на Фиг. 27D, до инъекций, 25% ОТ-IL15-008-трансдуцированных CD4 Т-лимфоцитов и CD8 Т-лимфоцитов экспрессировали ИЛ15Ra. На 2-й неделе, процент ИЛ15Ra-положительных CD4 и CD8 Т-лимфоцитов увеличился до 80%, указывая на предпочтительную экспансию Т-лимфоцитов, трансдуцированных ОТ-IL15-008. Как и ожидалось, нетрансдуцированные контрольные Т-лимфоциты были отрицательными на экспрессию ИЛ15Ra.

Пример 21. ИЛ12-зависимые, независимые от повторной стимуляции, маркеры Th1

[00623] Т-лимфоциту требуется *in vivo* повторная стимуляция через Т-клеточный рецептор, или стимуляция *in vitro* с помощью CD3/CD28 для получения ИФН-гамма. Для того, чтобы изучить эффект активности ИЛ12 на Т-лимфоциты в отсутствии повторной стимуляции, были исследованы несколько маркеров Т-лимфоцитов. Т-лимфоциты размножали с использованием одной из следующих 4 стратегий экспансии (i) в День 10 цитокиновый переход с ИЛ2 на ИЛ12, стимуляция CD3/CD28 с Дня 0 до Дня 10 без какой-либо повторной стимуляции (ii) в День 10 цитокиновый переход с ИЛ2 на ИЛ12, стимуляция CD3/CD28 с Дня 0 до Дня 10 и повторная стимуляция CD3/CD28 с Дня 12 до Дня 14 (iii) в День 10 цитокиновый переход с ИЛ2 на ИЛ12, стимуляция CD3/CD28 с Дня 0 до Дня 3 без повторной стимуляций (iv) в День 10 цитокиновый переход с ИЛ2 на ИЛ12, стимуляция CD3/CD28 с Дня 0 до Дня 3 и повторная стимуляция CD3/CD28 с Дня 12 до Дня 14. Проанализированные маркеры включают в себя CD69, ИФН-гамма, перфорин, CXCR3, Гранзим В, CCR5, CXCR6, Ki-67 и T-bet. ИФН-гамма, как представляется, является наиболее надежным и уместным маркером активности ИЛ12 на Т-лимфоцитах человека, но требует повторной стимуляции Т-лимфоцитов, чтобы индуцировать продуцирование. Маркеры Th1, уровень которых увеличивается в ответ на ИЛ12 при отсутствии повторной стимуляции и ИЛ2 (вероятно, в условиях *in vivo*) включают в себя Ki-67, T-bet, перфорин, CXCR3 и CCR5.

Пример 22. Влияние цитокинов на пролиферацию и активацию NK-клеток

[00624] Пролиферация и выживание иммунных клеток, таких как клетки естественные киллеры, зависят от цитокинов, таких как ИЛ-15. Эта зависимость от цитокинов может быть использована для проверки функционирования ДД-регулируемых или конститутивно экспрессируемых цитокинов, и гибридных цитокиновых белков.

[00625] Была проанализирована зависимость активации клеток NK-92 от цитокинов. Клетки сначала культивировали в течение 3-х дней с ИЛ2, после чего клетки дважды промывали и культивировали в среде без ИЛ-2 в течение 7 часов. Клетки культивировали в течение 18 часов в присутствии ИЛ-12 (10 нг/мл) или различных концентраций ИЛ15 (100 нг/мл, 20 нг/мл, 4 нг/мл, 0,8 нг/мл, 0,16 нг/мл, 0,032 нг/мл, 0,0064 нг/мл и 0,00128 нг/мл). Активацию клеток НК-92 в ответ на обработку ИЛ15 и ИЛ12 оценивали с помощью анализа FACS с использованием панели маркеров, чья повышенная экспрессия связана с активацией НК-клеток. Эти маркеры включают в себя NKG2D, CD71, CD69; рецепторы хемокинов, такие как CCR5, CXCR4, и CXCR3, перфорин, Гранзим В и гамма-интерферон (ИФН-гамма). До анализа FACS на ИФН-гамма, клетки культивировали в течение 4-х часов с Брефелдином А. НК-клетки реагируют на внешние стимулы, такие как цитокины, в их среде через фосфорилирование белков путей JAK/STAT, ERK, и p38/MAPK, которые являются важными для путей активации клеток, сигналинга и дифференциации. Фосфорилирование AKT, STAT3 и STAT5 в ответ на добавление цитокинов измеряли с помощью FACS. Так как события фосфорилирования являются быстротечными, клетки НК-92 обрабатывали цитокинами в течение 15 или 60 минут до анализа. Кратное изменение средних интенсивностей флуоресценции необработанных по сравнению с обработанными ИЛ15 представлены в Таблице 28.

Таблица 28: Маркеры, индуцированные ИЛ15

Доза ИЛ15 (нг/мл)	CD69	CXCR4	Перфорин	Гранзим В	pSTAT5 (15 мин)	pSTAT5 (60 мин)	ИФН- гамма
100	1,91	3,87	1,67	1,48	1,98	2,34	9,00
20	2,10	3,62	1,57	1,40	1,96	2,35	5,55
4	1,59	3,03	1,28	1,16	1,81	2,35	2,76
0,8	1,18	2,10	1,16	1,09	1,76	2,17	1,92
0,16	0,99	1,41	1,04	1,03	1,44	2,08	2,41
0,032	1,05	1,14	0,92	0,92	1,23	1,67	0,95
0,0064	1,11	1,19	0,79	0,78	1,03	1,26	0,85
0,00128	1,07	1,15	0,85	0,88	0,99	1,04	1,19

[00626] Обработка ИЛ15 приводила к увеличению экспрессии CD69, CXCR4, перфорины, Гранзима В, и ИФН-гамма. Эффект ИЛ15 на эти маркеры зависел от дозы, причем более высокая доза ИЛ15 приводила к соответствующему повышению уровня маркеров. Фосфорилирование STAT5 было увеличено как при 15, так и при 60 минут после добавления ИЛ-2 или ИЛ15. Взятые вместе, эти результаты показывают, что цитокины могут активировать НК-клетки.

[00627] Кратное изменение уровня маркеров активации, наблюдаемое при обработке ИЛ12 приведено в Таблице 29.

Таблица 29: Маркеры, индуцированные ИЛ12

Маркер	Кратность изменения
CCR5	1,60
Перфорин	1,67
Гранзим	1,87
ИФН-гамма	1,74
ИФН-гамма (супернатант)	666,15

[00628] Обработка ИЛ12 приводила к увеличению экспрессии маркеров CD69, CCR5, перфорина, Гранзима В и ИФН-гамма. Дополнительно, уровни ИФН-гамма, секретируемого клетками НК-92 в питательную среду, выше, чем у необработанных контролей при обработке ИЛ12. Обработка ИЛ-2 приводила к увеличению экспрессии CXCR4, перфорина, Гранзима В, и ИФН-гамма. Дополнительно, уровни ИФН-гамма, секретируемого клетками НК-92 в супернатант, были выше, чем у необработанных контролей при обработке ИЛ-2.

Пример 23. Влияние цитокинов на экспансию и активацию Т-лимфоцитов

[00629] Чтобы проверить потребность в ИЛ-2 и ИЛ12 для экспансии и активации Т-лимфоцитов, Т-лимфоциты стимулировали растворимыми Dynabeads CD3/CD28, CD3/CD28, или оставляли нестимулированными, в течение двух дней. Каждая из этих групп была дополнительно разбита на две подгруппы. Одну подгруппу обрабатывали ИЛ-2 и 100 нг/мл ИЛ-12, в то время как вторую подгруппу обрабатывали ИЛ2 только на время стимуляции. Для получения клеток, стимулированных растворимым CD3/CD28, была также включена третья подгруппа, которую обрабатывали только 100 нг/мл. Измеряли экспансию Т-лимфоцитов в течение 14 дней, а кратность изменения экспансии Т-лимфоцитов показана на Фиг. 28А. Dynabeads CD3/CD28 плюс ИЛ-2 с или без ИЛ12 имели самое значительное воздействие на экспансию Т-лимфоцитов с последующей обработкой Т-лимфоцитов растворимым CD3/CD28 плюс ИЛ2 с или без ИЛ12. Нестимулированные клетки и клетки, обработанные растворимыми CD3/CD28, клетки, которые обрабатывали ИЛ2, не были способны к экспансии в течение эксперимента. Эти результаты показывают, что ИЛ-2 требуется для экспансии Т-лимфоцитов, но ИЛ12, может быть необязательным.

[00630] Эффект ИЛ12 на активацию Т-лимфоцитов измеряли путем определения частоты ИФН-гамма положительных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. ИФН-гамма продуцируется активированными Т-лимфоцитами. Были использованы три различные протокола стимуляции. В первом протоколе, клетки стимулировали Dynabeads CD3/CD28 в течение 2 дней, после чего гранулы вымывали и клетки обрабатывали различными концентрациями ИЛ12 в течение 7 дней (с Дня 2 до Дня 9). В День 9, клетки повторно стимулировали растворимым CD3/CD28, и с помощью FACS определяли частоту ИФН-гамма позитивных клеток. Результаты представлены на Фиг. 28В в виде доли клеток. Во втором протоколе, после 2 дней стимуляции Dynabeads CD3/CD28, Т-лимфоциты поддерживали в культуре в течение более длительного периода времени, составляющего 14 дней, т. е. с Дня 2 до Дня 16. В День 16 клетки повторно стимулировали растворимым CD3/CD28. В День 16 измеряли частоту ИФН-гамма положительных клеток. Результаты представлены на Фиг. 28С в виде доли клеток. В третьем протоколе, Т-лимфоциты первоначально стимулировали в течение 2 дней с помощью Dynabeads CD3/CD28 и ИЛ2, с последующей

обработкой ИЛ12 только в течение 9 дней (т. е. с Дня 2 до Дня 11), с последующей обработкой ИЛ12 в течение от 2 до 5 дней. В течение двух последних дней эксперимента, клетки повторно стимулировали растворимым CD3/CD28. ИФН-гамма положительные CD4 и CD8 клетки подсчитывали с помощью FACS. Третий протокол воспроизводит среду, которую обеспечивают Т-лимфоцитам в адаптивной клеточной терапии, как во время трансдукции *in vitro* и экспансии Т-лимфоцитов, так и *in vivo*. Результаты представлены на Фиг. 28D в виде доли клеток. В обеих - 7-дневной обработке ИЛ12, а также 14-дневной обработке ИЛ12, как показано на Фиг. 28B и Фиг. 28C, соответственно, повторная стимуляция CD3/CD28 клеток в конце эксперимента увеличила долю ИФН-гамма-положительных клеток. Половина максимальной эффективной концентрации (EC50) ИЛ12, наблюдаемая для первого протокола для клеток CD8, составляла 50 пг/мл. EC50 ИЛ12, наблюдаемая для второго протокола составляла 12 пг/мл для клеток CD4 и 65 пг/мл для клеток CD8. Долгосрочное культивирование с CD3/CD28 дополнительно увеличивало зависимость продуцирования ИФН-гамма от повторной стимуляции и ИЛ12.

[00631] Результаты, полученные с помощью третьего протокола стимуляции представлены на Фиг. 28D. Иммунные клетки, обработанные ИЛ-12 в последние 5 дней эксперимента в комбинации с повторной стимуляцией CD3/CD28 продемонстрировали самую высокую долю ИФН-гамма-положительных клеток (EC50 = 24 пг/мл для клеток CD4 и 40 мкг/мл для клеток CD8), за которыми следовали клетки, которые получали ИЛ12 в течение 2 дней. Таким образом, Т-лимфоциты, размноженные *in vitro*, впоследствии могут дифференцироваться в ответ на ИЛ12, но для продуцирования ИФН-гамма может потребоваться повторная стимуляция.

[00632] В совокупности эти результаты указывают на то, что ИЛ-12 может стимулировать продуцирование интерферона в Т-лимфоцитах, когда их повторно стимулируют CD3/CD28.

Пример 24. Выбор промотора для экспрессии ЭОС в Т-лимфоцитах

[00633] Экспрессия ЭОС в векторе может приводиться в действие либо ретровирусным длинным концевым повтором (LTR) или с помощью клеточных или вирусных промоторов, расположенных выше ЭОС. Активность промотора может изменяться в зависимости от типа клеток и, таким образом, выбор промотора должны быть оптимизирован для каждого типа клеток. Для того, чтобы определить оптимальные промоторы, AcGFP (SEQ ID NO: 870) клонировали в конструкцию pLVX IRES Pur с промотором ЦМВ или EF1a. Т-лимфоциты и клетки Sup T1, полученные из пациентов трансдуцировали конструкциями, и экспрессию GFP измеряли на 3-ий и 5-ый день после трансдукции с помощью FACS. Как показано на Фиг. 29, как промотор ЦМВ, так и EF1a, могут управлять экспрессией GFP в клетках SupT1 и Т-лимфоцитах. Доля GFP-положительных Т-лимфоцитов была выше когда экспрессия GFP была под контролем промотора ЦМВ по сравнению промотором EF1a, как на 3-ий, так и на 6-ой день после трансдукции. В отличие от этого, доля GFP-положительных клеток была значительно выше, когда экспрессия GFP была под контролем промотора EF1a по сравнению с промотором ЦМВ. Таким образом, оптимальный промотор, подходящий для экспрессии, различается в зависимости от типа клеток.

Пример 25. Влияние лиганда на пролиферацию Т-лимфоцитов

[00634] Эффект лигандов, специфичных для ЭОС согласно изобретению, на пролиферацию иммунных клеток измеряли, чтобы определить концентрации лиганда, которые не ингибируют рост Т-лимфоцитов или выживание. Т-лимфоциты, полученные от двух различных доноров, стимулировали CD3/CD28 и обрабатывали лигандом TMP в дозах в пределах от 0,04 мкМ до 160 мкМ, или ДМСО. Долю клеток,

прошедших деление, в пределах CD4- и CD8-популяций Т-лимфоцитов измеряли с помощью FACS. Концентрации TMP в диапазоне от 0,04 мкМ до 40 мкМ не оказали никакого эффекта на долю клеток, прошедших деление, в популяции CD8 и CD4, в то время как концентрация 160 мкМ TMP привела к снижению на 70-90% доли клеток, прошедших деление. Таким образом, оптимальная концентрация TMP для экспериментов на основе Т-лимфоцитов была определена, как составляющая меньше чем 160 мкМ.

Пример 26. Влияние ДД-регулируемого ХАР CD19 на тонический сигналинг

[00635] Хроническая активация антигеном может привести к истощению Т-лимфоцитов. Для того, чтобы проверить, могут ли ДД-регулируемые конструкции ХАР CD19 индуцировать тонический сигналинг, облученные клетки K562, экспрессирующие CD19, высевают в культуральные плашки за 12 часов до добавления Т-лимфоцитов, экспрессирующих ДД-регулируемые конструкции ХАР CD19 с интерлейкином 2. Клетки подсчитывают каждые два дня, и заменяют среду. Для повторных стимуляций, клетки переносят в новую чашку Петри с клетками K562-CD19 после 24 часов (для двух стимуляций) или каждые 12 часов (для четырех стимуляций). Для каждого типа условий, Т-лимфоциты подсчитывали, и анализировали ХАР, фенотипические маркеры и истощение с помощью FACS, каждые 12 часов. ДД-регулируемые конструкции были проанализированы в присутствии или в отсутствие лиганда. Проанализированные маркеры включают с себя CD25 и CD69 для проверки статуса активации; CD62 и CD45RA для проверки статуса памяти; и маркеры PD1, TIM3 и LAG-3 для проверки истощения. ДД-регулируемые конструкции ХАР CD19, как ожидается, индуцируют более низкую долю клеток, которые являются положительными по всем трем маркерам истощения, т. е. PD1, TIM3 и LAG-3, и более высокую долю клеток, которые являются CD45A+/CD62L+, что указывает на менее дифференцированные Т-лимфоциты. Конститутивная экспрессия конструкций ХАР CD19 может индуцировать экспрессию всех трех маркеров истощения и может иметь более дифференцированный фенотип с более высокой долей CD45-/CD62L- и CD45+/CD62L- клеток.

Пример 27. Функциональный анализ ДД-регулируемого ХАР CD19

[00636] Для того, чтобы проверить способность ДД-регулируемых ХАР CD19 клеток уничтожать клетки-мишени, популяции первичных Т-лимфоцитов, трансдуцированных ДД-регулируемыми конструкциями ХАР CD19 ко-культивировали с клетками K562, экспрессирующими CD19 (клетки-мишени) в соотношении 5:1 в присутствии или в отсутствие лиганда, специфичного для ДД, например, Shield-1, TMP или MTX. Были также созданы дополнительные контрольные комбинации Т-лимфоцитов и клеток-мишеней. Они включали в себя ДД-регулируемые ХАР-экспрессирующие Т-лимфоциты, ко-культивированные с клетками K562 (в присутствии или в отсутствие лиганда), Т-лимфоциты, ко-культивированные с клетками K562, экспрессирующими CD19, и клетки K562, экспрессирующие CD19, без ко-культивирования с Т-лимфоцитами. Клетки K562 флуоресцентно метили красным NucLight Red и ко-культивировали с Т-лимфоцитами в течение 30 часов. Гибель клеток наблюдали путем мечения клеток Аннексином V, а клеточную гибель в клетках-мишенях K562 наблюдали путем оценки клеток, которые являются положительными по обесм - Аннексину V и NucLight Red. Рассчитывали коэффициент окрашивания Аннексином V на единицу площади клеток-мишеней. Т-лимфоциты, экспрессирующие ДД-ХАР CD19, как ожидается, будут эффективны в уничтожении клеток-мишеней K562, экспрессирующих CD19 только в присутствии лиганда, специфичного для ДД. Минимальная смерть клеток-мишеней, как ожидается, случается тогда, когда нетрансдуцированные Т-лимфоциты ко-культивируют с CD19-экспрессирующими

клетками-мишенями; и с ДД-ХАР Т-лимфоцитами (с или без обработки лигандом) плюс клетки K562 (без экспрессии CD19).

Пример 28. Создание scFv CD19 с использованием больших фаговых библиотек антител

Конструирование первичной фагмидной библиотеки

[00637] Тотальную РНК готовят из 40 различных образцов лимфоцитов периферической крови человека и кДНК синтезируют с использованием случайных праймеров. Вариабельные области IgM амплифицируют с использованием праймера 3' и праймеров 5'VN IgM. Объединенные праймеры также используются для амплификации Vk и VL. Дополнительный этап ПЦР добавляют для внесения сайтов рестрикции, а также для внесения области перекрытия, содержащей линкер scFv LoxP. scFv, получают путем смешивания эквимольных количеств генов VN и VL и выполнением сборки. scFv затем клонируют в векторы pDAN5, чтобы получить первичную библиотеку примерно 10^8 .

Рекомбинация и вторичная вторичной библиотеки

[00638] Для индукции рекомбинации, бактериальный штамм BS1365 (который конститутивно экспрессирует Cre-рекомбиназу) инфицируют первичной фагмидной библиотекой при MOI 20:1. Это дает бактерии, содержащие несколько фагмид, каждая из которых кодирует различные гены VN и VL, которые могут быть рекомбинированы за счет рекомбиназы Cre. Так как фагмиды возникают из бактерий, содержащих много различных ScFv, фенотип и генотип не связаны. Фагмиды, полученные из бактерий, используют для инфицирования бактерий, которые не экспрессируют Cre (например, DH5a) при низком MOI, составляющем $\leq 0,1$ для сцепления генотипа с фенотипом.

Конструкции, экспрессирующие CD9, и клеточные линии

[00639] Изоформы CD19 человека, описанные в Таблице 14, клонируют в соответствующие векторы и трансфицируют в клеточные линии с низким уровнем экспрессии эндогенного CD19, например клеточные линии K562 и 3T3. CD19-экспрессирующие линии, т. е. клетки K562-CD19 или 3T3-CD19, используют для положительного отбора scFv в библиотеке фагового дисплея. Исходные K562 и 3T3 используются для негативной селекции.

Отбор антител, распознающих CD19 на поверхности клетки

[00640] Вторичные библиотеки фагового дисплея предварительно очищают путем скрининга с исходными клетками, чтобы удалить неспецифически-связывающиеся фаги. Предварительно очищенные фаги инкубируют с клетками K562-CD19 или CD19-3T3, и связанные фаги выделяют и амплифицируют для следующего раунда отбора. Выполняют три раунда отбора для обогащения агентов, связывающих CD19. Отличные от FMC63 scFv, т. е. scFv, которые связываются с эпитопами, отличными от FMC63, отбирают в параллельном процессе отбора, блокируя эпитоп FMC63 с помощью избытка антитела FMC63.

[00641] Аффинность scFv к CD19 является критическим аспектом, который определяет продуктивность антитела в фармакокинетических анализах и анализах иммунного ответа. Измерения аффинности для 96 scFv клонов выполняют с использованием способов, таких как ИФА и поверхностный плазмонный резонанс, которые дают информацию об скорости соединения (K_c), скорости отсоединения (K_{ot}), и константе аффинности (K_D).

[00642] Клоны scFv с желаемыми скоростями отсоединения, подвергают секвенированию по Сангеру для идентификации уникальных клонов, которые связываются с клетками, экспрессирующими CD19, но не исходными клетками. Выявленные клоны затем подвергают эпитопной группировке, с использованием конкурентного иммуноанализа, который используется для охарактеризования, а затем отсортировывают библиотеку scFv против белка-мишени, например, CD19. scFv против CD19 тестируют попарным образом против всех других scFv CD19, идентифицированных в библиотеке, чтобы идентифицировать scFv, которые предотвращают связывание других scFv с эпитопом антигена CD19. После того, как будет создан профиль для каждого CD19 ScFv, для каждого scFv создают профиль конкурентного блокирования относительно остальных. Сортируют тесно связанные профили группировки, показывающие, что антитела имеют одинаковые или близко родственные эпитопы.

[00643] scFvs, полученные на каждом этапе процесса отбора подвергают способам глубокого секвенирования, таким как Ion Torrent/MiSeq. Последовательности CDR3 тяжелой цепи, в том числе те, которые не связываются с FMC63, идентифицируют с использованием Abmining Toolbox (D'Angelo S et al. (2014) MAbs. 6(1): 160–172) и идентифицируют наиболее рейтинговые HCDR3. HCDR3-специфические праймеры, сконструированные из последовательности ДНК из последовательностей с вершины рейтинга, затем используют для амплификации клонов scFv с помощью обратной ПЦР, и ПЦР-продукт клонируют в векторы экспрессии.

Пример 29. Аффинность scFv CD19

[00644] Аффинность scFv к антигену CD19 является критическим аспектом, который определяет продуктивность антитела в фармакокинетических анализах и анализах иммунного ответа. Измерения аффинности выполняют с использованием способов, таких как ИФА и поверхностный плазмонный резонанс, которые дают информацию об скорости соединения (Kс), скорости отсоединения (Kот), и константе аффинности (KD).

[00645] Антитела с различной аффинностью идентифицируют с использованием клеток, которые имеют высокую или низкую эктопическую экспрессию CD19. Клетки K562-CD19 и исходные клетки K562 с низким уровнем экспрессии CD19 сортируют с помощью FACS с использованием антител к CD19, например, FMC63, чтобы определить поверхностную экспрессию CD19. Клетки сортируют на нижние 5% (то есть клетки с низкой экспрессией CD19), на верхние 5% (клетки с высокой экспрессией CD19), и остальную часть популяции клеток классифицируются как клетки с средней экспрессией CD19.

Пример 30. Стратегия скрининга для идентификации scFv CD19, отличных от FMC63

Гибридные белки CD19/Fc

[00646] FMC63 связывается с человеческим CD19 в области, кодируемый экзоном 2. Для того, чтобы идентифицировать scFv CD19, отличные от FMC63, или CD19 человека (экзон 1-4) или CD19 человека (экзон 1,3,4) сливают с IgG, чтобы создать гибридные белки CD19-IgG, CD19sIgG1-4 и CD19sIgG1,3,4 соответственно. Для скрининга антител используются гибридные белки CD19-IgG. 96-луночные плашки покрывают антителами захвата и инкубируют с гибридным белком CD19sIgG1-4 или CD19sIgG1,3,4. Плашки промывают и инкубируют с кандидатом scFv CD19, идентифицированным в Примере 28. Плашки снова промывают и снова инкубируют с репортер-конъюгированными (например, щелочная фосфатаза) антителами обнаружения, и проводят детектирование с использованием репортер-совместимых способов обнаружения. Антитела захвата могут быть анти-человеческий Fc IgG антителами, или антителом FMC63 (в

качестве контроля). Антитело обнаружения может представлять собой анти-человеческий IgM антитело. Ожидается, что отличные от FMC63 scFv CD19, связываются с (CD19sIgG1,3,4) и (CD19sIgG1-4). В отличие от этого, кандидаты scFv CD19, которые связываются с эпитопами, которые являются идентичными или перекрываются с эпитопом FMC63, как ожидается, связываются только с (CD19sIgG1-4).

Конкурентный анализ

[00647] CD19-экспрессирующие клетки K562 инкубируют с наномолярными концентрациями тэгированных кандидатов scFv CD19, например, идентифицированных в Примере 28, и фиксированной концентрацией тэгированного scFv FMC63 для анализа конкурентного связывания. Клетки промывали и окрашивали вторичным антителом, соответствующим тэгу, использованному в кандидате scFv CD19. Измеряли среднюю интенсивность флуоресценции с помощью проточной цитометрии. В качестве отрицательного контроля, CD19-экспрессирующие клетки K562 инкубировали с различными концентрациями только тэгированного кандидата CD19 scFv или только FMC63. Ожидается, что для отличных от FMC63 scFv CD19 не будет никакой конкуренции за связывание с CD19 между кандидатами scFv CD19 и FMC63. Таким образом, как ожидается, средняя интенсивность флуоресценции тэгированного кандидата scFv CD19 возрастет с увеличением концентраций кандидата scFv CD19, в то же время не ожидается, что средняя интенсивность флуоресценции тэгированных антител FMC63 уменьшится с увеличением концентраций кандидата scFv CD19. Это указывает на то, что FMC63 не вытесняется с его эпитопа через добавление кандидата scFv CD19, предполагая наличие отличающихся связываемых эпитопов. Для кандидата scFv CD19, который связывается с тем же эпитопом, что и FMC63, ожидается снижение интенсивности флуоресценции FMC63 с возрастанием концентраций кандидата scFv CD19.

Пример 31. Функциональный анализ отличных от FMC63 конструкций XAP CD19

[00648] Отличный от FMC63 scFv CD19 сконструировали для получения отличных от FMC63 конструкций XAP CD19 с дестабилизирующими доменами, линкерами, трансмембранными и внутриклеточными доменами, описанными в Таблице 1, и Таблицах 6, 7, 8A или 8B. Способность отличных от FMC63 XAP CD19 вызвать активацию клеток, цитотоксичность и пролиферацию сравнивают с конструкциями XAP на основе FMC63-CD19 в клетках Jurkat. Конструкции также анализируют на их способность индуцировать повышение уровней маркеров истощения, PD1, TIM3 и LAG-3, и конструкции, которые являются положительными по множеству маркеров истощения исключают из анализа. Конструкции, которые могут индуцировать активацию клеток Jurkat и цитотоксичность, но не истощение маркеров, трансдуцируют в Т-лимфоциты, и их эффективность сравнивают с конститутивно экспрессируемой конструкцией XAP CD19 на основе FMC63. Ожидают, что ДД-регулируемые отличные от FMC63 конструкции XAP CD19 будут демонстрировать лучшие цитотоксические характеристики с минимальным тоническим сигналингом по сравнению с конструкциями XAP CD19 FMC63.

Пример 32. Лиганд зависимая смерть клеток-мишеней, индуцированная ДД-регулируемыми XAP CD19

[00649] Чтобы проверить антигенную специфичность клеточной гибели Т-лимфоцитов, сконструированных для экспрессии конститутивной или ДД-содержащей конструкции XAP, CD19 эктопически экспрессировали в антиген-отрицательной клеточной линии K562. Экспрессию CD19 измеряли с использованием анти-CD19 антитела, конъюгированного с фикоэритрином (PE). Фиг. 30A демонстрирует

экспрессию CD19 в исходных клетках K562 и клетках K562-CD19, причем CD19 экспрессируется эктопически.

[00650] Для того, чтобы проверить способность ДД-регулируемых клеток ХАР CD19 уничтожать клетки-мишени, популяции первичных Т-лимфоцитов, трансдуцировали ДД-регулируемыми конструкциями ХАР CD19, OT-CD19-024 с человеческим ДД DHFR и промотором EF1a. Трансдуцированные Т-лимфоциты ко-культивировали с клетками K562, экспрессирующими CD19 (клетки-мишени) в соотношении 5:1 в присутствии или в отсутствие TMP (100 мкМ). Были также созданы дополнительные комбинации контрольных Т-лимфоцитов и клеток-мишеней. Они включали в себя ДД-регулируемые ХАР-экспрессирующие Т-лимфоциты, ко-культивированные с антиген-отрицательными клетками K562 (в присутствии или отсутствии лиганда), нетрансдуцированные Т-лимфоциты, ко-культивированные с клетками K562, экспрессирующими CD19, и клетки K562, экспрессирующие CD19, без ко-культивирования с Т-лимфоцитами. Т-лимфоциты, используемые для этого эксперимента были трансдуцированы конструкцией OT-CD19-024 (или не трансдуцированы), и им давали возможность делиться в течение 11 дней с использованием протоколов, описанных в предыдущих примерах, их замораживали, оттаивали и ко-культивировали с клетками-мишенями. Клетки-мишени обрабатывали митомицином С с целью предотвращения их пролиферации. K562 или клетки-мишени K562-CD19, стабильно экспрессирующие флуоресцентный белок NucLight Red совместно культивировали с Т-лимфоцитами в течение 300 часов. Гибель клеток наблюдали путем мечения клеток Аннексином V, а гибель клеток-мишеней K562 и K562-CD19 наблюдали путем оценки клеток, которые были положительными как по Аннексину V, так и NucLight Red, с помощью IncuCyte® Live Cell Analysis System (Essen Biosciences, Энн Арбор, Мичиган). Результаты представлены на Фиг. 30В, причем убитые клетки-мишени, представленные на оси «у», относятся к клеткам-мишеням, которые являются положительными по обоим - NucLight Red и Аннексину V. Фиг. 30С демонстрирует количество уничтоженных мишеней, как измерено в (мкМ/лунка) в День 5. Уничтожение клеток мишеней наблюдали с конструкцией OT-CD19-024 только в TMP-обработанных ко-культурах Т-лимфоцитов и клеток-мишеней K562, эктопически экспрессирующих CD19. Не наблюдали уничтожения клеток в необработанных контролях в той же ко-культивируемой комбинации, и когда Т-лимфоциты ко-культивировали с исходными клетками K562, которые не экспрессируют CD19 в присутствии или в отсутствие лиганда. Эти данные показывают, что регулируемые ХАР демонстрируют лиганд- и мишень-зависимое уничтожения клеток в минимальном базовом отключенном состоянии.

Пример 33. Функциональный анализ ХАР Т-лимфоцитов *in vitro*

[00651] Оценивали эффективность функционального взаимодействия с клетками-мишенями Т-лимфоцитов, экспрессирующих ДД-регулируемые конструкции ХАР CD19. Для того, чтобы взаимодействовать с ХАР CD19 Т-лимфоцитами, выбранные клетки-мишени природно или эктопически экспрессируют CD19. В этом контексте клетки-мишени имеют высокую эндогенную экспрессию CD19, например клетки Nalm6, Raji, Reh, Sem, Korn8 и Daudi. В альтернативном варианте, линии клеток-мишеней могут быть сконструированы с эктопической экспрессией CD19 в клеточных линиях, которые имеют низкую эндогенную экспрессию CD19, например K562. Для измерения функциональности используют множество анализов. До начала ко-культивирования, клетки-мишени необязательно культивировали в присутствии митомицина С, чтобы предотвратить пролиферацию клеток-мишеней. Это гарантирует, что рост клеток-мишеней не превзойдет рост Т-лимфоцитов. Анализы цитотоксичности используют для измерения способности Т-лимфоцитов вызывать гибель клеток-мишеней. Клетки-мишени конструируют для

экспрессии люциферазы Renilla или светлячка, и ко-культивируют с Т-лимфоцитами, экспрессирующими ДД-регулируемые конструкции XAP CD19 в течение от 18 до 24 часов в присутствии лиганда, связанного с ДД или носителем-контролем. В конце ко-культивирования клетки лизируют и активность люциферазы измеряют с использованием соответствующего субстрата. Активность люциферазы, как ожидается, увеличивается, когда Т-лимфоциты, экспрессирующие ДД-регулируемые XAP CD19, ко-культивируют с CD19-экспрессирующими клетками-мишенями в присутствии лиганда. Не ожидают проявления цитотоксичности в клетках носителя-контроля или когда используют клетки-мишени, которые не экспрессируют CD19.

[00652] Соединение XAP CD19 с антигеном CD19 приводит к активации Т-лимфоцитов, которую измеряют через 24 часа после ко-культивирования Т-лимфоцитов, экспрессирующих XAP, и клеток-мишеней. Активацию Т-лимфоцитов оценивали путем измерения уровней ИФН-гамма, ИЛ-2 и CD69. Пролиферацию Т-лимфоцитов в ответ на антиген-опосредованную активацию Т-лимфоцитов измеряют с помощью мечения Т-лимфоцитов сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеина, который используют для отслеживания клеток спустя несколько поколений. Меченые Т-лимфоциты культивируют с обработанными митомицином клетками-мишенями, и пролиферацию клеток отслеживают в течение периода от 3 до 5 дней. Пролиферация и активация Т-лимфоцитов, как ожидалось, увеличивается, когда Т-лимфоциты, экспрессирующие ДД-регулируемые XAP CD19 ко-культивируют с клетками-мишенями, экспрессирующими CD19 в присутствии лиганда. Оба показателя не ожидаются в клетках носителя-контроля или когда используют клетки-мишени, не экспрессирующие CD19.

[00653] Активация Т-лимфоцитов приводит к дегрануляции, экзоцитотическому процессу, посредством которого цитотоксические Т-лимфоциты высвобождают молекулы, подобные перфोरину и гранзимам, которые позволяют уничтожать клетки-мишени. Дегрануляцию измеряют путем анализа среды на наличие индикаторов экзоцитоза, например, CD107 с помощью FACS и маркеров дегрануляции, таких как перфорин и гранзим, с помощью иммуноанализа.

Пример 34. Лиганд зависимая смерть клеток-мишеней, индуцированная ДД-регулируемыми XAP CD19

[00654] Для того, чтобы проверить способность ДД-регулируемых XAP CD19 клеток уничтожать клетки-мишени, популяции первичных Т-лимфоцитов, трансдуцированных ДД-регулируемыми конструкциями XAP CD19 ко-культивировали с клетками K562, экспрессирующими CD19 (клетки-мишени) в соотношении 5:1 в присутствии или в отсутствии лиганда, специфичного для ДД, например, Shield-1 (1 мкМ), TMP (100 мкМ) или MTX. Могут быть использованы конструкции с ДД FKBP, ecDHFR или человеческого DHFR. Также могут быть использованы конструкции с любым из промоторов ЦМВ, EF1a или PGK. Создают многочисленные комбинации Т-лимфоцитов и клеток-мишеней. Они включали в себя ДД-регулируемые XAP-экспрессирующие Т-лимфоциты, ко-культивированные с клетками K562 (в присутствии или отсутствии лиганда), Т-лимфоциты, ко-культивированные с клетками K562, экспрессирующими CD19, и клетки K562, экспрессирующие CD19, без ко-культивирования с Т-лимфоцитами. Дополнительные контроли включают в себя только клетки-мишени; нетрансдуцированные Т-лимфоциты; Т-лимфоциты, трансдуцированные пустым вектором. Т-лимфоциты, используемые для данного эксперимента будут размножать в течение 11 дней с использованием протоколов, описанных в предыдущих примерах, замораживать, оттаивать и трансдуцировать конструкциями XAP CD19. Клетки-мишени обрабатывают митомицином С для предотвращения их пролиферации. Клетки K562 флуоресцентно метили NucLight Red и ко-культивировали с

Т-лимфоцитами в течение 300 часов. Гибель клеток наблюдали путем мечения клеток Аннексином V, а гибель клеток-мишеней K562 наблюдали путем оценки клеток, которые были положительными как по Аннексину V, так и NucLight Red, используя IncuCyte® Live Cell Analysis System (Essen Biosciences, Энн Арбор, Мичиган). Ожидают уничтожения клеток мишеней с ДД-регулируемыми конструкциями ХАР только в присутствии лиганда и, когда используются клетки-мишени K562, эктопически экспрессирующие CD19. Не ожидают уничтожения клеток в необработанных контролях в той же ко-культивируемой комбинации, и когда Т-лимфоциты ко-культивировали с исходными клетками K562, которые не экспрессируют CD19 в присутствии или в отсутствие лиганда. Предсказано, что конститутивные конструкции продемонстрируют уничтожение клеток в обоих случаях присутствия лиганда. Уничтожения клеток также не ожидают в ко-культурах с нетрансдуцированными Т-лимфоцитами, Т-лимфоцитами, трансдуцированными пустым вектором; и культурах только клеток-мишеней.

Пример 35. Эффект лиганда на экспрессию цитокинов

[00655] Для изучения эффекта лиганда на экспрессию цитокинов в регулируемых конструкциях ХАР CD19, популяции Т-лимфоцитов трансдуцировали пустым вектором, ОТ-CD19-017, ОТ-CD19-023, ОТ-CD19-024 или ОТ-CD19-025. 5×10^4 трансдуцированных Т-лимфоцитов ко-культивировали в течение 48 часов при соотношении Е:Т (эффектор к клетке-мишени), составляющем 5:1, в присутствии или в отсутствие TMP или Shield-1. Клетки-мишени обрабатывали 50 мкг/мл митомицина С, чтобы предотвратить их пролиферацию. Концентрация цитокинов ИФН-гамма и ИЛ-2 в супернатанте среды была определена для каждой конструкции с использованием MSD V-PLEX Proinflammatory Panel 1 Human Kit. Данные были получены с использованием MESO QuickPlex SQ120. Как показано на Фиг. 31А, наблюдали увеличение в 6 раз концентрации ИФН-гамма при добавление лиганда для ОТ-CD19-024, и наблюдали увеличение в 2 раза концентрации ИФН-гамма при добавление лиганда для ОТ-CD19-025. Как показано на Фиг. 31В, наблюдали увеличение в 6 раз ИЛ2 для ОТ-CD19-024 при добавление лиганда, и наблюдали увеличение в 9 раз для ОТ-CD19-025 с TMP.

Пример 36. *In vivo* исследование зависимости от времени уровней ИЛ12 у мышей

[00656] Исходные клетки НСТ116 или клетки, трансдуцированные конструкциями ИЛ12 (ОТ-IL12-020, ОТ-IL12-026 или ОТ-IL12-029), вводили иммунодефектным по CD1 мышам (n = 4 в каждой группе) в соответствии с планом исследования, указанным в Таблица 30 ниже.

Таблица 30: План исследования

клетки НСТ116	Доза в День 15	Концентрация	Путь введения дозы в День 15
ОТ-IL12-026	Носитель	Н/П	Внутрибрюшинный
	Shield-1 (1x)	10 мг/кг	Внутрибрюшинный
	Shield-1 (3x, 2ч отдельно)	10 мг/кг	Внутрибрюшинный
ОТ-IL12-029	Носитель	Н/П	Внутрибрюшинный
	Shield-1 (1x)	10 мг/кг	Внутрибрюшинный
	Shield-1 (3x, 2ч отдельно)	10 мг/кг	Внутрибрюшинный

ОТ-IL12-020	Носитель	Н/П	Внутрибрюшинный
	Shield-1 (1x)	10 мг/кг	Внутрибрюшинный
Исходные	Носитель	Н/П	Внутрибрюшинный
	Shield-1 (1x)	10 мг/кг	Внутрибрюшинный

[00657] У мышей брали кровь (кровь собирали для ФК в плазме и MSD ИЛ12) в День 14 после подкожной инъекции 5×10^6 клеток (День 0), и спустя 6, 10 и 24 часа после введения дозы в День 15. В конце исследования, опухоли и почки измельчали бритвой в 500 мкл ФСБ, центрифугировали, и супернатант выделяли для анализа Meso Scale Diagnostic(MSD) ИЛ12.

[00658] Как показано на Фиг. 32А, основные уровни ИЛ12 в плазме конструкций ДД были высокими, но для конструкций ОТ-IL12-026 и ОТ-IL12-029 были все еще в 100 раз ниже, чем конститутивной конструкции (ОТ-IL12-020). В то время как Фиг. 32А демонстрирует кратное изменение по сравнению с уровнем в плазме до дозы, ОТ-IL12-026 демонстрирует регуляцию на 6-ом и 10-ом часу. Фиг. 32В и 32С демонстрируют, что ИЛ-12 обнаруживается в почках (Фиг. 32В) и опухоли (Фиг. 32С) и уровни согласованы с уровнями в плазме.

Пример 37. *In vivo* исследование зависимости от времени уровней ИЛ12 у мышей

[00659] Исходные клетки НСТ116 или клетки, трансдуцированные конструкциями ИЛ12 (ОТ-IL12-020, ОТ-IL12-026) вводили подкожно в виде шарика матригеля мышинным самкам NSG (имплантат 200 мкл шарика матригеля с 1×10^7 клеток) (n=4) в соответствии с планом исследования, указанным в Таблице 31 ниже.

Таблица 31. План исследования

клетки НСТ116	Доза	Сбор шариков матригеля	Охват выше EC50
ОТ-IL12-026	Носитель (1x)	8 часов после 1-ой дозы	-
	Носитель (1x)	24 часа после 1-ой дозы	-
	AquaShield-100 мг/кг (1x)	8 часов после 1-ой дозы	4 часа
	AquaShield-100 мг/кг (2x, 4 часа между дозами)	8 часов после 1-ой дозы	8 часов
	AquaShield-100 мг/кг (1x)	24 часа после 1-ой дозы	4 часа
	AquaShield-100 мг/кг (2x, 4 часа между дозами)	24 часа после 1-ой дозы	8 часов
	AquaShield-100 мг/кг (3x, 4 часа между дозами)	24 часа после 1-ой дозы	12 часов
ОТ-IL12-020	Носитель (1x)	24 часа после 1-ой дозы	-
Исходные	Носитель (1x)	24 часа после 1-ой дозы	-

[00660] Окончательный сбор плазмы (для MSD ИЛ12), сбор супернатантов с шариков матригеля и почек. Как показано на Фиг. 33А, регуляция ИЛ12 была достигнута *in vivo* с помощью высокой дозы AquaShield. Меньшая регуляция наблюдалась в плазме (Фиг. 33В) и детектировали некоторое количество флекси-ИЛ12 почках (Фиг. 33С).

Пример 38. Shield-1 может индуцировать ~40-50х увеличение продуцирования ИЛ12 первичными Т-лимфоцитами человека, трансдуцированными конструкцией ИЛ12-026

[00661] В День 0, первичные Т-лимфоциты человека стимулировали с помощью Dynabeads (увеличение экспансии Т-лимфоцитов CD3/CD28) при соотношении 3:1 гранулы:клетки. На следующий день были добавлены лентивирусы (пустой вектор (pLVX-EF1a-IRES-Puro), OT-IL12-020 (конститутивный), или OT-IL12-026 (регулируемый)) при величине множественности заражения (MOI), составляющей 10 в присутствии LentiBOOST и 5% ФБС. В День 2 клетки промывали, чтобы удалить LentiBOOST, и соотношение гранулы:клетки было уменьшено до 1:3, и было добавлено 10% свежей среды и ИЛ2. В Дни 6, 9, и 13 клетки подсчитывали для посева одинакового количества клеток, среду заменяли, добавляли лиганд, и клетки либо оставляли нестимулированными, либо повторно стимулировали растворимым человеческим активатором Т-лимфоцитов CD3/CD28 ImmunoCult™ (StemCell Technologies). После инкубации в течение ночи (в Дни 7, 10 и 14), супернатанты собирали для MSD-анализа ИЛ12p40 и p70, и с помощью FACS анализировали эффективность трансдукции. Было обнаружено, что 7% Т-лимфоцитов OT-IL12-026 были трансдуцированы, а 13% Т-лимфоцитов OT-IL12-020 (конститутивная) были трансдуцированы на 7-ой день. Было показано, что повторная стимуляция увеличивает экспрессию ИЛ-12 (Фиг. 34а). Лиганд увеличил продуцирование ИЛ12 к 10 дню экспансии Т-лимфоцитов, экспрессирующих OT-IL12-026, в 40-50 раз (Фиг. 34В и Фиг. 34С).

Пример 39. Дозозависимый эффект Shield-1 на трансдуцированные Т-лимфоциты

[00662] Человеческие Т-лимфоциты были активированы с помощью CD3/CD28 Dynabeads (Life Technologies) в течение 1 день до трансдукции лентивирусами (OT-IL12-026 или вектором-контролем), с последующей экспансией в культуре в течение 12-13 дней. Т-лимфоциты, которые были трансдуцированы различными количествами вируса (4-40 MOI), подвергали воздействию вызывающего дозозависимый эффект Shield-1 в течение 24 часов (левая панель). Т-лимфоциты, которые были трансдуцированы при MOI, составляющем 14, обрабатывали 1 мкМ Shield-1 или носителем-контролем для увеличения количества времени (правая панель). Уровни ИЛ-12, которые накопились в супернатантах (от 100000 клеток/200 мкл среды) были измерены с использованием наборов для анализа MSD V-plex человеческого ИЛ12p40 (Meso Scale Discovery).

[00663] Исходя из анализа было показано, что увеличение продуцирования ИЛ12 Т-лимфоцитами, экспрессирующими OT-IL12-026, является зависимым от дозы лиганда, Shield-1, Фиг. 35А, и накапливается с течением времени, Фиг. 35В.

Пример 40. In Vivo дозозависимый эффект и повторяющееся введение доз AquaShield у мышей NSG с перенесенными Т-лимфоцитами, экспрессирующими OT-IL12-026

[00664] Первичные Т-лимфоциты человека стимулировали с помощью Dynabeads (увеличение экспансии Т-лимфоцитов CD3/CD28) при соотношении 3:1 гранулы:клетки. На следующий день были добавлены лентивирусы (OT-IL12-020 (конститутивный), OT-IL12-026 (регулируемый) или вектор-контроль) при величине множественности заражения (MOI), составляющей 10, в присутствии LentiBOOST и 5% ФБС. На следующий день Т-лимфоциты промывали, чтобы удалить LentiBOOST, и соотношение гранулы:клетки было уменьшено до 1:3, и было добавлено 10% свежей среды и ИЛ2. Т-лимфоциты размножали в общей сложности 10 дней, а затем 25×10^6 вектора-контроля или трансдуцированных OT-IL12-026 Т-лимфоцитов или 10×10^6 трансдуцированных конститутивной OT-IL12-020 Т-лимфоцитов переносили в мышей NSG

(День 0 исследования). Через три дня после переноса клеток, животным вводили дозу либо носителя, либо Aquashield (10, 50 или 100 мг/кг). Пробы крови отбирали для анализа плазмы на ИЛ12p70 с помощью MSD-анализа на 0, 4, 8 и 24 часу после введения дозы (Фиг. 36а). Наблюдали четкое дозозависимое увеличение ИЛ12 в плазме.

[00665] В День 5 после переноса Т-лимфоцитов, животным второй раз вводили дозу Aquashield (Фиг. 36В). Наблюдали второе увеличение ИЛ12 в плазме при повторном введении дозы Aquashield.

Пример 41. *In Vivo* регуляция ДД- ИЛ12, экспрессированного в Т-лимфоцитах

[00666] Для того, чтобы определить, может ли лиганд стабилизировать ДД-ИЛ12 *in vivo* при последовательном введении доз Aquashield, Т-лимфоциты трансдуцируют конструкциями, экспрессирующими ДД-ИЛ12 (ОТ-IL12-020 или ОТ-IL12-026) и имплантируют мышам (n=4 в группа) (День 0), как показано в плане исследования ниже.

Таблица 32: План исследования

Группа	Описание
A	Пустой вектор, День 3-6: перорально носитель ежедневно в течение 4 дней
B	ОТ-IL12-020, День 3-6: перорально носитель ежедневно в течение 4 дней
C	ОТ-IL12-026: День 3-6: перорально носитель ежедневно в течение 4 дней
D	ОТ-IL12-026, День 3-6: Aquashield 50 мг/кг перорально ежедневно в течение 4 дней
E	ОТ-IL12-026, День 4 и 6: Aquashield 50 мг/кг перорально
F	Пустой вектор, День 5 и 10: перорально носитель
G	ОТ-IL12-020, День 5 и 10: перорально носитель
H	ОТ-IL12-026, День 5 и 10: перорально носитель
I	ОТ-IL12-026, День 5 и 10: Aquashield 50 мг/кг перорально
J	ОТ-IL12-026, День 10: Aquashield 50 мг/кг перорально

[00667] Для каждой группы, собирают образец крови до введения доз, а также образцы спустя 4 часа и 24 часа после каждой дозы. В конце исследования, собирают образцы тканей и органов. Анализ FACS проводится с целью определения количества клеток и маркеров Th1.

[00668] В День 0, первичные Т-лимфоциты человека стимулировали с помощью Dynabeads (увеличение экспансии Т-лимфоцитов CD3/CD28) при соотношении 3:1 гранулы:клетки. На следующий день были добавлены лентивирусы (пустой вектор (pLVX-EF1a-IRES-Puro), ОТ-IL12-020 (конститутивный), или ОТ-IL12-026 (регулируемый)) при величине множественности заражения (MOI), составляющей 10 в присутствии LentiBOOST и 5% ФБС. В День 2 клетки промывали, чтобы удалить LentiBOOST, и соотношение гранулы:клетки было уменьшено до 1:3, и было добавлено 10% свежей среды и ИЛ2.

[00669] Оценивание *in vitro* этих клеток показано на Фиг. 37А-37С.

[00670] После 10 дней размножения, Т-лимфоциты вводили мышам NSG (инъектировано 12×10^6 клеток, клетки представляли собой 15% (конститутивные) и 7,5% (регулируемые) ИЛ12-положительные по FACS). Для каждой группы, собирали образец крови до введения доз, а также образцы спустя 4 часа и 24 часа после

каждой дозы. В конце исследования, собирают образцы тканей и органов. Анализ FACS проводили для определения числа Т-лимфоцитов в крови и оценки фенотипических маркеров Th1.

[00671] Как показано на Фиг. 37А, экспрессия ИЛ12 в ответ на последовательные пульсовые дозы лиганда (50 мг/кг Aquashield вводили перорально в день 4 и 6 (50 мг/кг Aquashield раз в 48 часов)) была повышенной в плазме мышей с Т-лимфоцитами, экспрессирующими ОТ-IL12-026, по сравнению с контрольной группой, обработанной носителем. Т-лимфоциты, экспрессирующие пустой векторный контроль не продуцировали ИЛ12. Т-лимфоциты, трансдуцированные ОТ-IL12-020 (ИЛ12-020), конститутивным контролем, продуцировали ИЛ12 в течение всего курса.

[00672] Как показано на Фиг. 37В, наблюдали повышенную экспрессию в плазме ИЛ12 в ответ на последовательные пульсовые дозы лиганда (50 мг/кг перорально Aquashield вводили в течение 4 дней (День 3-6) (50 мг/кг Aquashield раз в сутки 4 суток)) у мышей, несущих ОТ-IL12-026-экспрессирующие Т-лимфоциты, по сравнению с контрольной группой, обработанной носителем. Клетки, трансдуцированные ОТ-IL12-020 (ИЛ12-020), конститутивным контролем, продуцировали ИЛ12 в течение всего курса.

[00673] Фиг. 37С демонстрирует экспрессию ИЛ-12 в течение 11 дней для конститутивной конструкции ОТ-IL12-020 (ИЛ12-020). Лиганд-регулируемая экспрессия ИЛ12 Т-лимфоцитами, экспрессирующими ДД-ИЛ12 из конструкции ОТ-IL12-026, наблюдалась у мышей, обработанных 50 мг/кг Aquashield, вводимого перорально в День 5 и 10 (50 мг/кг Aquashield д5/10). Т-лимфоциты, экспрессирующие пустой векторный контроль не продуцировали ИЛ12.

[00674] Фиг. 37D демонстрирует лиганд-индуцированную регуляцию экспрессии Т-лимфоцитами ИЛ12 в плазму, экспрессирующими ДД-ИЛ12 из конструкции ОТ-IL12-026, когда мышам перорально вводили 50 мг/кг Aquashield в День 10 (50 мг/кг Aquashield д10). Одно введение лиганда повышало уровни ИЛ12 в плазме выше тех, что обнаруживали в контрольной мыше, обработанной носителем, несущей Т-лимфоциты, экспрессирующие ОТ-IL12-026.

[00675] Регуляция ИЛ12 для всех конструкций, показанных на Фиг. 37А-37D, не влияет на уровни ИФН-гамма, вместо этого уровни ИФН-гамма постепенно повышались с течением времени. Это, вероятно, из-за контакта Т-лимфоцитов с ИЛ-12 в культуре во время фазы экспансии *in vitro*. Однако, лиганд-индуцированная регуляция ИЛ12 увеличивала экспрессию гранзима В (GRB) (Фиг. 37Е) и перфорина (Фиг. 29F) CD8+ Т-лимфоцитов *in vivo* к Дню 7 после переноса Т-лимфоцитов *in vivo*.

Пример 42. Эффект промотора PGK и N-концевого FKBP

[00676] Клетки НЕК293Т трансфицировали липофектамином 3000 и 2 мкг плазмидной ДНК каждой из: ОТ-IL12-019 (промотор PGK), ОТ-IL12-020 (промотор EF1-альфа), ОТ-IL12-025 (промотор PGK, С-концевой домен FKBP), ОТ-IL12-026 (промотор EF1-альфа, С-концевой домен FKBP), ОТ-IL12-046 (N-концевой FKBP). Лиганд (1 мкг Shield-1) добавляли спустя один день после трансфекции, и клетки дополнительно культивировали в течение еще 2 дней. Секрецию ИЛ-12 в супернатант вычисляли количественно с помощью анализа MSD ИЛ-12p40. Геномную ДНК (гДНК) и матричную РНК (мРНК) выделяли из клеток. Уровни интеграции ДНК-конструкции в клеточный геном и уровни экспрессии мРНК ИЛ-12 были количественно определены кПЦР с использованием праймеров, специфичных к элементу WPRE и ИЛ12 в пределах соответствующих конструкций.

[00677] Анализ кПЦР гДНК продемонстрировал, что FKBP ДД-содержащие конструкции были интегрированы на одинаковых уровнях в клеточные геномы, и что промотор PGK, как и ожидалось, создает меньшую экспрессию мРНК ИЛ-12 по сравнению с промотором EF1-альфа (Фиг. 38А).

[00678] Из-за более низких уровней транскрипции мРНК, индуцированной промотором PGK, MSD-анализ ИЛ-12p40 также показал, что промотор PGK уменьшает как базовые, так и пиковые уровни секреции ИЛ12 по сравнению с конструкцией, использующей промотор EF1-альфа. Более низкие базовые уровни продуцирования ИЛ12, расположенного ниже промотора PGK, давали в ~2 раза улучшенную лиганд-индуцированную регуляцию ИЛ-12 по сравнению с конструкцией с промотором EF1-альфа (Фиг. 38В). Более конкретно, лиганд-индуцированная регуляция экспрессии ИЛ12 увеличилась с 6-кратной до 13-кратной при смене промотора EF1-альфа на PGK, соответственно.

[00679] Конструкции, содержащие FKBP либо на N-конце или на С-конце ИЛ-12 были интегрированы одинаковым образом в клеточный геном, и продуцировали схожие уровни мРНК (Фиг. 38А). Однако, в то время как С-концевые конструкции, содержащие FKBP, регулирует экспрессию ИЛ-12, N-концевые конструкции, содержащие FKBP, не способны регулировать экспрессию ИЛ-12 (Фиг. 38В).

Пример 43. Кинетика лиганд-зависимой стабилизации ДД-ИЛ15-ИЛ15Ra

[00680] Кинетику вкл./выкл. лиганд-зависимой стабилизации ДД-ИЛ15-ИЛ15Ra измеряли в CD4-положительных Т-лимфоцитах. Т-лимфоциты активировали гранулами CD3/CD28 с соотношением гранулы к Т-лимфоцитам 3:1 в 24-луночных планках в течение 24 часов. Лентивирус добавляли в лунки в присутствии реагента LentiBoost, и клетки инкубировали в течение еще 24 часов и промывали. Клетки ресуспендировали в свежей среде, и среду добавляли каждые 2-3 дня, чтобы размножить и удержать клетки при $0,5 \times 10^6$ /мл. После 7 дней экспансии, Т-лимфоциты, трансдуцированные гибридной конструкцией есDNFR ДД-ИЛ15-ИЛ15Ra (OT-IL15-009) обрабатывали 100 мкМ есDNFR-лиганда триметоприма (TMP) или носителя-контроля, ДМСО. В нескольких временных точках (т. е. 1, 2, 4, 6, 8, 15, 22 и 24 часа) после обработки TMP, трансдуцированные Т-лимфоциты собирали и анализировали на экспрессию поверхностного ИЛ15Ra с использованием анти-ИЛ15Ra антител с помощью проточной цитометрии. Нетрансдуцированные Т-лимфоциты использовали в качестве отрицательного контроля. Т-лимфоциты сортировали на CD4-позитивные и CD8-позитивные популяции и анализировали долю ИЛ15Ra-положительных CD4-положительных Т-лимфоцитов. Фиг. 39 демонстрирует кинетику поверхностной экспрессии ИЛ15Ra на CD4 Т-лимфоцитах после обработки TMP. Среди CD4-положительных Т-лимфоцитов, трансдуцированных конструкцией OT-IL15-009, доля клеток с поверхностной экспрессией ИЛ15Ra оставалась похожей, как для обработанных TMP, так и обработанных ДМСО клеток, до 2 часов после обработки TMP, и была сопоставимой с таковой нетрансдуцированных клеток. Однако, спустя 4 часа после обработки TMP, клетки, трансдуцированные конструкцией OT-IL15-009 и обработанные TMP, демонстрировали увеличение доли клеток с экспрессией ИЛ15Ra на поверхности. Эта тенденция наблюдалась до 22 часов после обработки TMP. CD4-положительные Т-лимфоциты с экспрессированным на поверхности ИЛ15Ra составили ~1% нетрансдуцированных клеток, что свидетельствует о том, что доля клеток, которые экспрессируют эндогенный ИЛ15Ra, является низкой.

Пример 44. Лиганд-зависимая стабилизация гибридных молекул ДД-ИЛ15-ИЛ15Ra *in vivo*

[00681] Чтобы исследовать, индуцирует ли обработка лигандом стабилизацию гибридных молекул ДД-ИЛ15-ИЛ15Ra *in vivo*, клетки НСТ116, трансдуцированные конструкцией OT-IL15-009, имплантировали подкожно BALB/c голым мышам и обрабатывали TMP. TMP вводили мышам перорально в дозе 100 мг/кг,

два раза в сутки в течение 11 дней после имплантации, с последующим введением TMP в дозе 300 мг/кг, два раза в сутки в течение 6 дней. В качестве отрицательного контроля, отдельных мышей, которым имплантировали клетки НСТ116, трансдуцированные конструкцией OT-IL15-009, обрабатывали носителем два раза в сутки в течение 17 дней. Через 4 часа после введения последней дозы TMP или носителя-контроля, собирали опухоли у мышей и анализировали уровни гибридных молекул ИЛ15-ИЛ15Ra с помощью Вестерн-блоттинга. Как показано на Фиг. 40, опухоли НСТ116, полученные из мышей, обработанных TMP, показали повышенные уровни экспрессии ИЛ15-ИЛ15Ra, по сравнению с опухолями, обработанными носителем. Уровень GAPDH анализировали в качестве контроля нагрузки. Эти данные показывают, что введение лиганда позволило стабилизировать гибридную молекулу ДД-ИЛ15-ИЛ15Ra *in vivo*.

[00682] В соответствии с эффективностью TMP-зависимой стабилизации ИЛ15-ИЛ15Ra *in vivo*, наблюдали повышенные уровни TMP (399,38 нг/г опухоль) в опухолях НСТ116, собранных из мышей, которых обрабатывали TMP в течение 17 дней. Уровни TMP, связанные с опухолями НСТ116, были значительно выше, чем наблюдаемые в плазме мышей в День 3 (15,67 нг/мл плазмы) и в День 17 (99,5 нг/мл плазмы), что свидетельствует о том, что перорально вводимый TMP успешно доставлялся и накапливался в опухолях НСТ116, имплантированных мышам.

Пример 45. Устойчивость к шеддингу конструкций ИЛ15-ИЛ15Ra

[00683] Для поддержания эффективности транс-презентации ИЛ15 через гибридную молекулу ИЛ15-ИЛ15Ra, требуется предотвратить шеддинг (отщепление внеклеточного домена) ИЛ15-ИЛ15Ra. Для этого, разрабатывали конструкции новых ДД-ИЛ15-ИЛ15Ra и конститутивных ИЛ15-ИЛ15Ra с помощью различных модификаций гибридной молекулы ИЛ15-ИЛ15Ra. Например, молекулу ИЛ-15 или молекулу ИЛ15Ra укорачивают или подвергают мутации, чтобы удалить предположительные сайты расщепления. ИЛ15Ra имеет сайт расщепления (PQGHSDTT от позиции 168 до 175 SEQ ID NO: 803) в внеклеточном домене непосредственно дистально от трансмембранного домена рецептора, как описано Bergamaschi C *et al.* (2008). J Biol Chem ;283(7):4189-99; Anthony SM *et al.* (2015). PLoS One. 10(3): e0120274), и международные публикации заявок на патент № WO2014066527 и № WO2009002562 (содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Фактор некроза опухоли-альфа-превращающей фермент (TACE/ADAM17) был обнаружен как протеаза, которая расщепляет между глицином (в позиции 170 SEQ ID NO: 803) и гистидином (в позиции 171 SEQ ID NO: 803), и продуцирует природно встречающуюся растворимую форму ИЛ15Ra. Тот же механизм может быть ответственен за шеддинг ИЛ15-ИЛ15Ra. Соответственно, сайт расщепления ИЛ15Ra подвергают мутации таким образом, что предотвращается расщепление эндогенной протеазой. Мутацию в сайта расщепления вводят путем замены, вставки или делеции аминокислотных остатков. Гибридную молекулу ИЛ15-ИЛ15Ra также модифицируют так, что полноразмерную или усеченную гибридную молекулу ИЛ15-ИЛ15Ra сливают с гетерологичными шарнирными доменами и/или гетерологичными трансмембранными доменами. В качестве неограничивающих примеров, могут быть использованы варианты ИЛ15Ra. Кроме того, модифицируют длину и последовательность линкера, который соединяет ИЛ15 и ИЛ15Ra.

[00684] Чтобы подтвердить, что модификация гибридной молекулы ИЛ15-ИЛ15Ra предотвращает шеддинг, конструкции новых ДД-ИЛ15-ИЛ15Ra или конститутивных ИЛ15-ИЛ15Ra вводят в клетки НСТ-116. Поверхностную экспрессию ИЛ15 и ИЛ15Ra на клетках НСТ-116 исследуют с помощью проточной цитометрии с использованием анти-ИЛ15 и ИЛ15Ra и антител для оценки шеддинга поверхностных ИЛ15-

ИЛ15Ra. Наличие или отсутствие ИЛ15 в супернатанте клеточной культуры также анализировали с помощью MSD-анализа. В качестве функционального анализа, основанного на чувствительности активации НК-клеток к шеддингу ИЛ15 в супернатанте опухоли, проводят анализ Transwell с использованием клеток НСТ-116, трансдуцированных конструкциями, экспрессирующими новые ДД-ИЛ15-ИЛ15Ra или конститутивные ИЛ15-ИЛ15Ra, и НК-клеток. Для использования в дополнительных экспериментах выбирают конструкции, экспрессирующие новые ДД-ИЛ15-ИЛ15Ra, которые не вызывают активацию НК-клеток в присутствии лиганда, и конструкции, экспрессирующие новые конститутивные ИЛ15-ИЛ15Ra, которые не индуцируют активацию НК-клеток.

Пример 46. Регулируемая экспрессия гибридной молекулы ИЛ15-ИЛ15Ra с С-концевым ДД

[00685] Гибридную молекулу получают путем слияния связанного с мембраной ИЛ-15, субъединицы альфа рецептора ИЛ-15 (ИЛ15Ra) и DHFR человека (ДД). Эти гибридные молекулы клонировали в вектор pLVX-EF1a-IRES-Puro.

[00686] Для тестирования лиганда-зависимого продуцирования ИЛ15-ИЛ15Ra, 1 миллион клеток НЕК-293Т высевали в 6-луночную плашку в ростовой среде, содержащей DMEM и 10% ФБС, и инкубировали в течение ночи при 37 °C в 5% CO₂. Затем клетки трансфицировали 100 нг конститутивного ИЛ15-ИЛ15Ra (OT-IL15-008) или ДД-соединенного ИЛ15-ИЛ15Ra (OT-IL15-037, OT-IL15-040) с использованием липофектамина 2000 и инкубировали в течение 24 часов. После инкубации среду заменяли на ростовую среду с или без 50 мкМ триметоприма (TMP) и дополнительно инкубировали в течение 48 часов. Клетки собирали и уровни ИЛ15 анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием человеческого ИЛ-15 антитела (Abscam, Кембридж, Великобритания). Молекулярная масса ИЛ15Ra в OT-IL15-037 и OT-IL15-040 оказалась такой же, как в OT-IL15-008.

[00687] Для того, чтобы проверить, отделяется ли ИЛ15 в среду, супернатант из клеток НЕК293, экспрессирующих гибридные конструкции ИЛ15-ИЛ15Ra подвергали иммуноанализам, таким как MSD (Роквиль, Мэриленд). Спустя 48 часов после трансфекции, клетки анализировали, и как и ожидалось, конструкция OT-IL15-008 конститутивного ИЛ15-ИЛ15Ra продемонстрировала высокую поверхностную экспрессию ИЛ15 как в присутствии, так и в отсутствие лиганда. OT-IL15-037 и OT-IL15-040 продемонстрировали лиганд-(триметоприм)зависимую поверхностную экспрессию ИЛ15 и ИЛ15Ra (Фиг. 41). Обнаружение мембран-связанных гибридных конструкций ИЛ15-ИЛ15Ra в супернатанте предполагает, что конструкция ИЛ15, вероятно, отделилась от поверхности клетки.

Пример 47. Эффект воздействия TMP *in vitro* на экспрессию мембран-связанного ИЛ15

[00688] Для того, чтобы определить, влияет ли доза и время воздействия TMP *in vitro* на экспрессию мембран-связанного ИЛ-15, проводили *in vitro* исследование ответа на дозу с Т-лимфоцитами, экспрессирующими OT-IL15-073. Для этой цели, Т-лимфоциты активировали гранулами CD3/CD28 с соотношением гранул к Т-лимфоцитам 3:1 в 24-луночных плашках в течение 24 часов. В лунки добавляли лентивирус. Через 24 часа добавляли свежую среду каждые 2-3 дня, чтобы размножить клетки, сохраняя плотность клеток 0,5-1x10⁶/мл. В день 11 экспансии Т-лимфоциты, обработанные TMP, начиная с 100 мкМ, 10х разведения и 9 баллов, были проанализированы после 2 часов в культуре (промывали 3 раз после добавления TMP, добавляли свежую среду без TMP на 22 часа), 6 часов в культуре, или 24 часов в культуре, и результаты показаны на Фиг. 42А. Как показано на Фиг. 42В и в Таблице 33, это исследование показало, что лиганд TMP регулирует экспрессию мембран-связанного ИЛ-15, и доза и время воздействия TMP *in vitro* влияет на экспрессию мембран-связанного ИЛ-15.

Таблица 33: Экспрессия мембран-связанного ИЛ-15

Обработка TMP	EC50, (%ИЛ15+ИЛ15Ra +) мкМ	EC90, (%ИЛ15+ИЛ15Ra+) мкМ	EC50, (общее ИЛ15) мкМ МИФ	EC90, (общее ИЛ15) мкМ МИФ
24 часа	0,035	0,255	0,063	0,75
24 часа (промывка после 2 часов)	11,5	59,6	11,1	66,9
6 часов	0,021	0,81	0,030	0,88

Пример 48. Регулируемая *in vivo* экспрессия мембран-связанного ИЛ15

[00689] Для того, чтобы оценить регуляцию мембран-связанного ИЛ15 *in vivo*, 2 конструкции были выбраны для оценки *in vivo*. В этом исследовании использовали четыре группы Т-лимфоцитов, и они приведены в Таблице 34. В Таблице 31, «N» представляет количество мышей в каждой группе.

Таблица 34. Группы Т-лимфоцитов

Группа	N	Т-лимфоцитов	Обработка
1	4	Нетрансдуцированные	-
2	4	ОТ-IL15-071 (вектор pELNS, промотор EF1a, последовательность мембран-связанного ИЛ15 из ОТ-IL15-008)	-
3	4	ОТ-IL15-073 (вектор pELNS, промотор EF1a, последовательность мембран-связанного ИЛ15 из ОТ-IL15-009)	Носитель
4	4	ОТ-IL15-073 (вектор pELNS, промотор EF1a, последовательность мембран-связанного ИЛ15 из ОТ-IL15-009)	TMP

[00690] Т-лимфоциты, которые должны были быть использованы как часть исследования *in vivo* оценивали через 6 дней после трансдукции, в день имплантирования (9-й день после трансдукции) и 13 дней после трансдукции, и клетки в группах 2-4 продемонстрировали экспрессию конструкций.

[00691] Т-лимфоциты, описанные в Таблице 31, вводили мышам путем внутривенного введения (имплантировали $3,9 \times 10^6$ клеток/мышь). В День 3 мышам вводили 500 мг/кг TMP 3 раза (4 часа между дозами) и кровь отбирали спустя 2 часа после каждой дозы. У мышей снова отбирали кровь в День 4, спустя 24 часа после первой дозы TMP.

[00692] Фиг. 43А-43С демонстрируют экспрессию мембран-связанного ИЛ15, 2, 6, 10 и 24 часа после введения первой дозы TMP, используя окрашивание ИЛ15 (Фиг. 43А), окрашивание ИЛ15Ra (Фиг. 43b) и двойное ++ окрашивание ИЛ15/ИЛ15Ra (Фиг. 43С). Фиг. 43D представляет собой графики FACS для каждой мыши спустя 10 часов после первой дозы TMP. Фиг. 43Е демонстрирует экспрессию мембран-

связанного ИЛ15 в крови 2, 6, 10 и 24 часа после первой дозы ТМР, и Фиг. 43F демонстрирует плазматические уровни ТМР 2, 6, 10 и 24 часа после первой дозы ТМР.

Пример 49. Эффект долгосрочного внутрибрюшинного (ВБ) или перорального (ПО) введения доз ТМР на функцию Т-лимфоцитов

[00693] В данном исследовании, Т-лимфоциты, трансдуцированные ОТ-IL15-071 или ОТ-IL15-073 (без lentiBoost), вводили внутривенно мышам (15×10^6 /мышь). Для этого исследования оценивали 6 изучаемых групп: (1) нетрансдуцированные, (2) ОТ-IL15-071 Т-лимфоциты, (3) ОТ-IL15-073 ПО носитель, (4) ОТ-IL15-073 ПО ТМР 500 мг/кг, (5) ОТ-IL15-073 ВБ носитель, и (6) ОТ-IL15-073 ВБ ТМР 300 мг/кг. План исследования представлен в Таблице 35. ПО введение доз 500 мг/кг ТМР в 0,1 М цитрате и ВБ введение доз 300 мг/кг ТМР лактата в воде

Таблица 35. План исследования

Момент времени	Доза	Забор образцов
День -3	Введение Т-лимфоцитов в мышей путем внутривенного (ВВ) введения	-
День 0	ПО 1х или ВБ 1х	-
4 часа	ПО 1х	-
6 часов	-	Отбор крови (продолжают жить)
24 часа	ПО 2х или ВБ 1х	Отбор крови (продолжают жить)
День 2	ПО 1х или ВБ 1х	-
День 3	ПО 1х или ВБ 1х	-
День 4	ПО 2х или ВБ 1х	-
120 час	ПО 2х или ВБ 1х	Отбор крови (продолжают жить)
126 час	-	Отбор крови (продолжают жить)
День 6	ПО 2х или ВБ 1х	-
День 7	ПО 2х или ВБ 1х	-
День 8	-	Отбор крови (продолжают жить)
День 19	-	Отбор крови (продолжают жить)
День 25	-	Отбор крови (завершающий)

[00694] Регулируемую экспрессию в крови анализировали спустя 6 часов и спустя 24 часа после первой дозы и спустя 6 часов после 5-й дозы.

[00695] ОТ-IL15-071 продемонстрировала экспрессию мембран-связанного ИЛ15, а нетрансдуцированный контроль не показали какой-либо экспрессии.

[00696] Регулирование мембран-связанного ИЛ15 наблюдали при повторяющемся ПО и ВБ введение доз. Как видно на Фиг. 44, регулируемая экспрессия мембран-связанного ИЛ15 была обнаружена спустя 6 часов после первой дозы в День 0, и спустя 6 часов после введения дозы в День 5 (126 часов) при обоих типах введения доз - ПО и ВБ. Отсутствовало увеличения экспрессии у мышей, обработанных носителем.

[00697] Хотя данное изобретение было описано достаточно подробно и с некоторой тщательностью в отношении некоторых описанных вариантов осуществления, оно не предназначено для того, чтобы быть ограниченным какими-либо такими подробностями или вариантами осуществления, или каким-либо конкретным вариантом осуществления, но оно должно истолковываться через ссылки на прилагаемую формулу изобретения таким образом, чтобы обеспечить как можно более широкое возможное истолкование таких пунктов формулы в связи с предшествующим уровнем техники, и, следовательно, эффективно охватить желаемый объем изобретения.

[00698] Все публикации, патентные заявки, патенты и другие источники, упомянутые в данном документе, включены посредством ссылки в полном объеме. В случае конфликта, данное описание, включая определения, будет иметь преимущество. Дополнительно, заголовки разделов, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены быть ограничивающими.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для индукции иммунного ответа в клетке или субъекте, содержащая первый эффекторный модуль, причем указанный эффекторный модуль содержит первый элемент ответа на стимул (ЭОС), функционально связанный с, по меньшей мере, одним иммунотерапевтическим агентом.
2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что указанный, по меньшей мере, один иммунотерапевтический агент выбран из химерного антигенного рецептора (ХАР) и антитела.
3. Композиция по п. 2, отличающаяся тем, что указанный первый ЭОС отвечает на или взаимодействует с, по меньшей мере, одним стимулом.
4. Композиция по п. 3, отличающаяся тем, что указанный первый ЭОС представляет собой дестабилизирующий домен (ДД).
5. Композиция по п. 4, отличающаяся тем, что ДД получают из исходного белка или мутантного белка, имеющего одну, две, три или большее количество аминокислотных мутаций по сравнению с указанным исходным белком, причем исходный белок выбирают из:
 - (a) белка FKBP человека, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 3,
 - (b) DHFR человека (hDHFR), содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 1,
 - (c) DHFR *E. coli* (ecDHFR), содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 2,
 - (d) PDE5, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 4,
 - (e) PPAR-гамма, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 5,
 - (f) CA2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 6, и
 - (g) NQO2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 7.
6. Композиция по п. 5, отличающаяся тем, что исходный белок представляет собой hDHFR, и ДД содержит мутантный белок, имеющий:
 - (a) одинарную мутацию, выбранную из hDHFR (I17V), hDHFR (F59S), hDHFR (N65D), hDHFR (K81R), hDHFR (A107V), hDHFR (Y122I), hDHFR (N127Y), hDHFR (M140I), hDHFR (K185E), hDHFR (N186D), hDHFR (M140I), hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; N127Y), hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; I17V), hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Y122I), и hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; K185E);
 - (b) двойную мутацию, выбранную из hDHFR (C7R, Y163C), hDHFR (A10V, H88Y), hDHFR (Q36K, Y122I), hDHFR (M53T, R138I), hDHFR (T57A, I72A), hDHFR (E63G, I176F), hDHFR (G21T, Y122I), hDHFR (L74N, Y122I), hDHFR (V75F, Y122I), hDHFR (L94A, T147A), DHFR (V121A, Y22I), hDHFR (Y122I, A125F), hDHFR (H131R, E144G), hDHFR (T137R, F143L), hDHFR (Y178H, E181G), hDHFR (Y183H, K185E), hDHFR (E162G, I176F) hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; I17V, Y122I), hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Y122I, M140I), hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; N127Y, Y122I), hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; E162G, I176F), и hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; H131R, E144G), и hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Y122I, A125F);

(с) тройную мутацию, выбранную из hDHFR (V9A, S93R, P150L), hDHFR (I8V, K133E, Y163C), hDHFR (L23S, V121A, Y157C), hDHFR (K19E, F89L, E181G), hDHFR (Q36F, N65F, Y122I), hDHFR (G54R, M140V, S168C), hDHFR (V110A, V136M, K177R), hDHFR (Q36F, Y122I, A125F), hDHFR (N49D, F59S, D153G), hDHFR (G21E, I72V, I176T), hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Q36F, Y122I, A125F), hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Y122I, H131R, E144G), hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; E31D, F32M, V116I), и hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; Q36F, N65F, Y122I); или

(d) четверную мутацию или большее количество мутаций, выбранных из hDHFR (V2A, R33G, Q36R, L100P, K185R), hDHFR (аминокислоты 2-187 ДТ; D22S, F32M, R33S, Q36S, N65S), hDHFR (I17N, L98S, K99R, M112T, E151G, E162G, E172G), hDHFR (G16S, I17V, F89L, D96G, K123E, M140V, D146G, K156R), hDHFR (K81R, K99R, L100P, E102G, N108D, K123R, H128R, D142G, F180L, K185E), hDHFR (R138G, D142G, F143S, K156R, K158E, E162G, V166A, K177E, Y178C, K185E, N186S), hDHFR (N14S, P24S, F35L, M53T, K56E, R92G, S93G, N127S, H128Y, F135L, F143S, L159P, L160P, E173A, F180L), hDHFR (F35L, R37G, N65A, L68S, K69E, R71G, L80P, K99G, G117D, L132P, I139V, M140I, D142G, D146G, E173G, D187G), hDHFR (L28P, N30H, M38V, V44A, L68S, N73G, R78G, A97T, K99R, A107T, K109R, D111N, L134P, F135V, T147A, I152V, K158R, E172G, V182A, E184R), hDHFR (V2A, I17V, N30D, E31G, Q36R, F59S, K69E, I72T, H88Y, F89L, N108D, K109E, V110A, I115V, Y122D, L132P, F135S, M140V, E144G, T147A, Y157C, V170A, K174R, N186S), hDHFR (L100P, E102G, Q103R, P104S, E105G, N108D, V113A, W114R, Y122C, M126I, N127R, H128Y, L132P, F135P, I139T, F148S, F149L, I152V, D153A, D169G, V170A, I176A, K177R, V182A, K185R, N186S), и hDHFR (A10T, Q13R, N14S, N20D, P24S, N30S, M38T, T40A, K47R, N49S, K56R, I61T, K64R, K69R, I72A, R78G, E82G, F89L, D96G, N108D, M112V, W114R, Y122D, K123E, I139V, Q141R, D142G, F148L, E151G, E155G, Y157R, Q171R, Y183C, E184G, K185del, D187N).

7. Композиция по п. 6, отличающаяся тем, что стимул выбирают из группы, состоящей из триметоприма (TMP) и метотрексата (MTX).

8. Композиция по п. 2, отличающаяся тем, что иммунотерапевтический агент представляет собой химерный антигенный рецептор (ХАР).

9. Композиция по п. 8, отличающаяся тем, что химерный антигенный рецептор (ХАР) содержит

- (a) внеклеточный целевой фрагмент;
- (b) трансмембранный домен;
- (c) внутриклеточный сигнальный домен; и
- (d) необязательно, один или большее количество костимулирующих доменов.

10. Композиция по п. 9, отличающаяся тем, что ХАР представляет собой стандартный ХАР, разделенный ХАР, ХАР с выключателем, ХАР с включателем, ХАР первого поколения, ХАР второго поколения, ХАР третьего поколения или ХАР четвертого поколения.

11. Композиция по п. 9, отличающаяся тем, что внеклеточный целевой фрагмент распознает молекулу-мишень на поверхности раковой клетки, причем указанную молекулу-мишень на поверхности раковой

клетки выбирают из ракового антигена, липида плазматической мембраны, рецептора и связанного с мембраной гликопротеина.

12. Композиция по любому из п. 9-11, отличающаяся тем, что внеклеточный целевой фрагмент выбирают из любого из:

- i. NAR Ig,
- ii. фрагмента Fab,
- iii. фрагмента Fab',
- iv. фрагмента F(ab)'₂,
- v. фрагмента F(ab)'₃,
- vi. Fv,
- vii. одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv),
- viii. bis-scFv, (scFv)₂,
- ix. минителя,
- x. диатела,
- xi. триатела,
- xii. тетратела,
- xiii. интратела,
- xiv. дисульфид-стабилизированного белка Fv (dsFv),
- xv. унитела,
- xvi. нанотела, и
- xvii. антиген-связывающей области, полученной из антитела, которое может специфически связываться с любым представляющим интерес белком, лигандом, рецептором, фрагментом рецептора или пептидным аптамером.

13. Композиция по п. 12, отличающаяся тем, что внеклеточный целевой фрагмент представляет собой scFv, полученный из антитела, которое специфически связывается с антигеном CD19.

14. Композиция по п. 13, отличающаяся тем, что scFv представляет собой scFv CD19, выбранный из одного, что содержит:

- (a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, независимо выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49-80, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, независимо выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 81-122; или
- (b) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 123-267 и 624.

15. Композиция по п. 9, отличающаяся тем, что

- (a) внутриклеточный сигнальный домен XAP представляет собой сигнальный домен, полученный из CD3-дзета рецептора Т-лимфоцита или молекулы клеточной поверхности, выбранной из группы, состоящей из FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эpsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d; и

(b) присутствует костимуляторный домен и он выбран из группы, состоящей из 2B4, HVEM, ICOS, LAG3, DAP10, DAP12, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, ICOS (CD278), рецептора фактора некроза опухолей, индуцируемого глюкокортикоидами (GITR), антигена-1, связанного с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C и B7-H3.

16. Композиция по п. 15, отличающаяся тем, что внутриклеточный сигнальный домен XAP представляет собой сигнальный домен рецептора CD3-дзета Т-лимфоцита, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 339.

17. Композиция по п. 9, отличающаяся тем, что внутриклеточный сигнальный домен XAP представляет собой сигнальный домен рецептора CD3-дзета Т-лимфоцита, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 626, и при этом присутствует костимуляторный домен, причем указанный костимуляторный домен выбирают из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 268-374.

18. Композиция по п. 9, отличающаяся тем, что трансмембранный домен получают из любого из членов группы, состоящей из:

- (a) трансмембранной области альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора;
- (b) эпсилон-цепи CD3 Т-клеточного рецептора;
- (c) молекулы, выбранной из CD4, CD5, CD8, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD148, DAP 10, EpoRI, GITR, LAG3, ICOS, Her2, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137), CD152, CD154, PD-1, или CTLA-4; и
- (d) иммуноглобулина, выбранного из IgG1, IgD, IgG4, и области Fc IgG₄.

19. Композиция по п. 9, отличающаяся тем, что трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 375-425 и 897-907.

20. Композиция по п. 9, отличающаяся тем, что XAP дополнительно содержит

- (e) шарнирную область рядом с трансмембранным доменом, причем указанная шарнирная область содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 426-504.

21. Композиция по п. 2, отличающаяся тем, что иммунотерапевтический агент представляет собой антитело, которое является специфически иммунореактивным к антигену, выбранному из опухолеспецифического антигена (OCA), ассоциированного с опухолью антигена (AOA), или антигенного эпитопа.

22. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что антиген представляет собой антигенный эпитоп и указанный антигенный эпитоп представляет собой CD19.

23. Композиция по п. 22, отличающаяся тем, что антитело выбрано из антитела, которое содержит

- (a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, независимо выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 49-80, и вариабельную

область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, независимо выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 81-122; или

(b) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 123-267.

24. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что указанный первый эффекторный модуль содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 635-649, 1005-1010, 1015-1018, и 1215-1231.

25. Композиция по п. 24, отличающаяся тем, что первый ЭОС эффекторного модуля стабилизирует иммунотерапевтический агент с коэффициентом стабилизации 1 или больше, причем коэффициент стабилизации содержит отношение экспрессии, функции или уровня иммунотерапевтического агента в присутствии стимула к экспрессии, функции или уровню иммунотерапевтического агента в отсутствии стимула.

26. Композиция по любому из пп. 24-25, отличающаяся тем, что ЭОС дестабилизирует иммунотерапевтический агент с коэффициентом дестабилизации между 0 и 0,09, причем коэффициент дестабилизации содержит отношение экспрессии, функции или уровня иммунотерапевтического агента в отсутствии стимула, специфичного для ЭОС, к экспрессии, функции или уровню иммунотерапевтического агента, который экспрессируется конститутивно, и в отсутствии стимула, специфичного для ЭОС.

27. Полинуклеотид, кодирующий любую из композиций по пп. 1-26.

28. Полинуклеотид по п. 27, отличающийся тем, что полинуклеотид представляет собой молекулу ДНК или молекулу РНК.

29. Полинуклеотид по п. 28, отличающийся тем, что полинуклеотид представляет собой молекулу РНК, и указанная молекула РНК представляет собой матричную РНК.

30. Полинуклеотид по п. 29, который является химически модифицированным.

31. Полинуклеотид по п. 28, который содержит пространственно-временно (spatiotemporally) выбранные кодоны.

32. Полинуклеотид по п. 29, дополнительно кодирующий промотор, линкер, сигнальный пептид, тэг, сайт расщепления и/или нацеливающий пептид.

33. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 27-32.

34. Вектор по п. 33, отличающийся тем, что вектор представляет собой вирусный вектор или плазмиду.

35. Вектор по п. 34, который представляет собой вирусный вектор и при этом вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, гамма-ретровирусный вектор, рекомбинантный вектор AAV, аденовирусный вектор, или вектор на основе онколитического вируса.

36. Иммунная клетка для адаптивного переноса клеток (АПК), которая экспрессирует любую из композиций по любому из пп. 1-26, полинуклеотиды по любому из пп. 27-32, и/или инфицирована или трансфицирована вектором по любому из пп. 33-35.

37. Иммунная клетка по п. 36, отличающаяся тем, что иммунная клетка представляет собой CD8+ Т-лимфоцит, CD4+ Т-лимфоцит, хелперный Т-лимфоцит, клетку естественного киллера (NK), клетку NKT, цитотоксический Т-лимфоцит (CTL), инфильтрирующий в опухоль лимфоцит (TIL), Т-лимфоцит памяти, регуляторный Т-лимфоцит (Трег), цитокин-индуцированную киллерную (CIK) клетку, дендритную клетку, эмбриональную стволовую клетку человека, мезенхимальную стволовую клетку, гемопоэтическую стволовую клетку, или их смесь.

38. Иммунная клетка по п. 36, отличающаяся тем, что иммунная клетка, которая дополнительно экспрессирует композицию, содержащую второй эффекторный модуль, причем указанный второй эффекторный модуль содержит второй ЭОС, связанный со вторым иммунотерапевтическим агентом, при этом второй иммунотерапевтический агент выбирают из цитокина и гибрида цитокина-цитокинового рецептора.

39. Иммунная клетка по п. 38, отличающаяся тем, что второй иммунотерапевтический агент представляет собой цитокин.

40. Иммунная клетка по п. 39, отличающаяся тем, что цитокин представляет собой ИЛ12 или ИЛ15.

41. Иммунная клетка по п. 38, отличающаяся тем, что второй иммунотерапевтический агент представляет собой гибридный полипептид цитокина-цитокинового рецептора.

42. Иммунная клетка по п. 41, отличающаяся тем, что гибридный полипептид цитокина-цитокинового рецептора выбран из гибридного полипептида ИЛ12-рецептора ИЛ12, гибридного полипептида ИЛ15-рецептора ИЛ15, и гибридного полипептида ИЛ15-суши-домена рецептора ИЛ15.

43. Иммунная клетка по п. 36 или 37, отличающаяся тем, что иммунная клетка является аутологичной, аллогенной, сингенной или ксеногенной по отношению к конкретному отдельному субъекту.

44. Способ уменьшения объема или нагрузки опухоли у субъекта, включающий в себя приведение в контакт указанного субъекта с композицией по любому из пп. 1-26, полинуклеотидами по любому из пп. 27-32, векторами по любому из пп. 33-35 или иммунными клетками по любому из пп. 36-43, причем ЭОС отвечает на стимул и регулирует экспрессию и функцию иммунотерапевтического агента.

45. Способ индукции иммунного ответа у субъекта, включающий в себя введение субъекту эффективного количества любой из композиций по пп. 1-26, полинуклеотидов по любому из пп. 27-32, векторов по любому из пп. 33-35 или иммунных клеток по любому из пп. 36-43.

46. Способ идентификации домена антигена CD19, который не будет связываться с антителом FMC63 (отличный от FMC63 домен связывания CD19), причем указанный способ включает в себя:

- (a) приготовление композиции, содержащей антиген CD19,
- (b) приведение в контакт композиции этапа (a) с предельными уровнями антитела FMC63,
- (c) приведение в контакт композиции этапа (b) с одним или большим количеством выбранных членов библиотеки потенциальных связующих CD19 агентов; и
- (d) идентификацию связывающего домена на антигене CD19 на основе дифференциального связывания выбранных членов библиотеки связующих CD19 агентов по сравнению со связыванием FMC63.

47. Способ по п. 46, отличающийся тем, что указанные связывающие домены библиотеки получают с использованием методик фагового дисплея с антигеном CD19 в качестве затравочной последовательности.

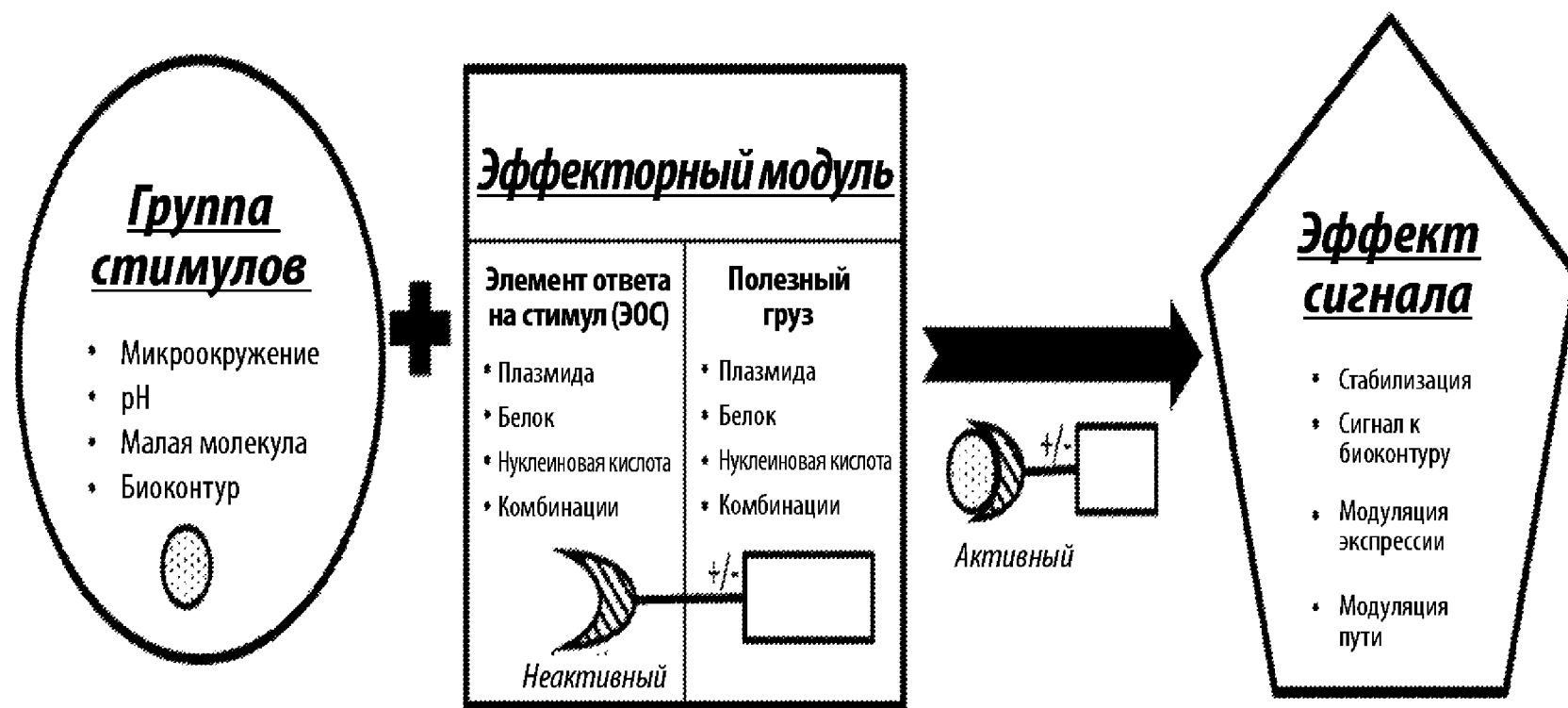
48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что связывающий домен выбирают из фрагмента Fab, фрагмента Fab', фрагмента F(ab)'₂, фрагмента F(ab)'₃, Fv, одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), bis-scFv, (scFv)₂, минитела, диатела, триатела, тетратела, дисульфид-стабилизированного белка Fv (dsFv), унитела, нанотела, или антиген-связывающей области антитела, и фрагмента антитела.

49. Способ по п. 48, отличающийся тем, что антиген CD19 выбирают из целого или части антигена CD19 человека, и целого или части антигена CD19 макака резус.

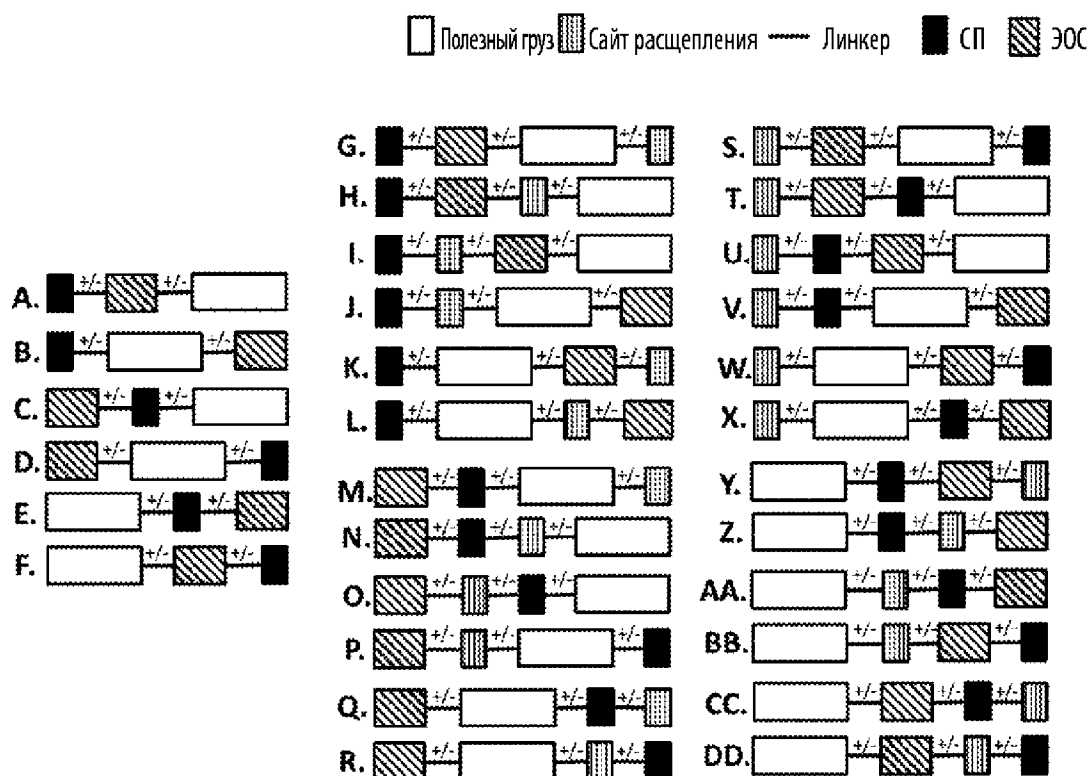
50. Химерный антигенный рецептор, содержащий отличный от FMC63 CD19-связывающий домен, полученный согласно способу по любому из пп. 46-49.

51. Эффекторный модуль, содержащий элемент ответа на стимул (ЭОС), функционально связанный с химерным антигенным рецептором по п. 50.

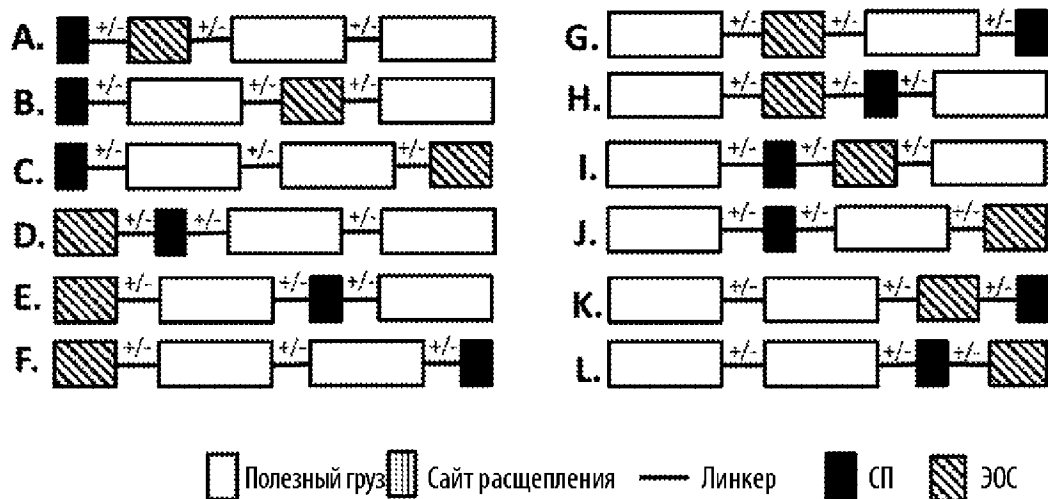
Фиг. 1



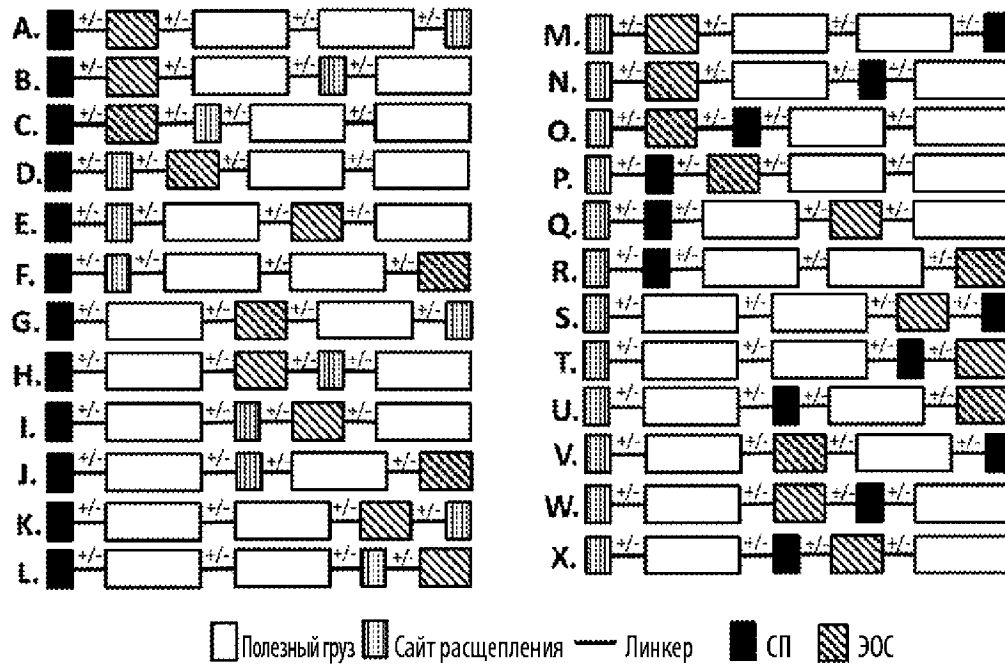
Фиг. 2



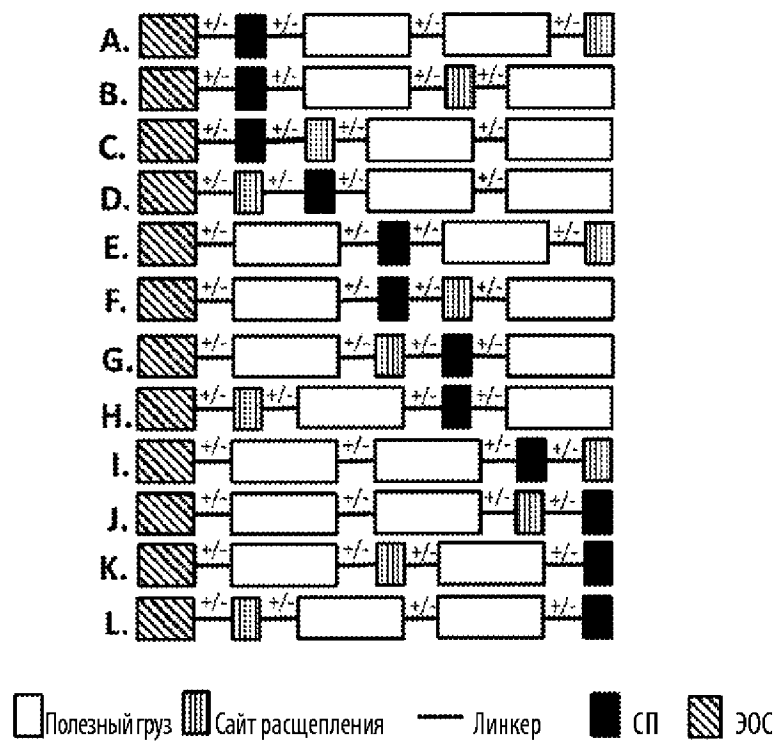
Фиг. 3



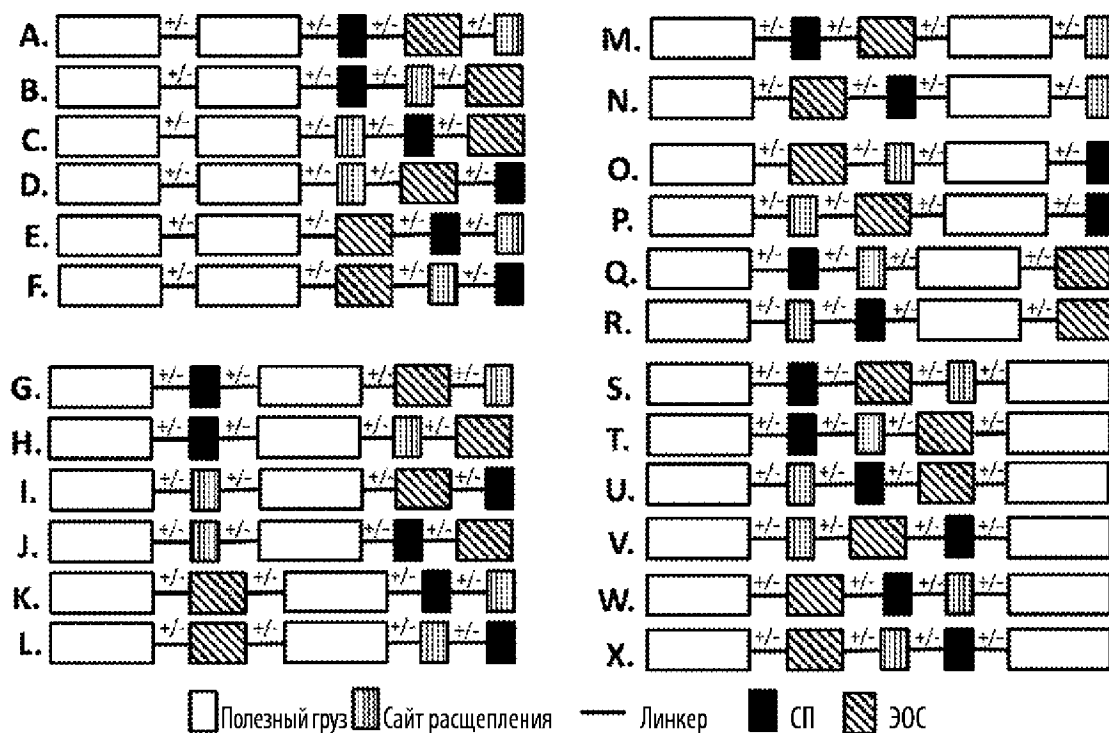
Фиг. 4



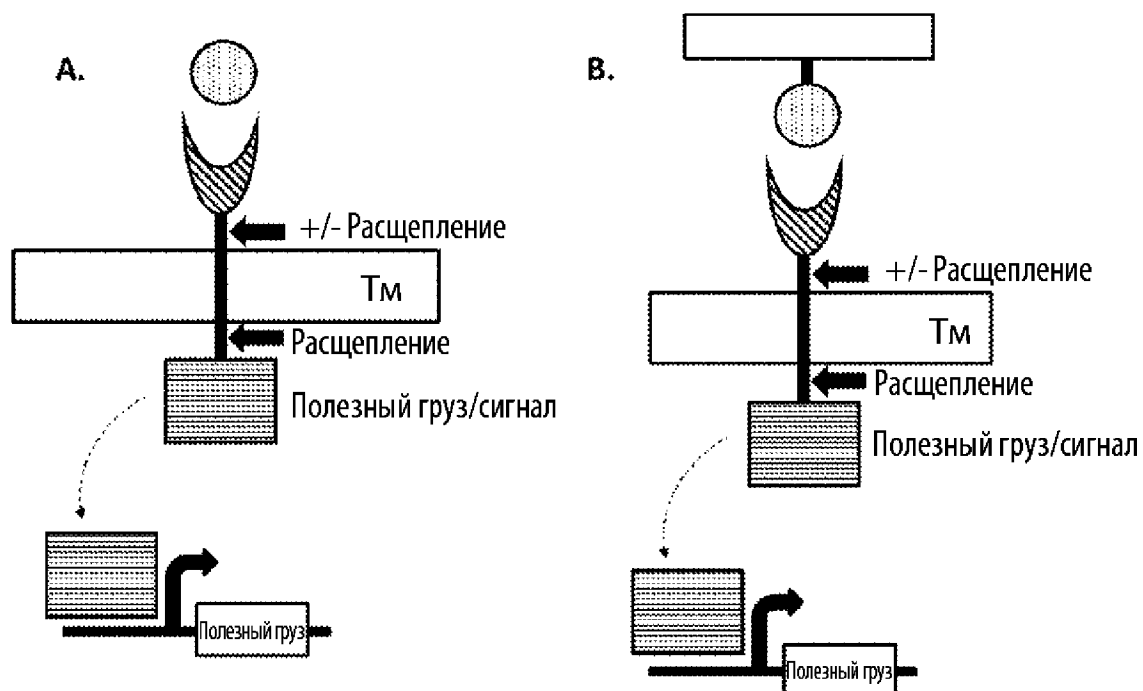
Фиг. 5



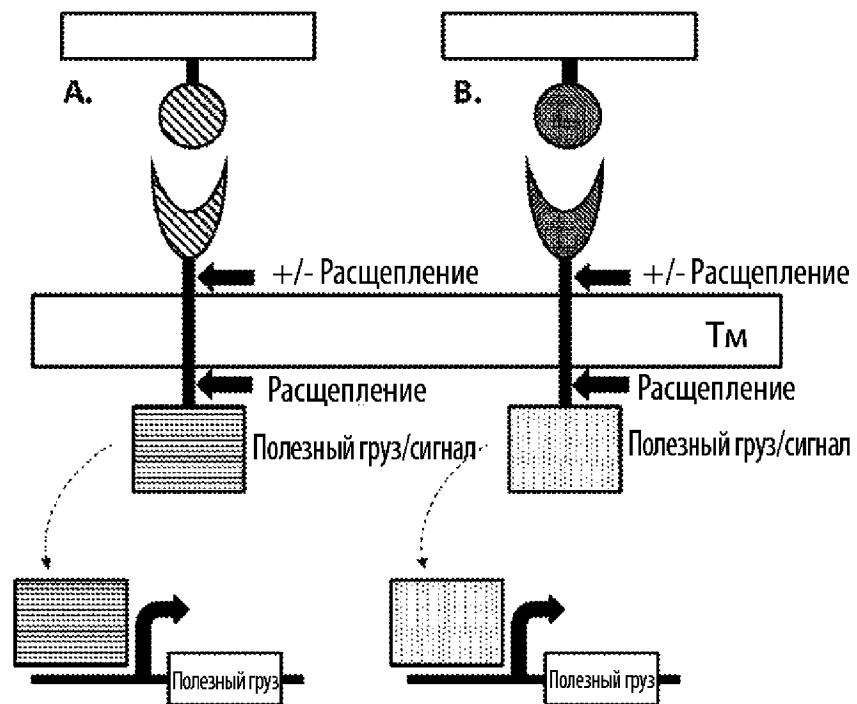
Фиг. 6



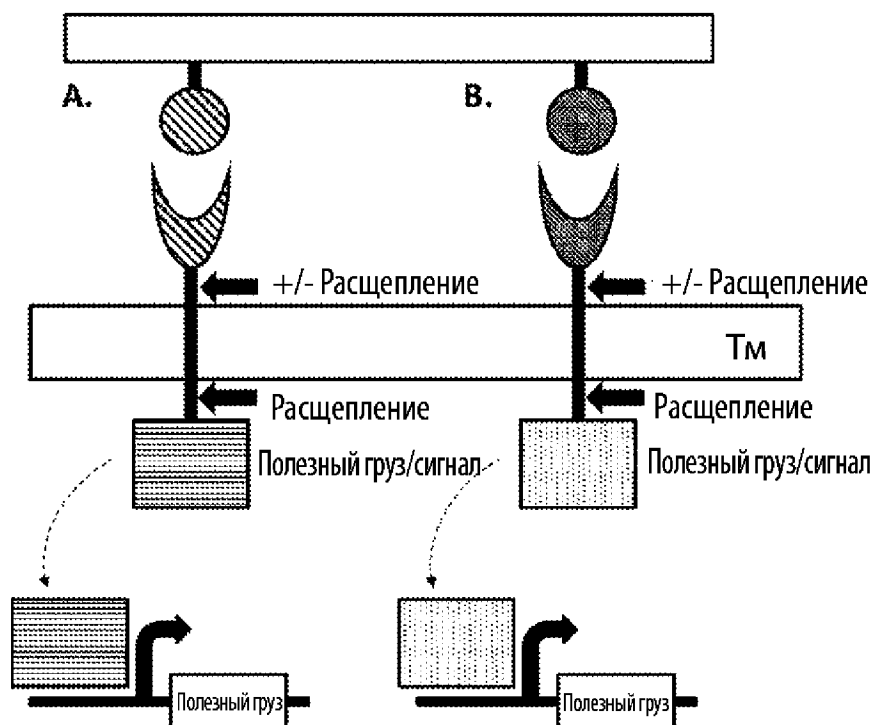
Фиг. 7



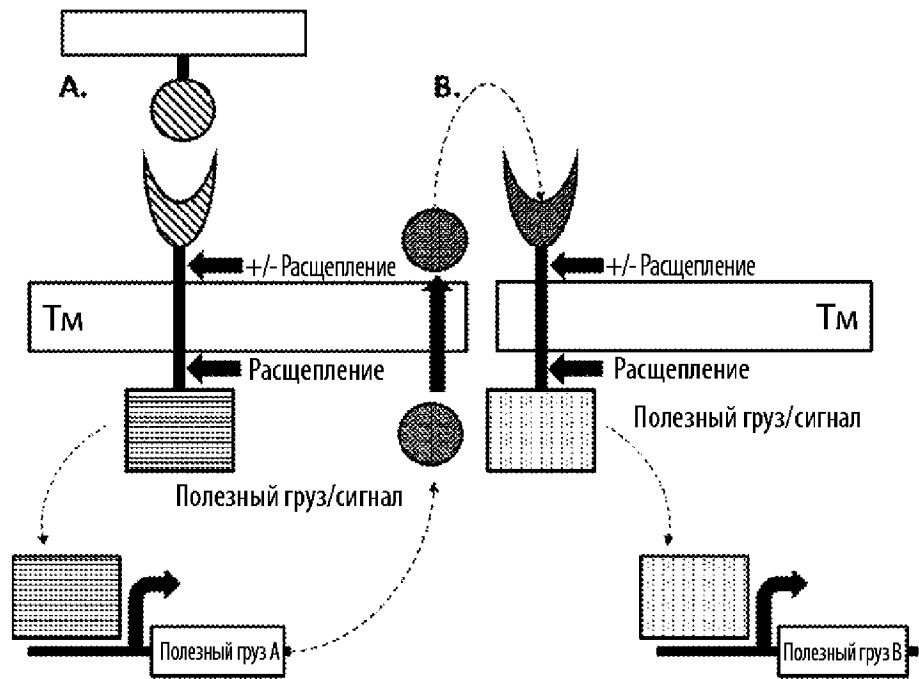
Фиг. 8



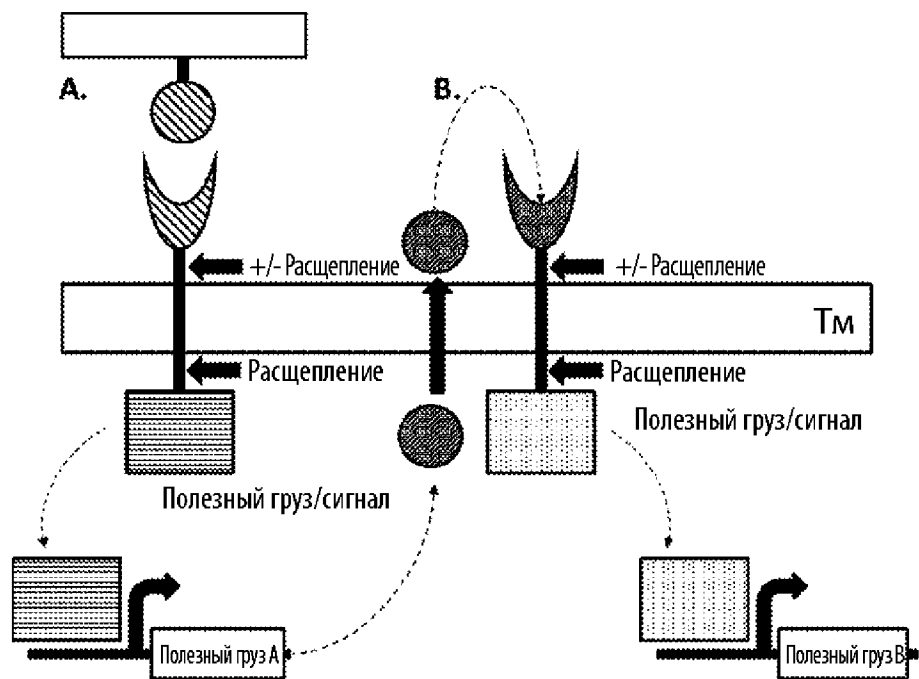
Фиг. 9



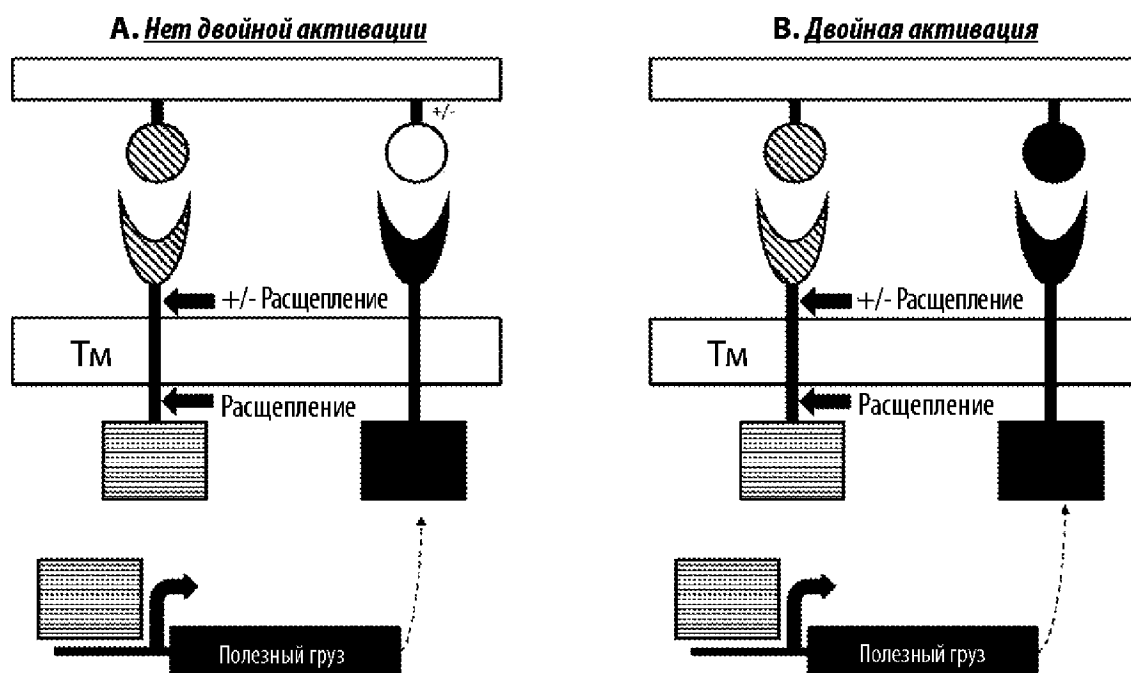
Фиг. 10



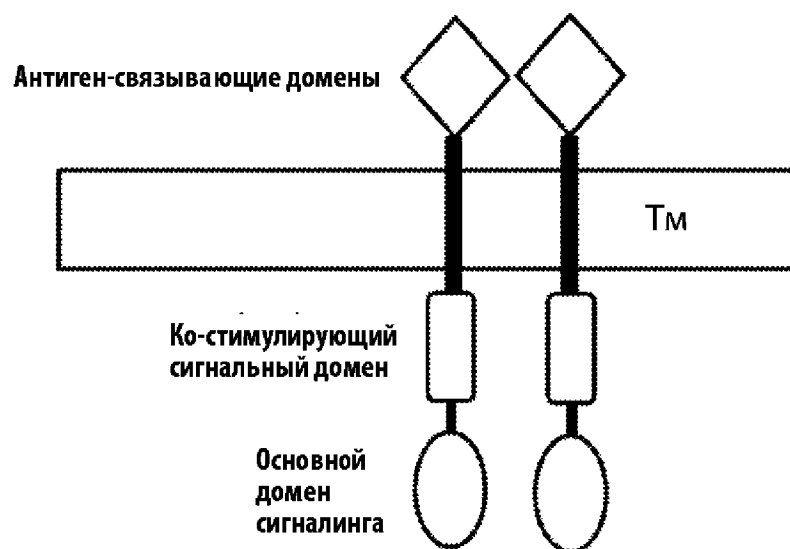
Фиг. 11



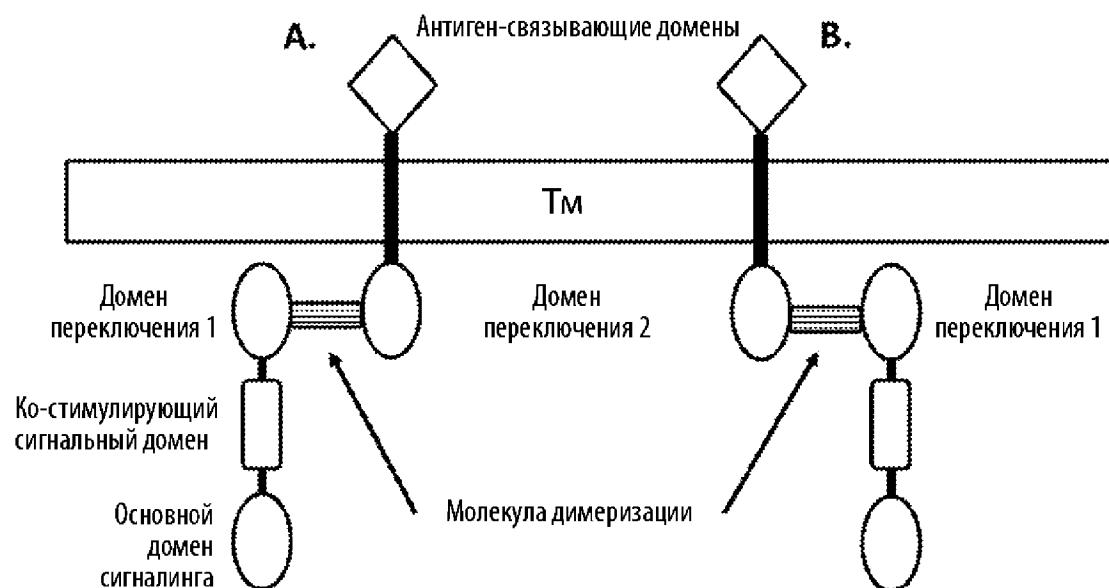
Фиг. 12



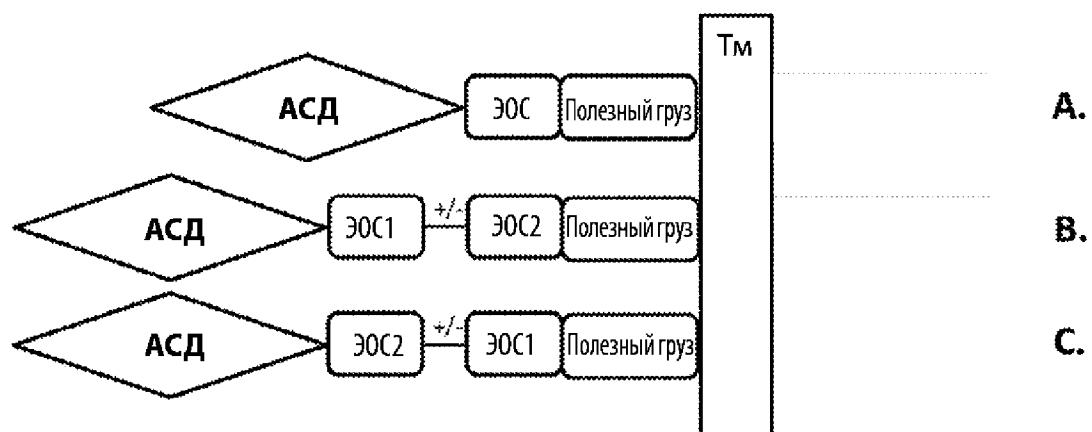
Фиг. 13



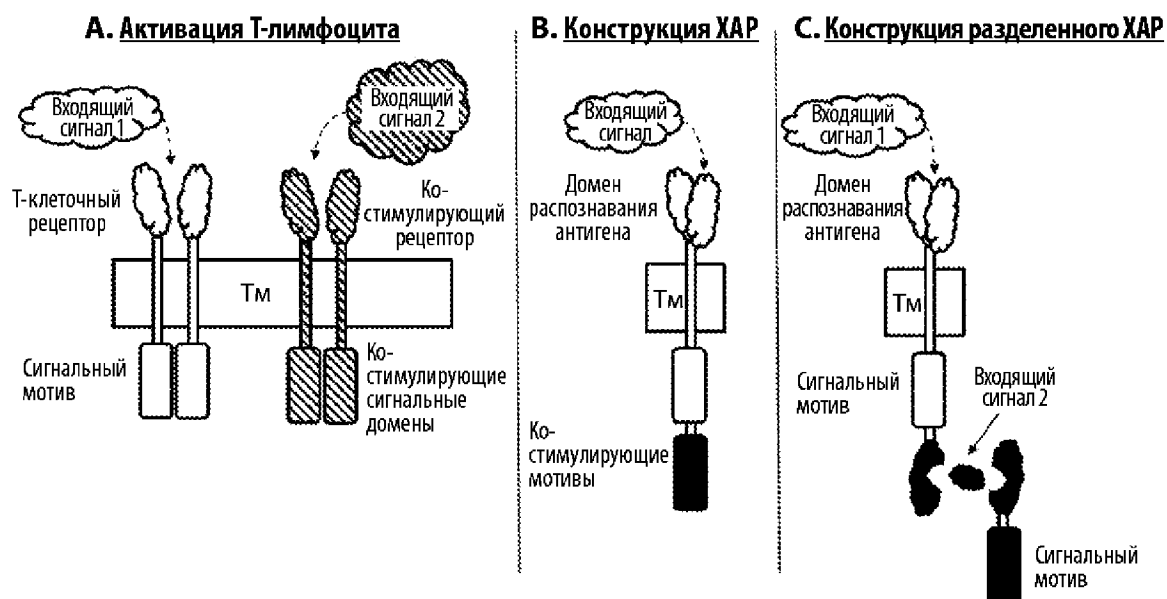
Фиг. 14



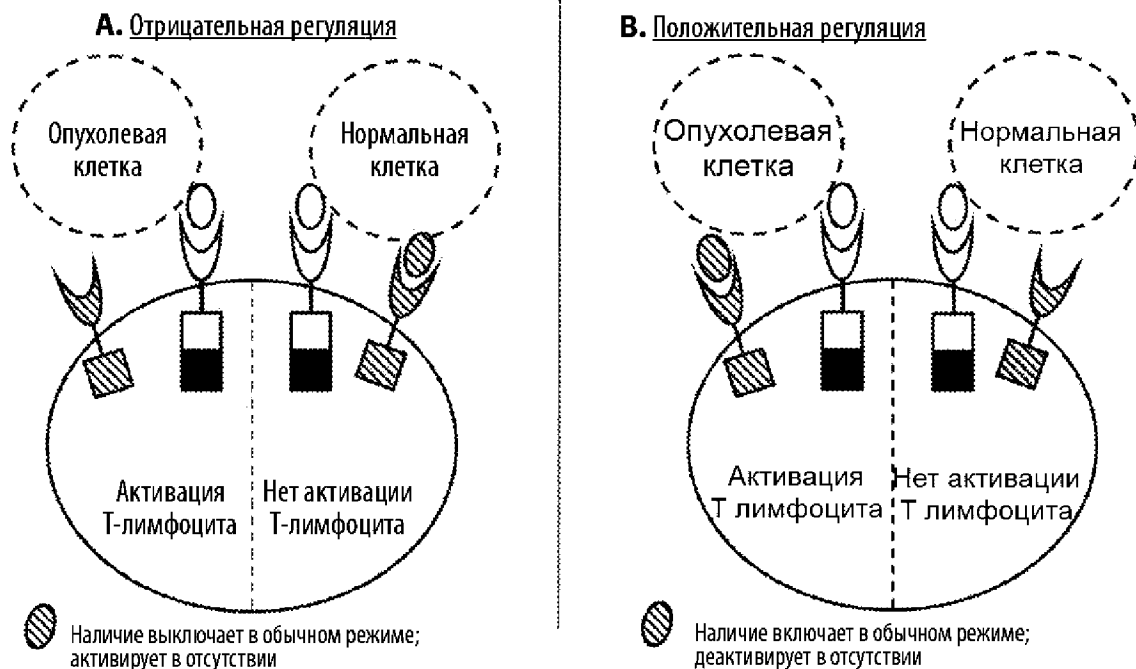
Фиг. 15



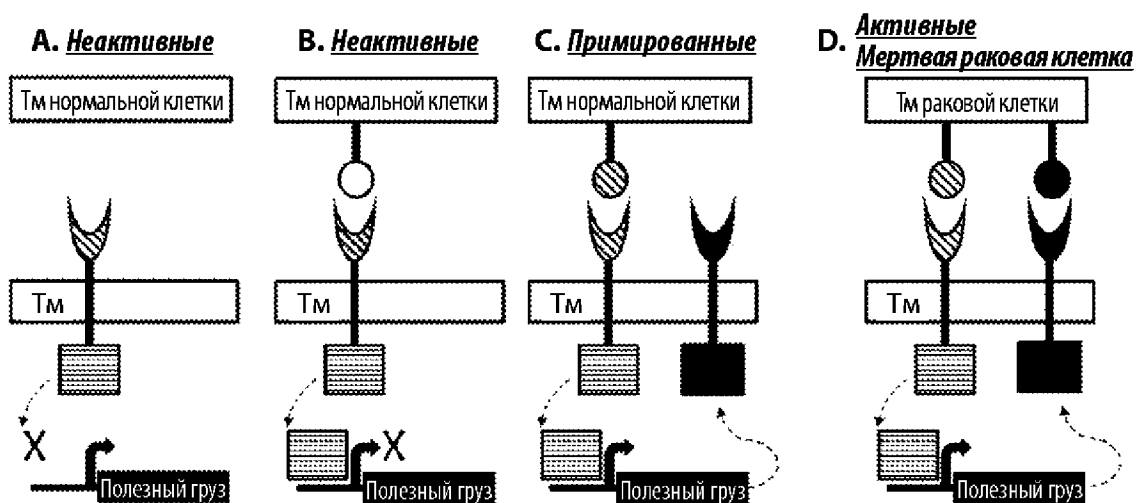
Фиг. 16



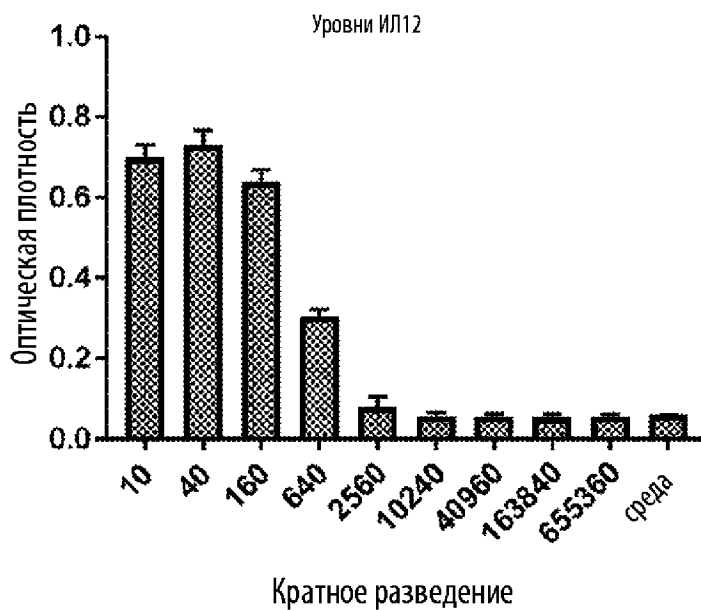
Фиг. 17



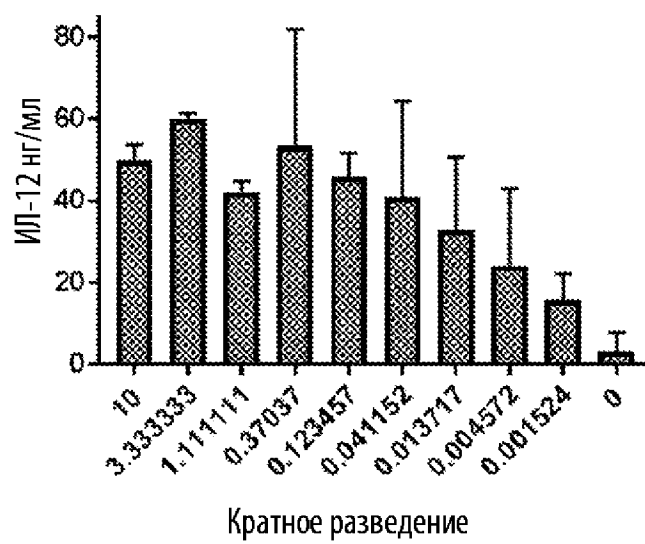
Фиг. 18



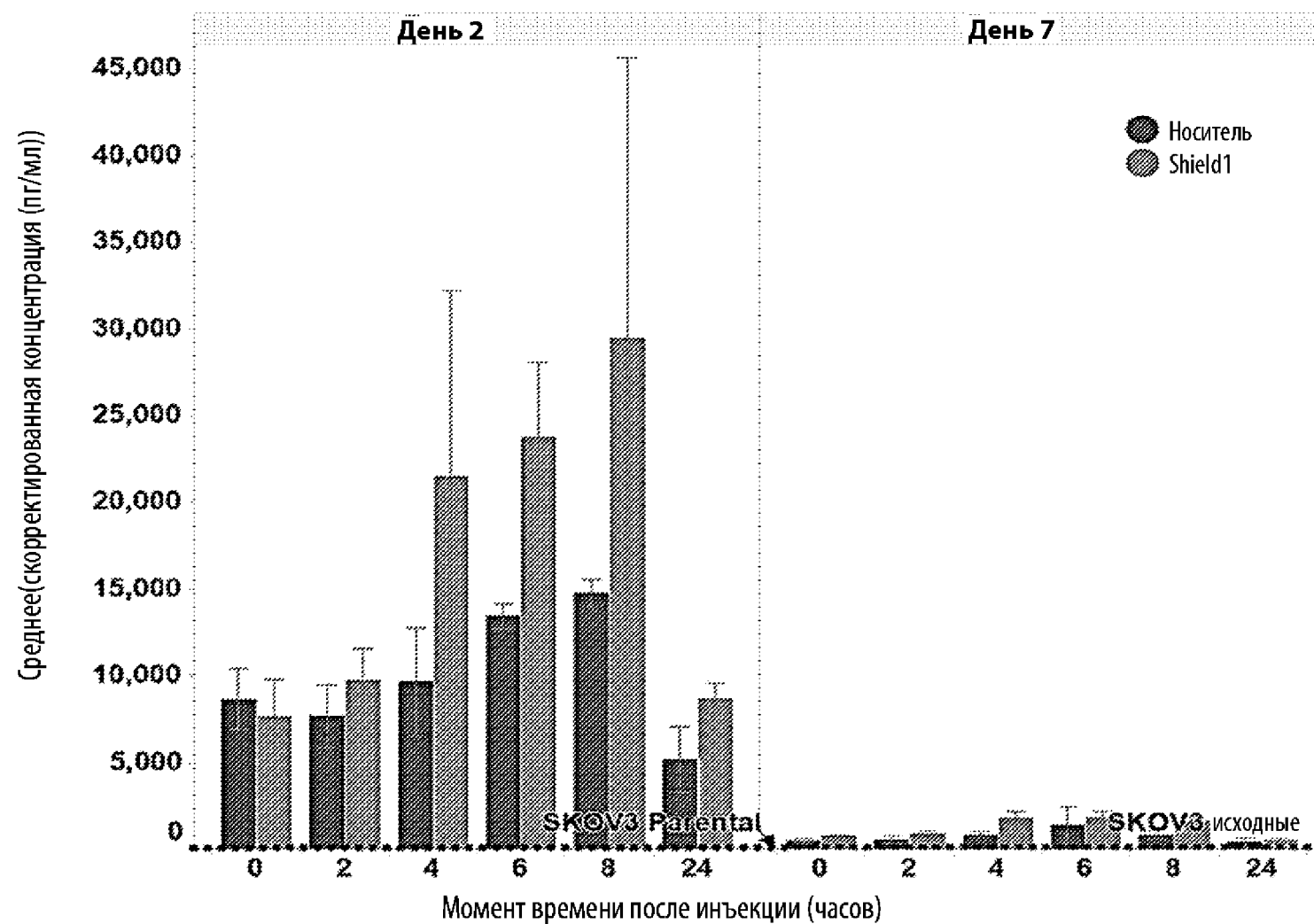
Фиг. 19А



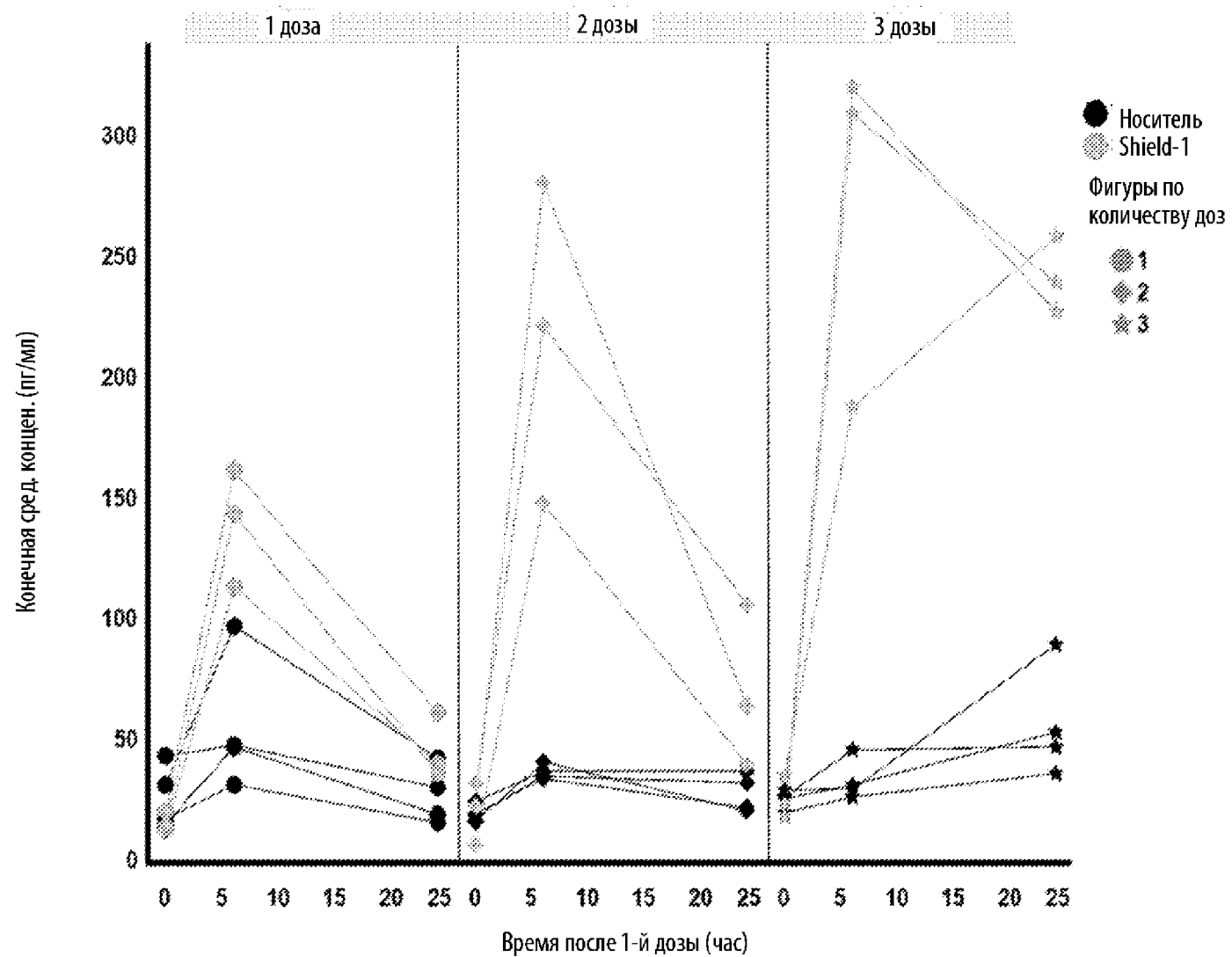
Фиг. 19В



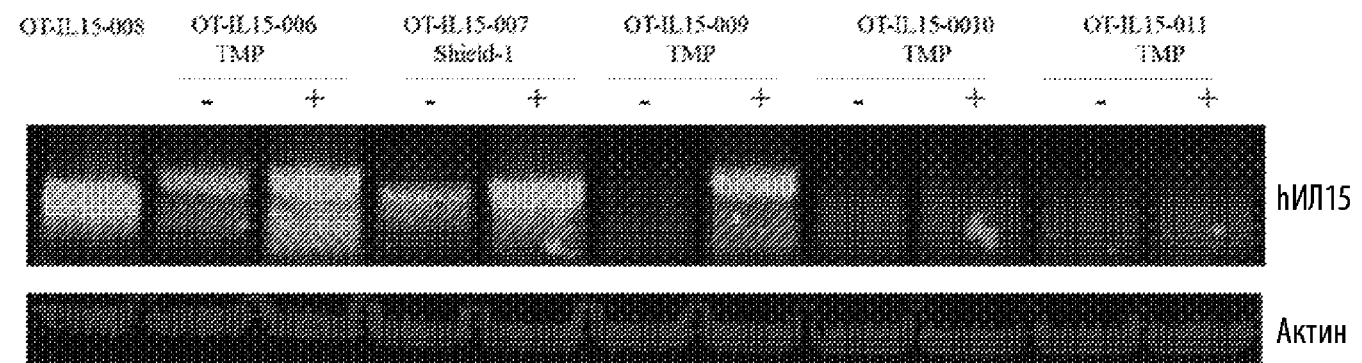
Фиг. 19С



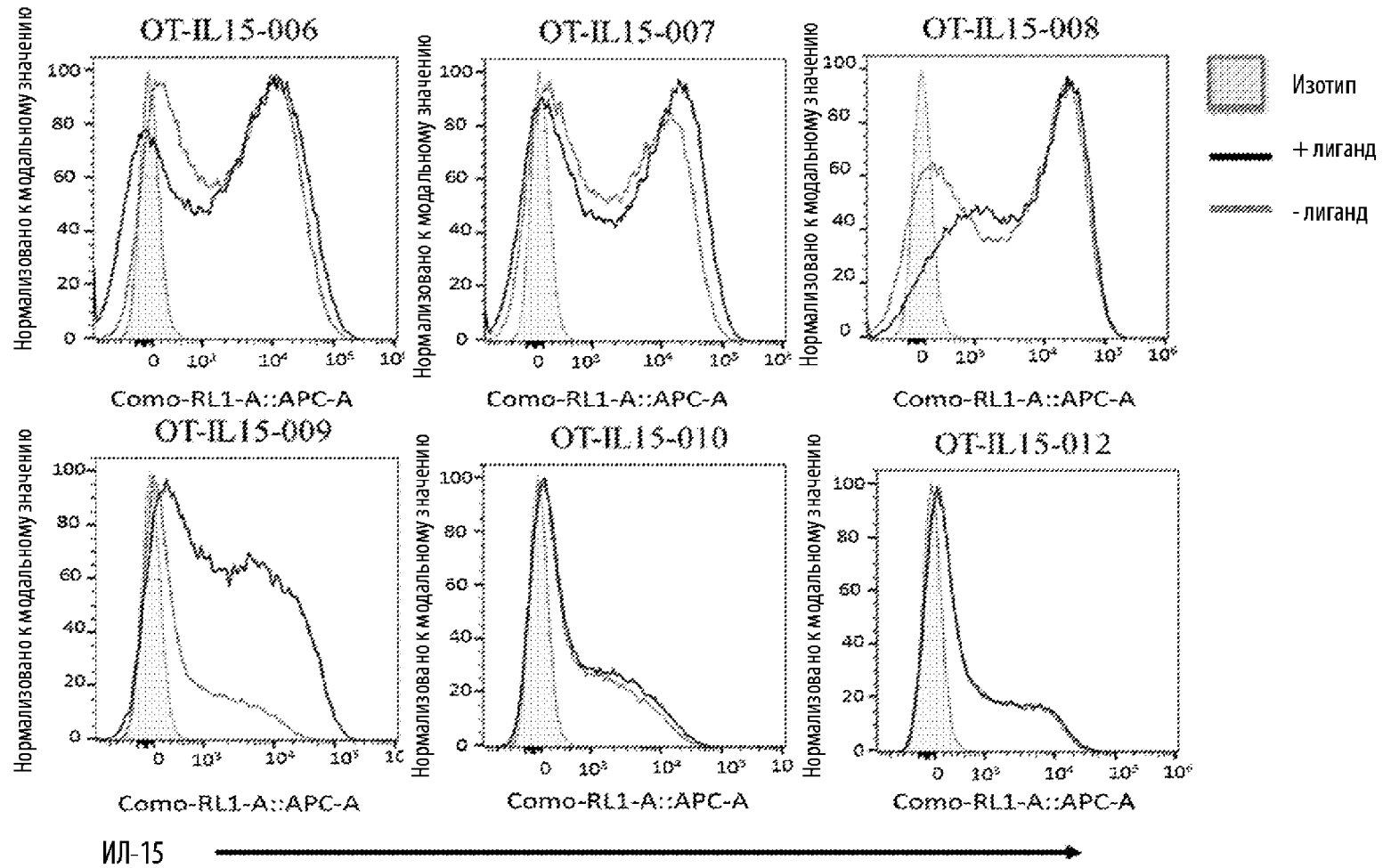
Фиг. 19D



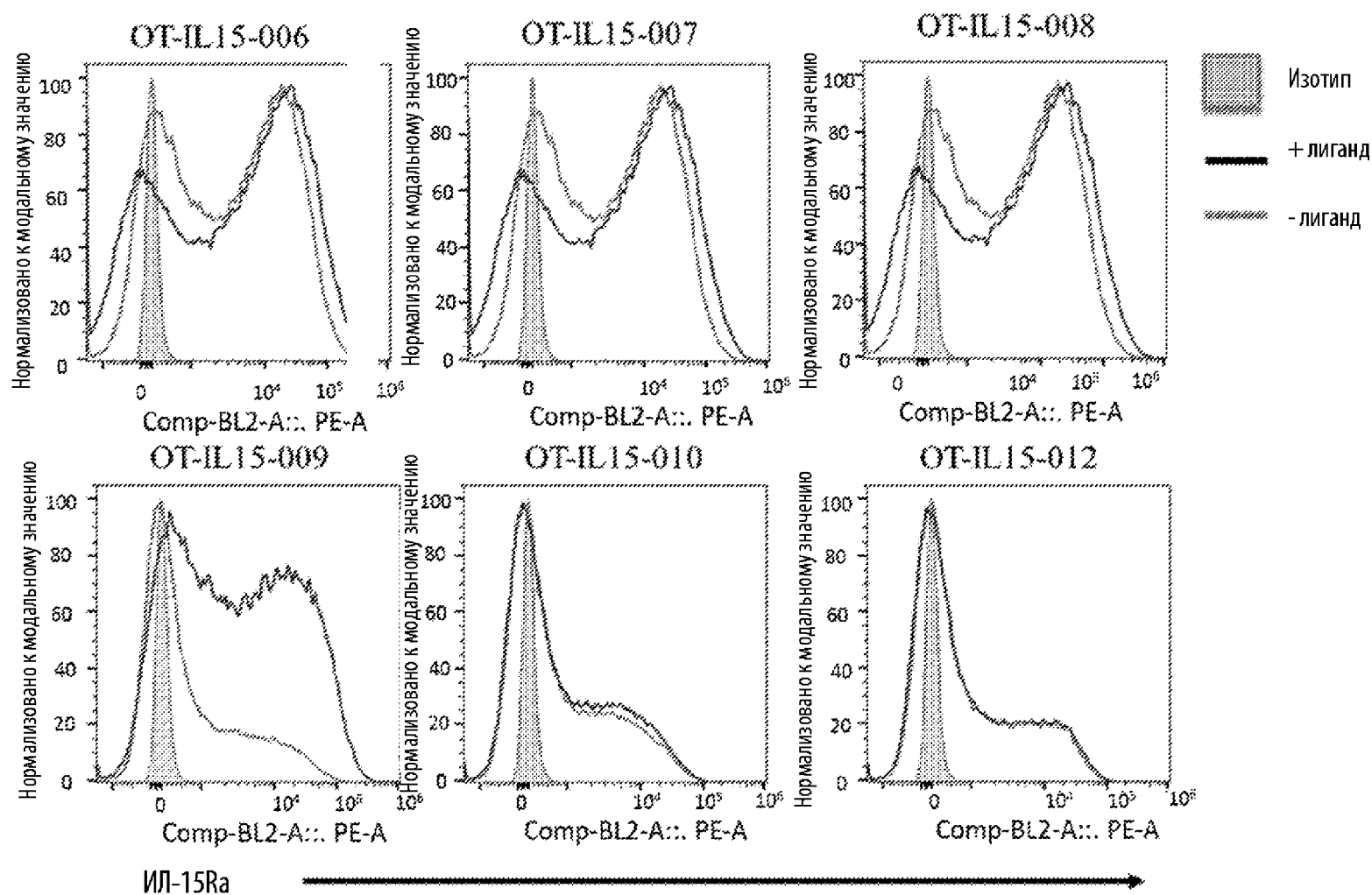
Фиг. 20А



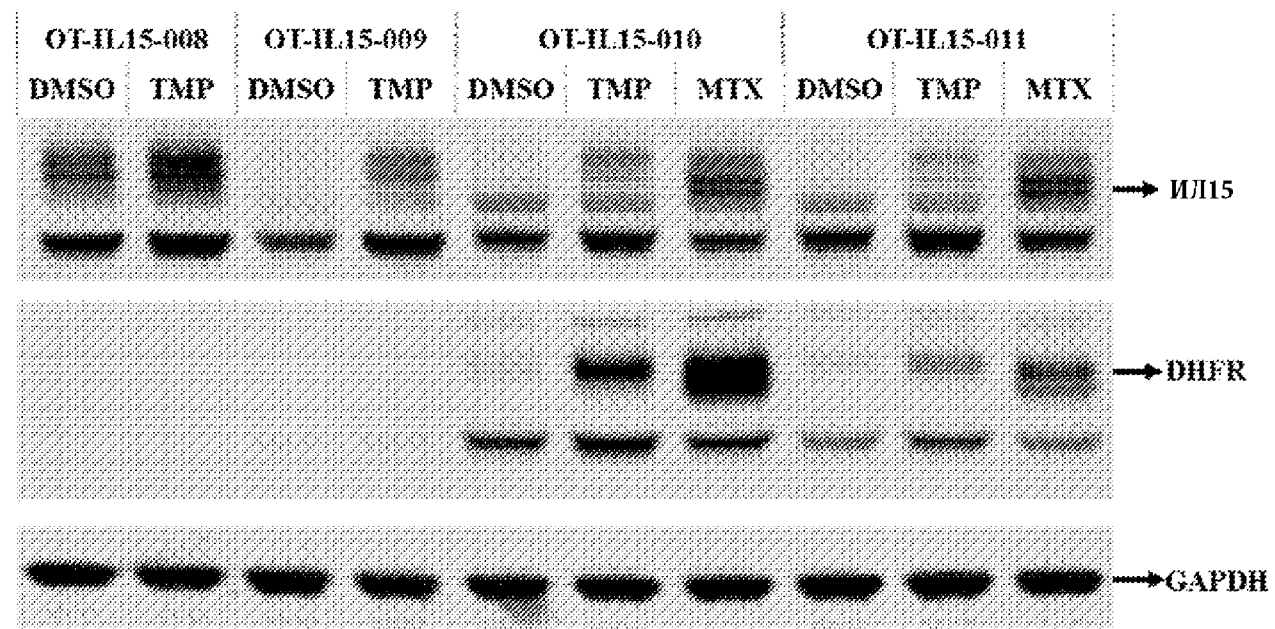
Фиг. 20В



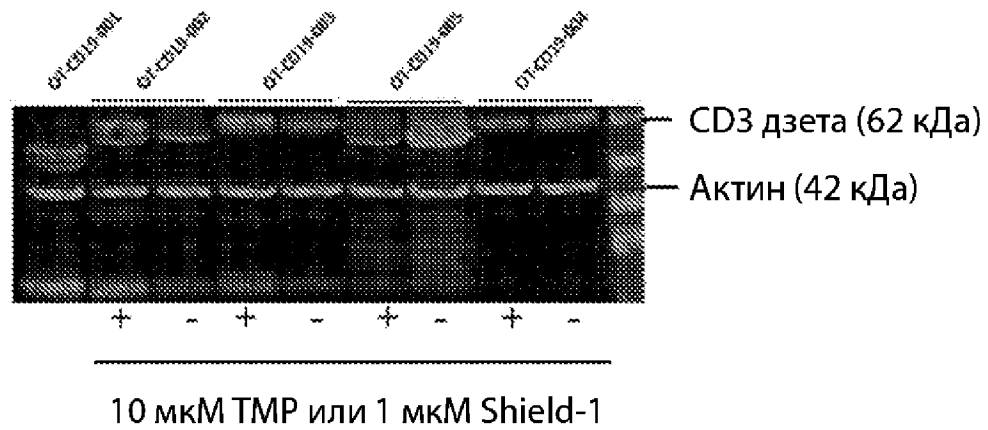
Фиг. 20С



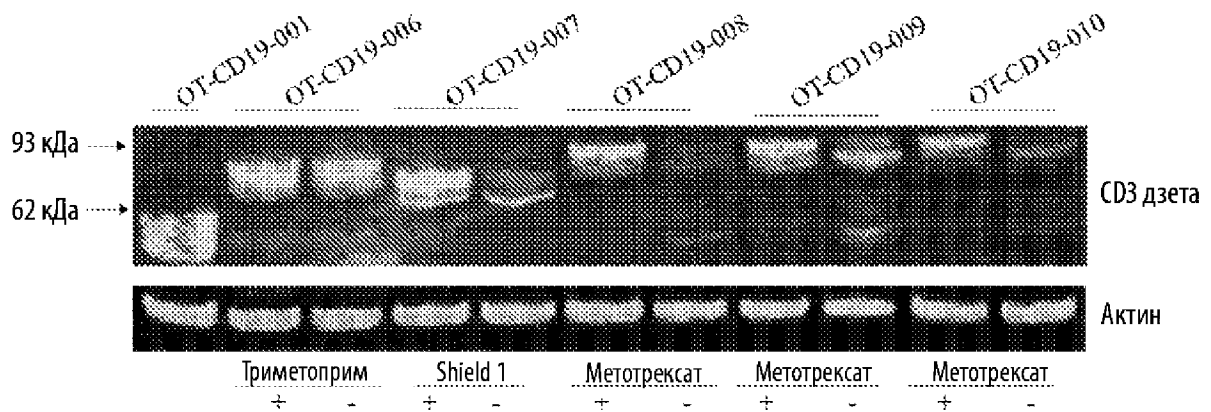
Фиг. 20D



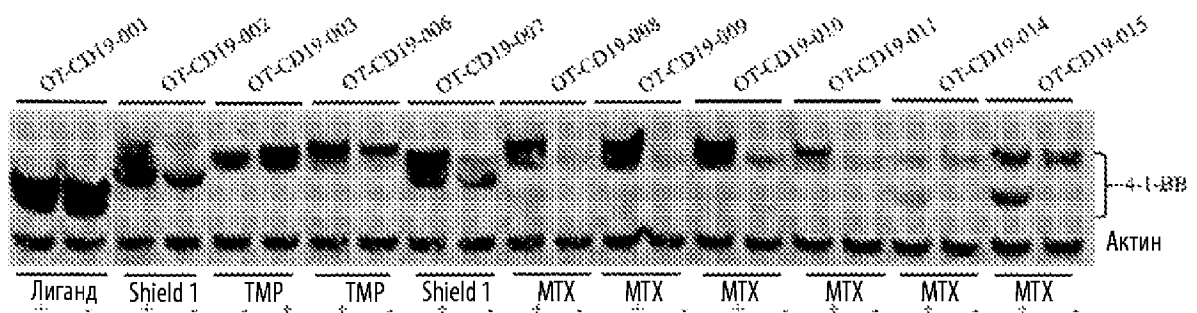
Фиг. 21А



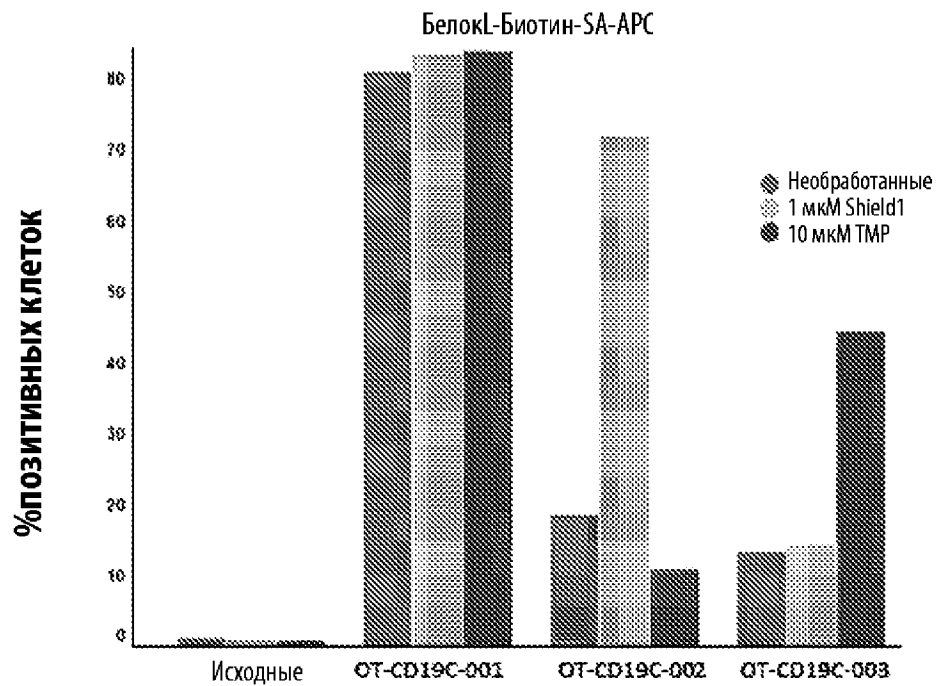
Фиг. 21В



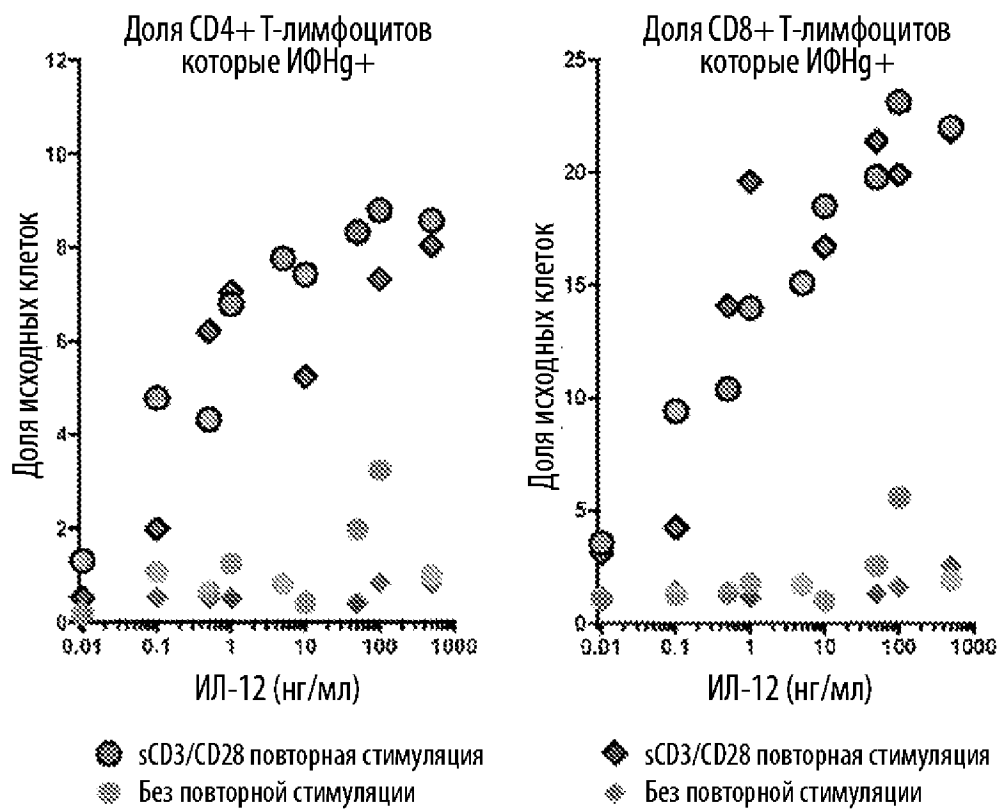
Фиг. 21С



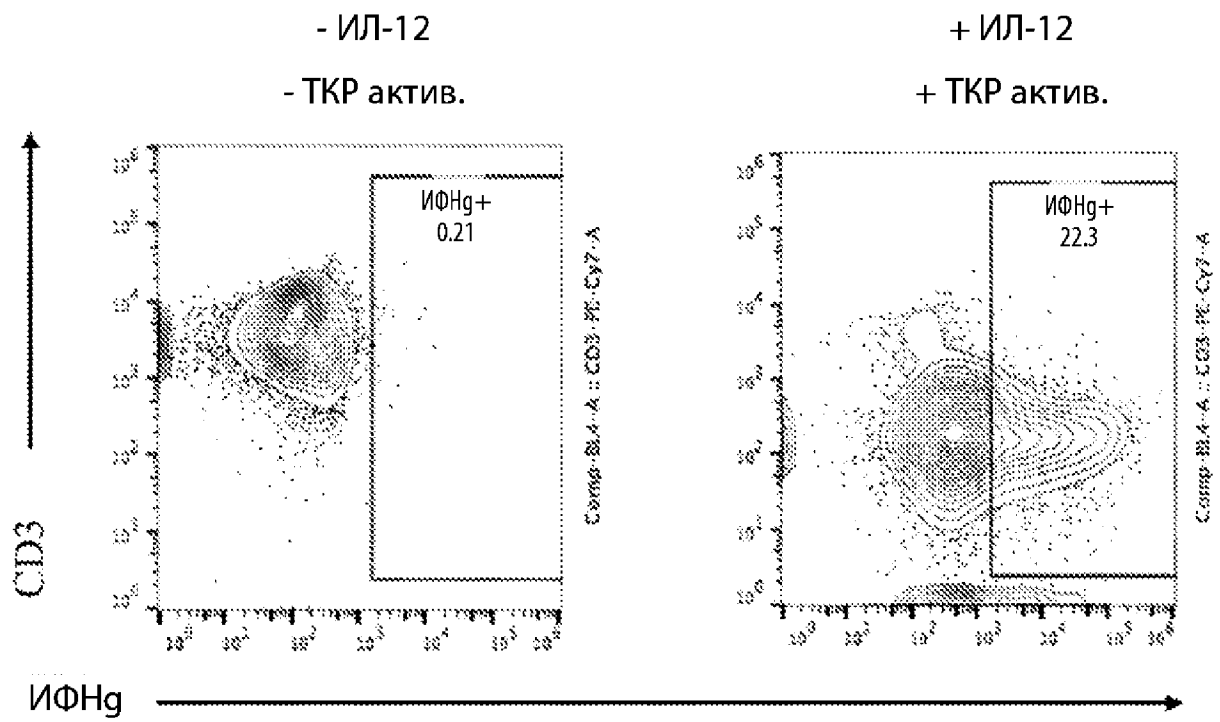
Фиг. 21D



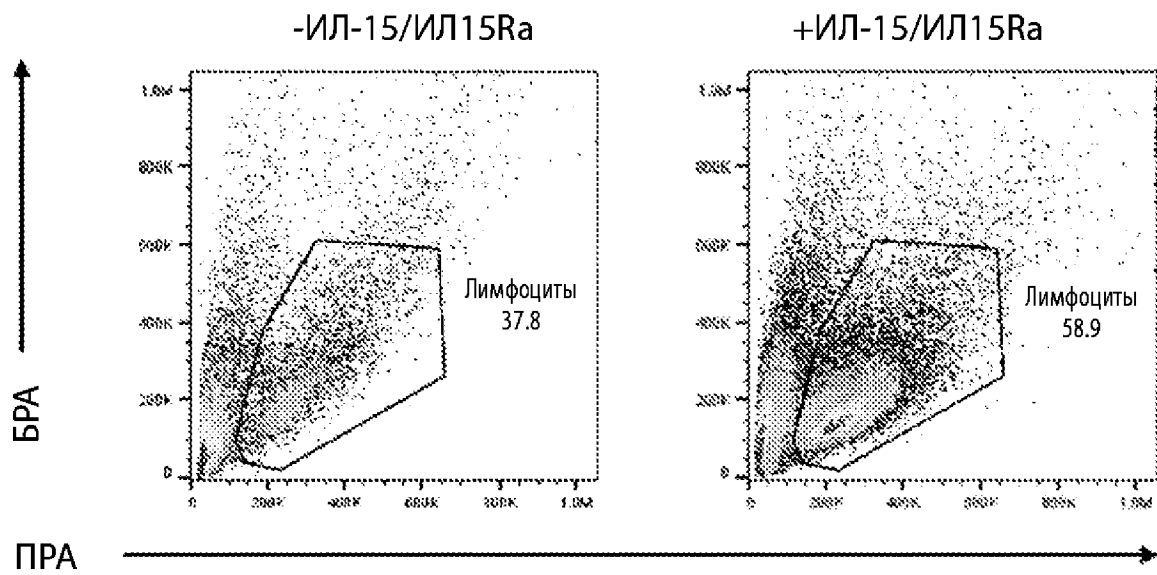
Фиг. 22



Фиг. 23А

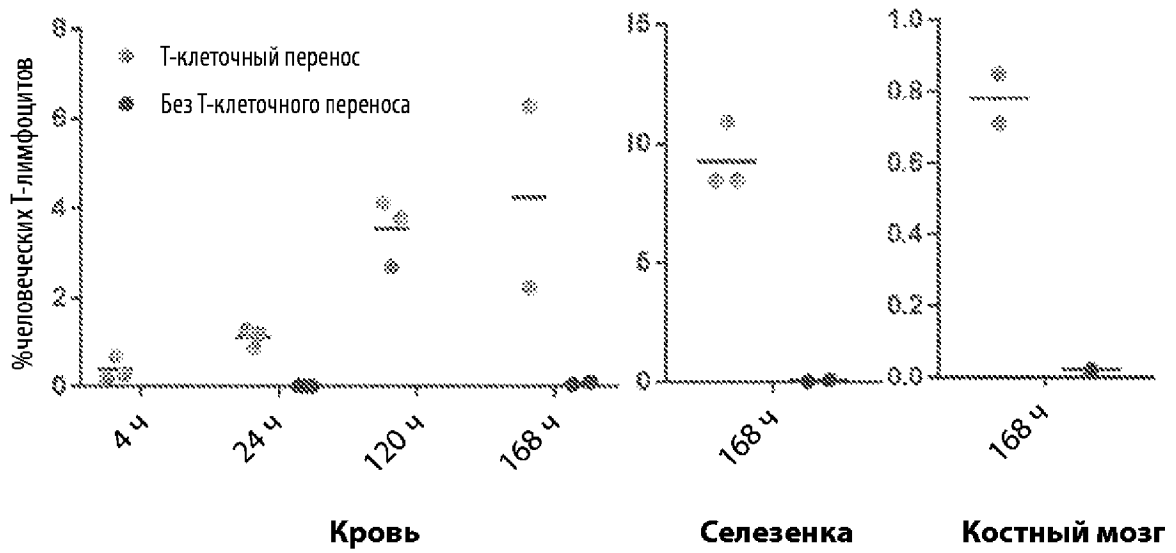


Фиг. 23В

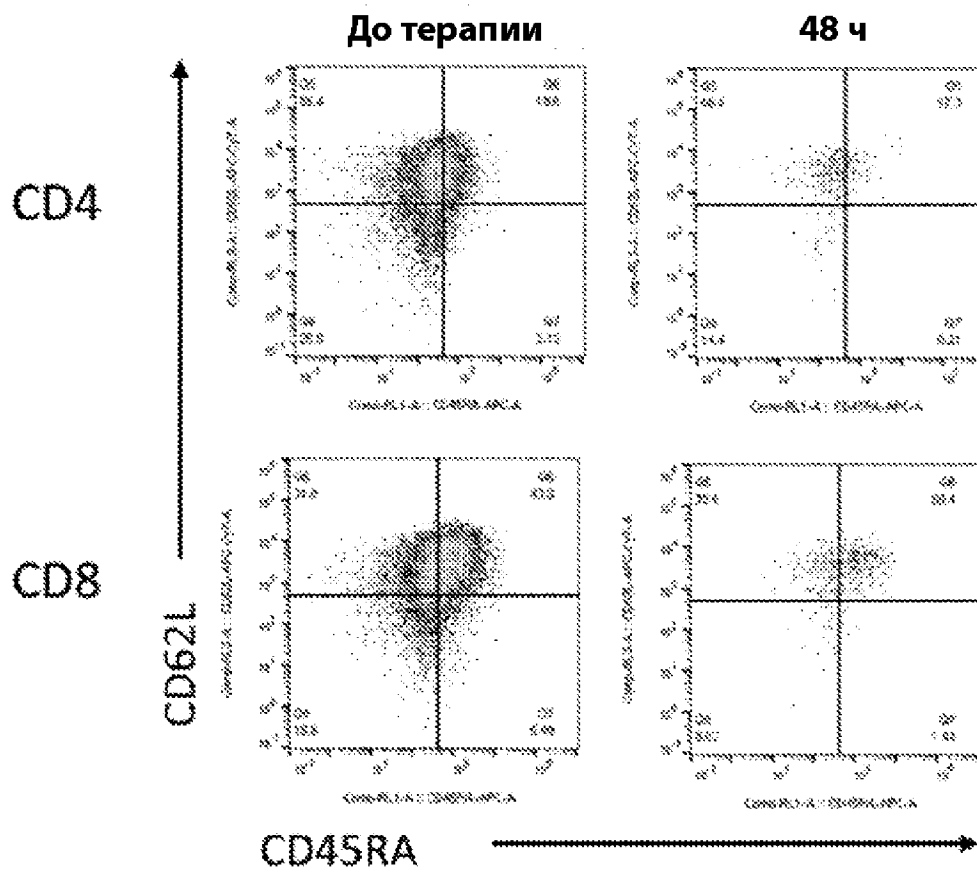


Фиг. 23С

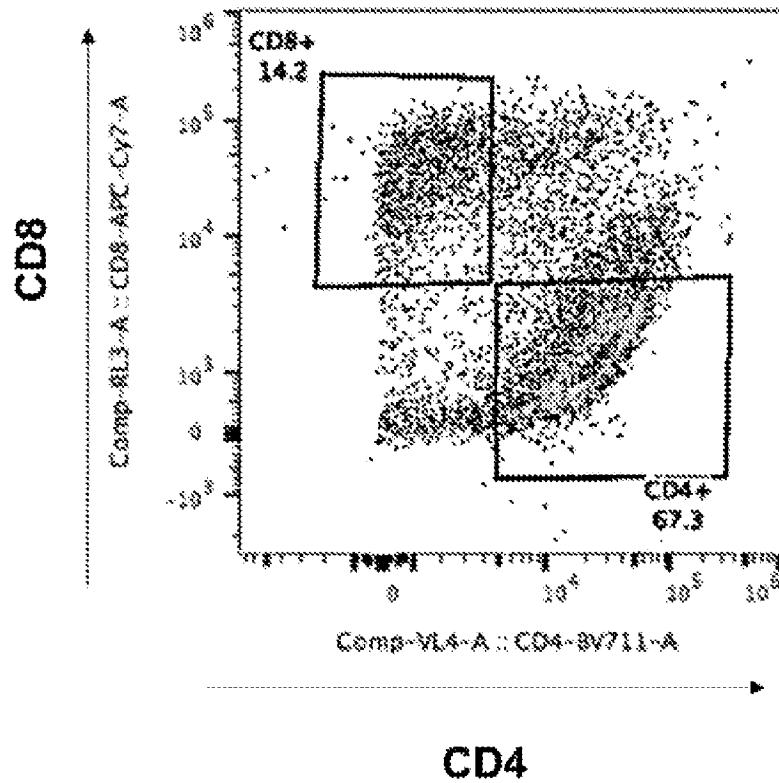
CD3+ CD45+ клетки



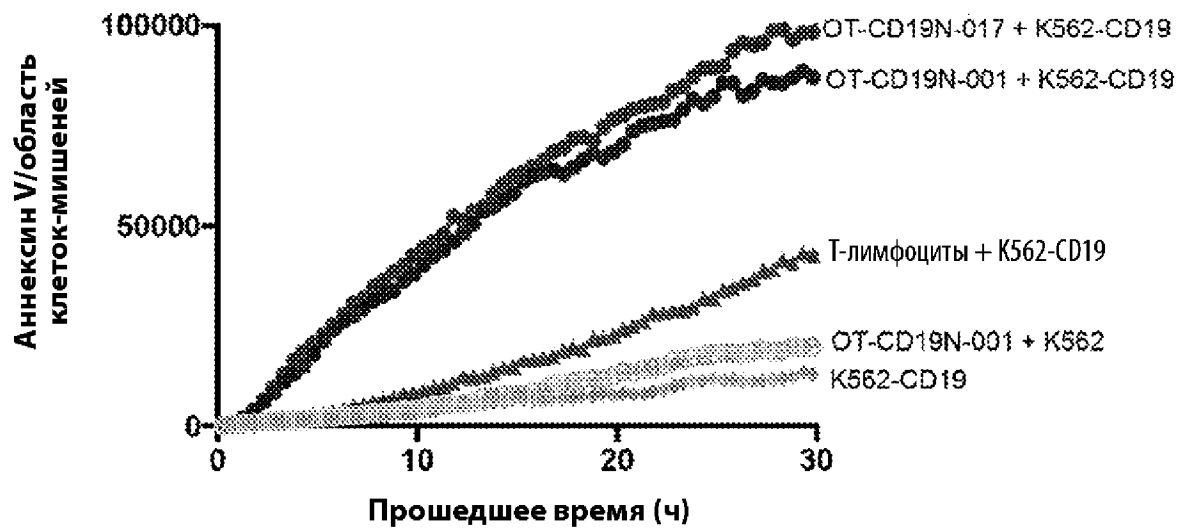
Фиг. 23D



Фиг. 24А

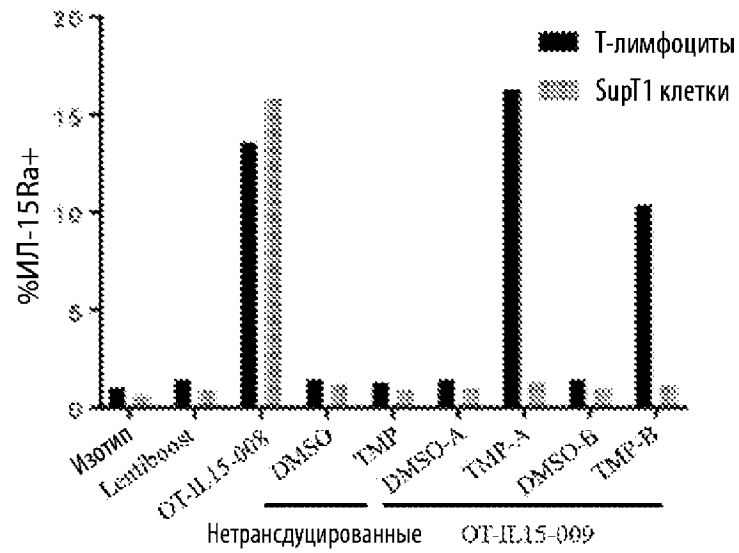


Фиг. 24В



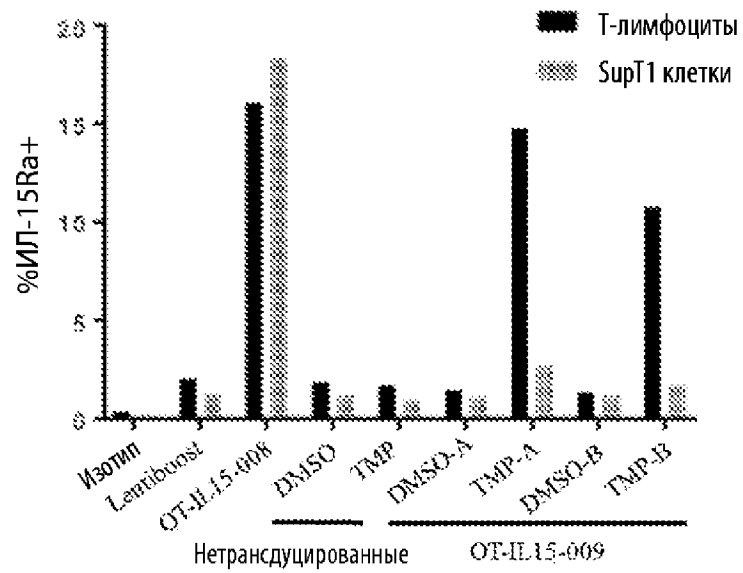
Фиг. 25А

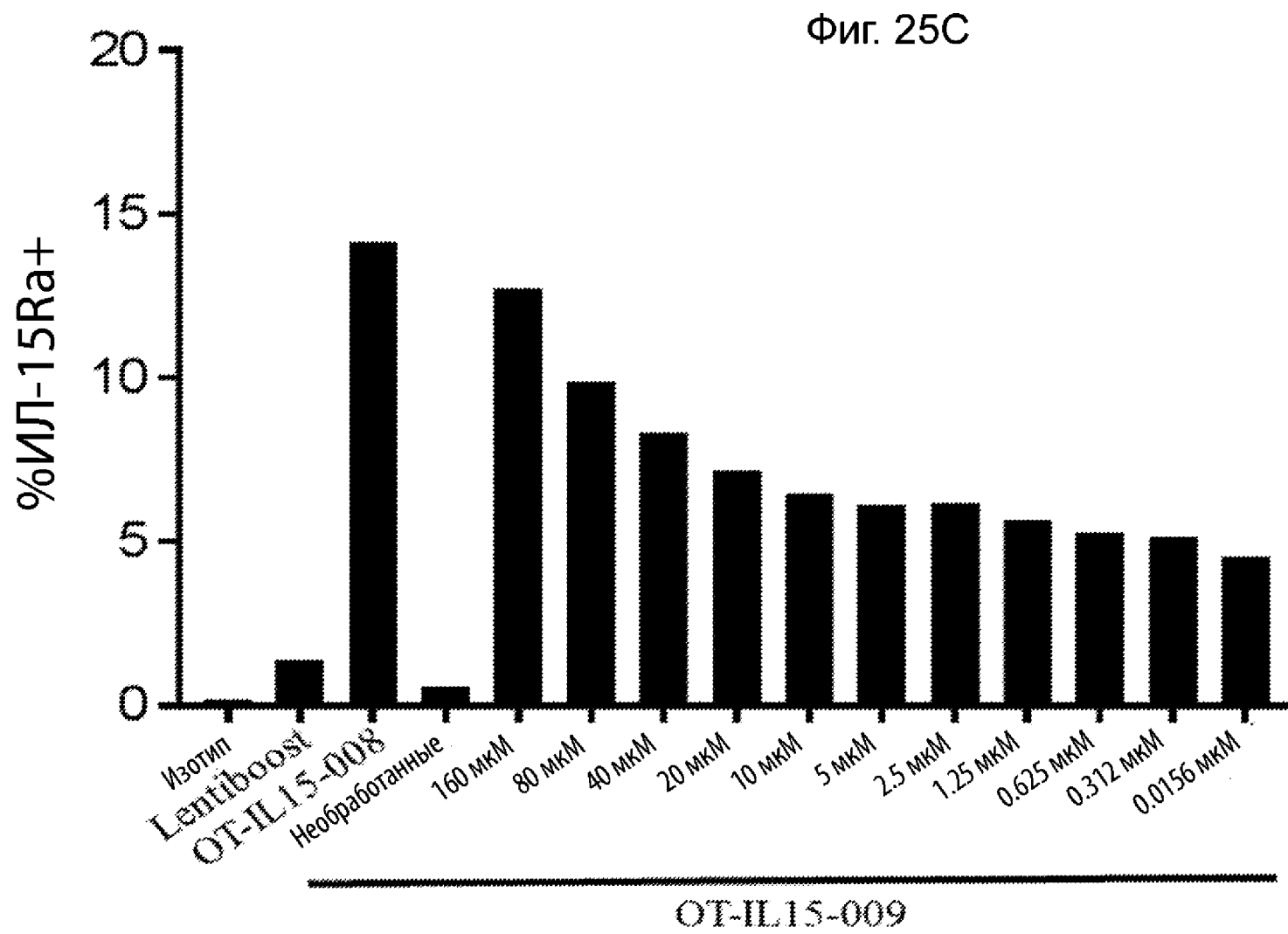
24 ч



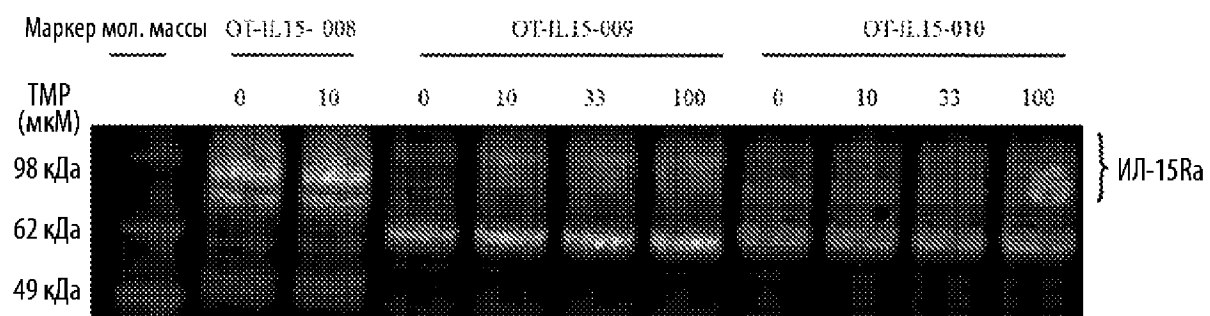
Фиг. 25В

48 ч

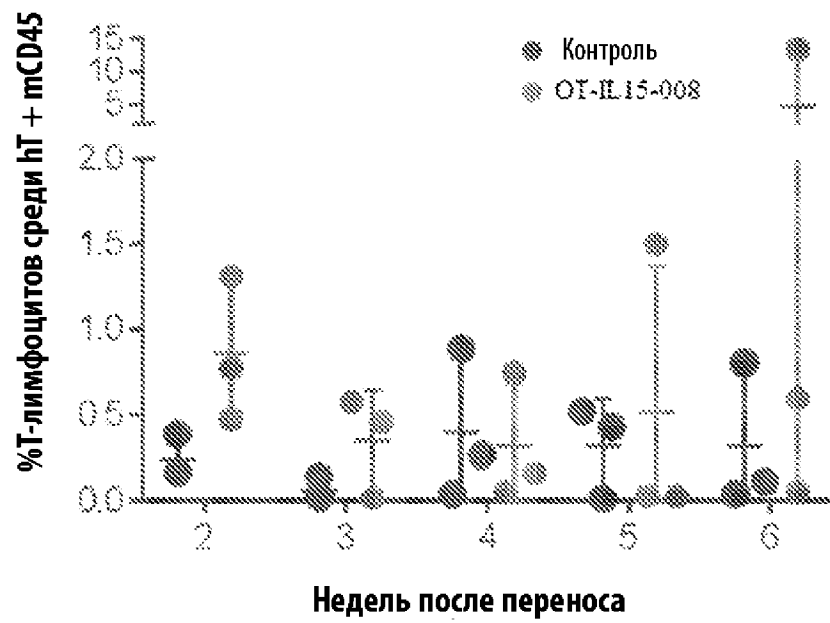




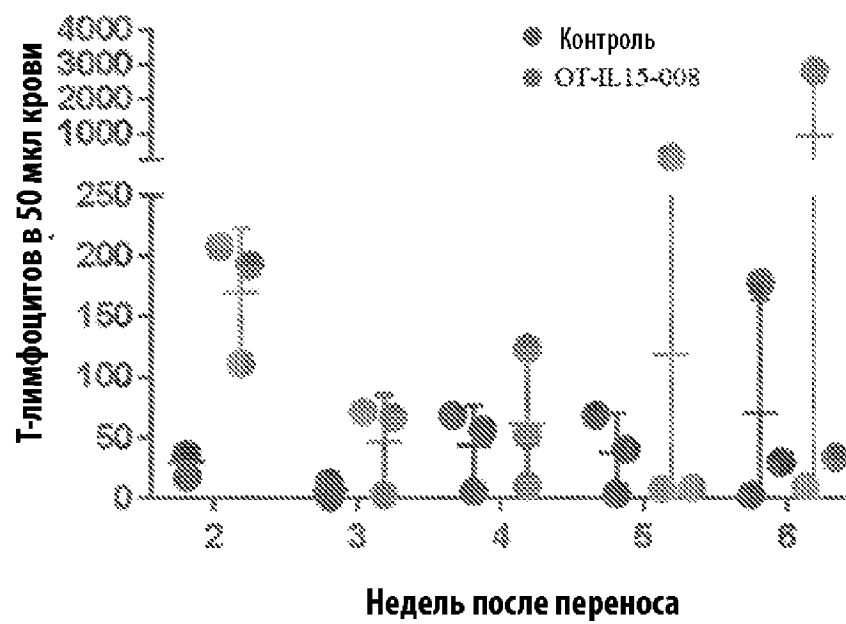
Фиг. 26



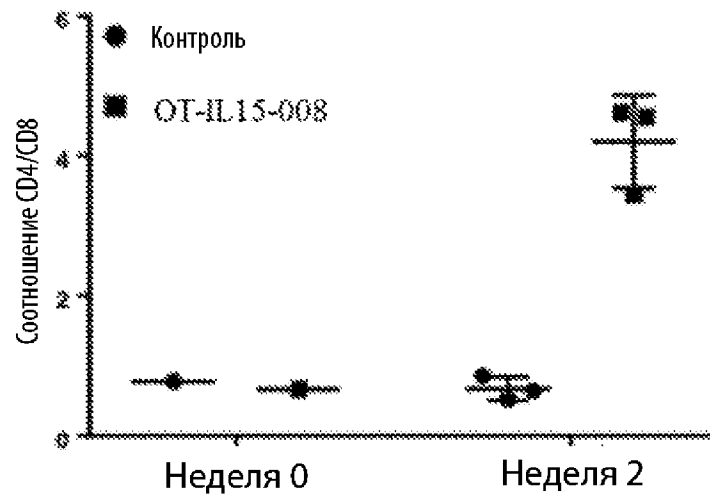
Фиг. 27А



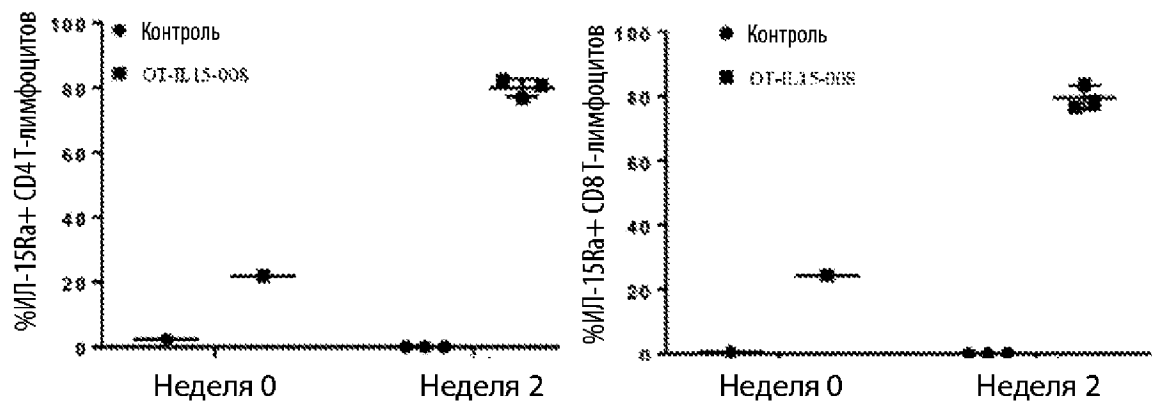
Фиг. 27В



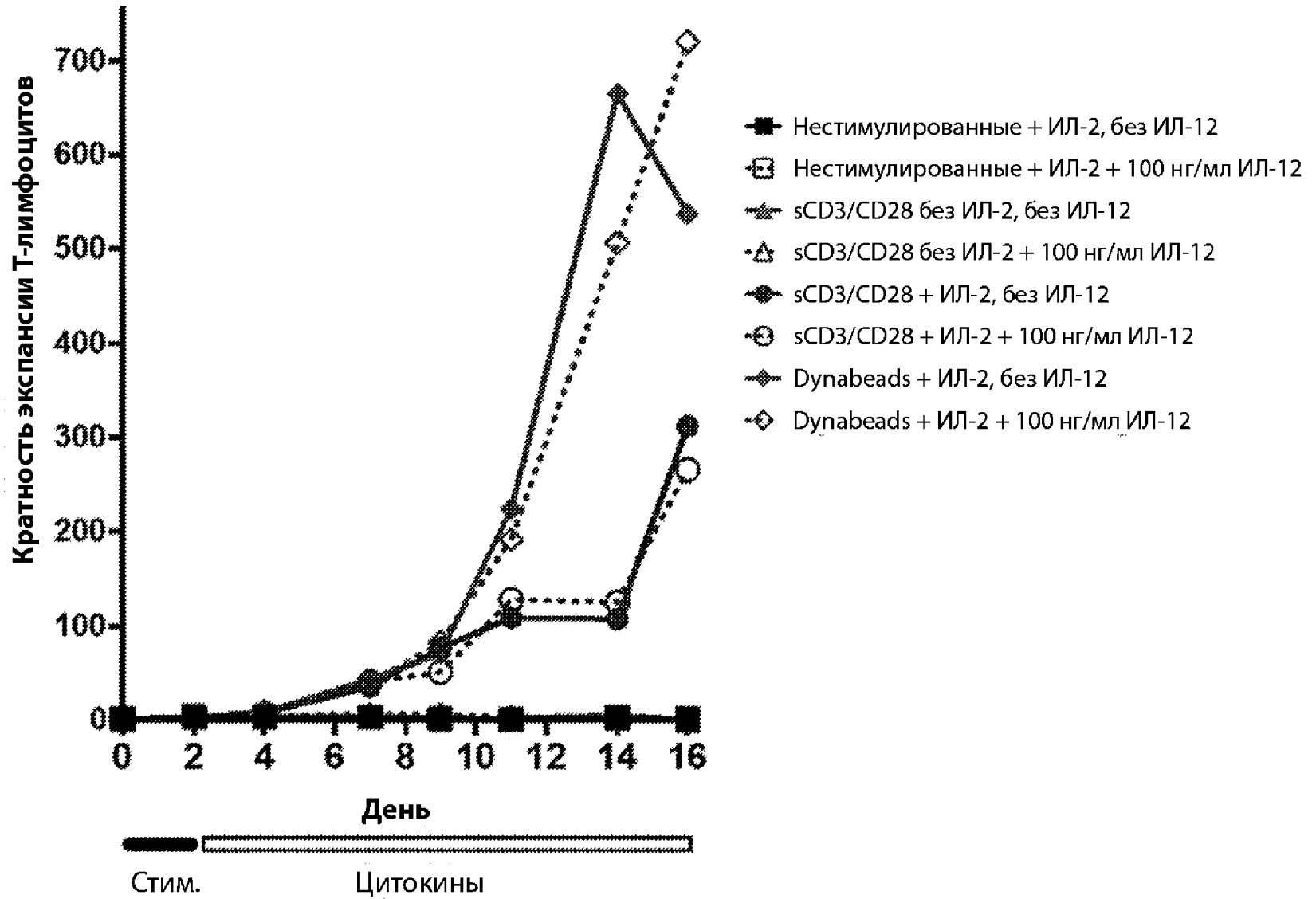
Фиг. 27С



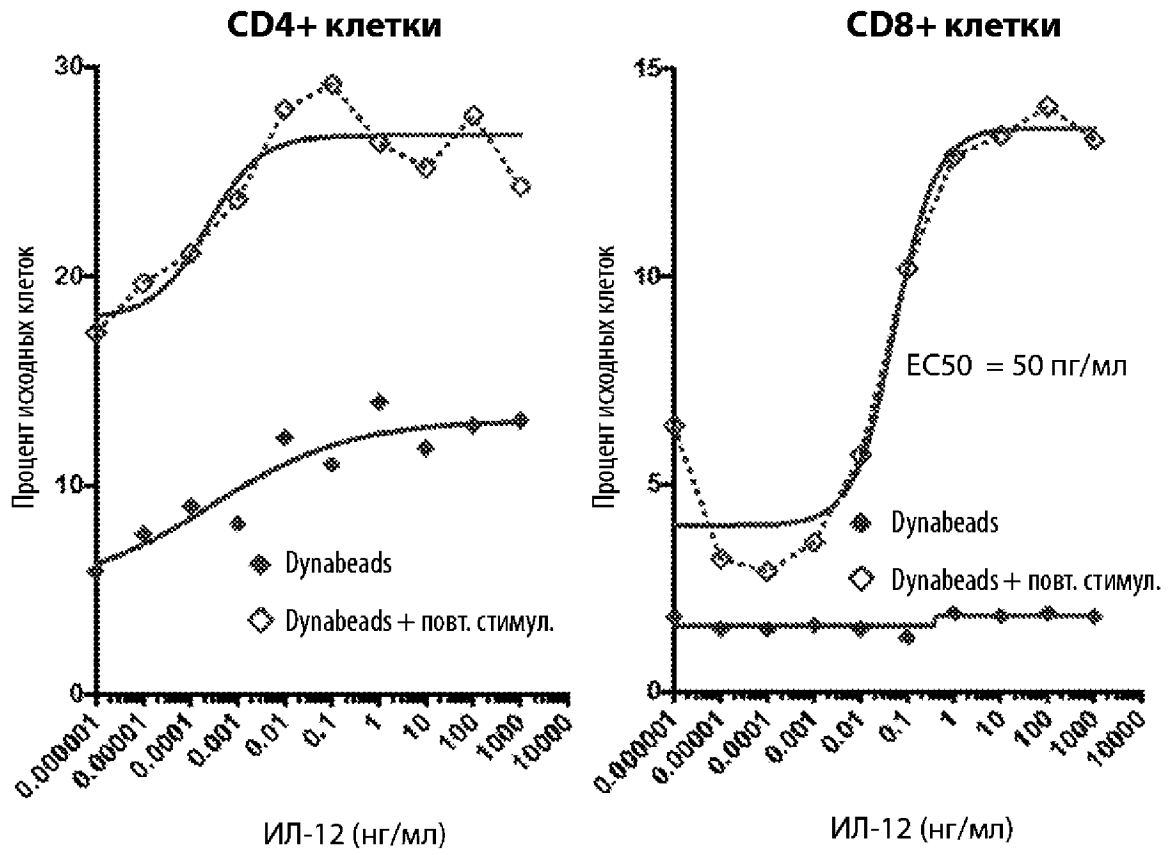
Фиг. 27D



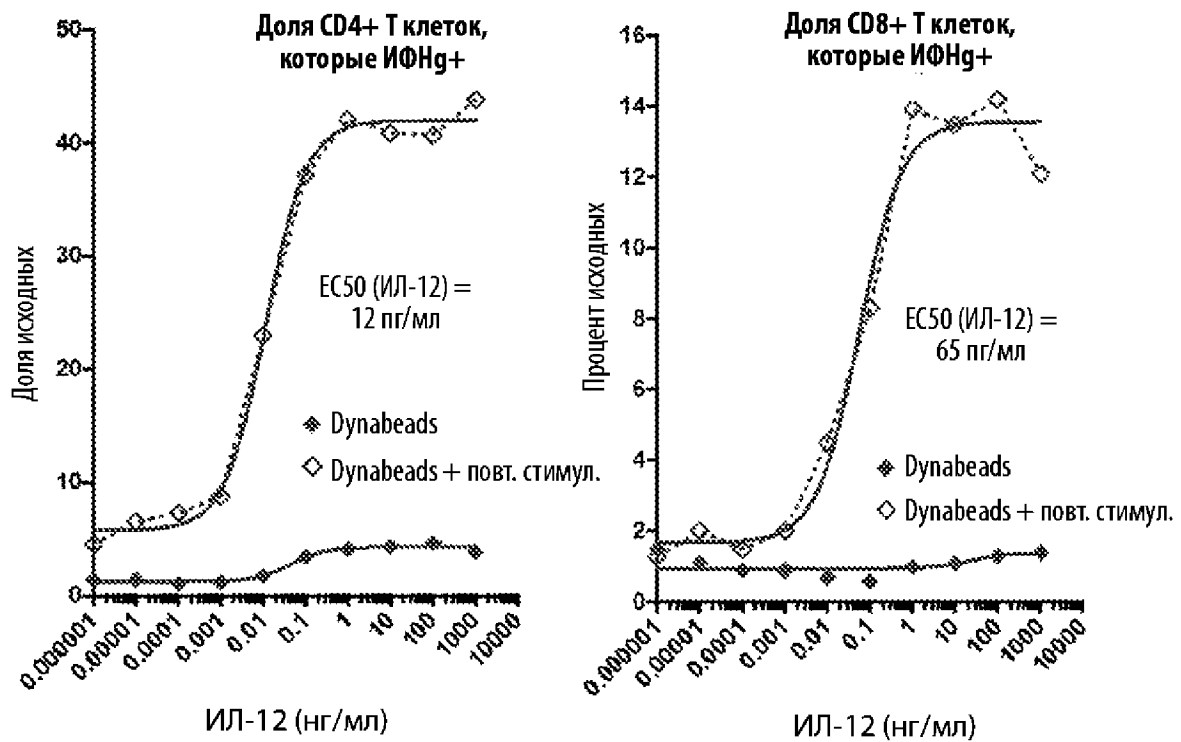
Фиг. 28А



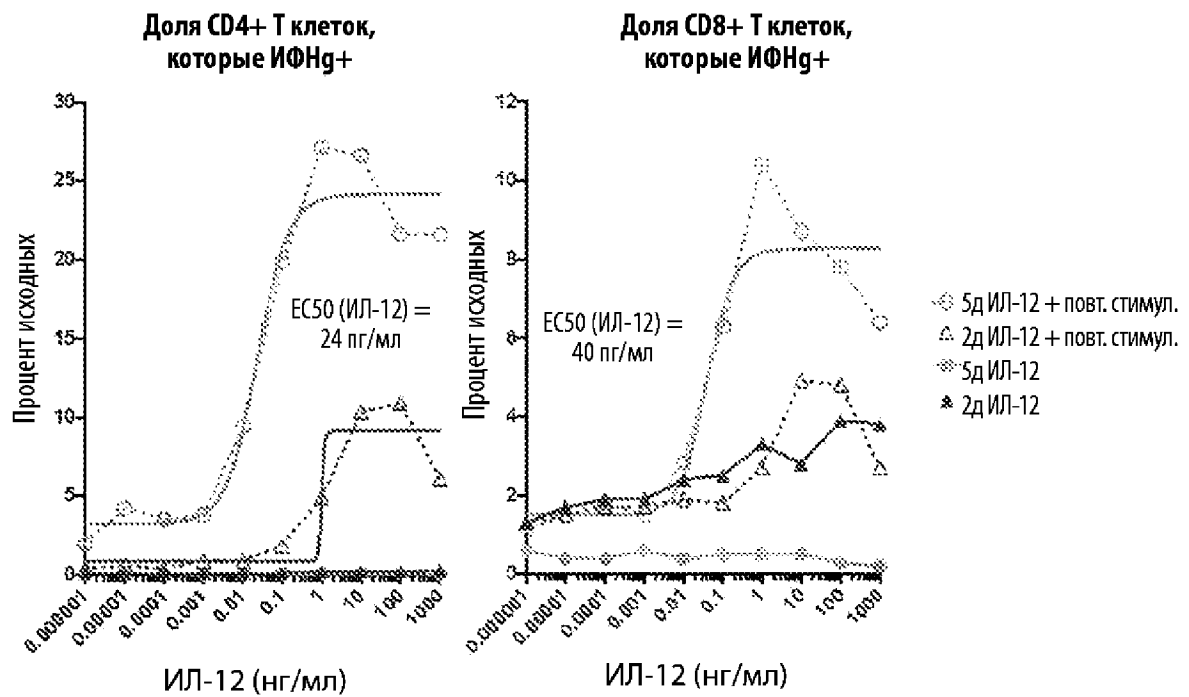
Фиг. 28В



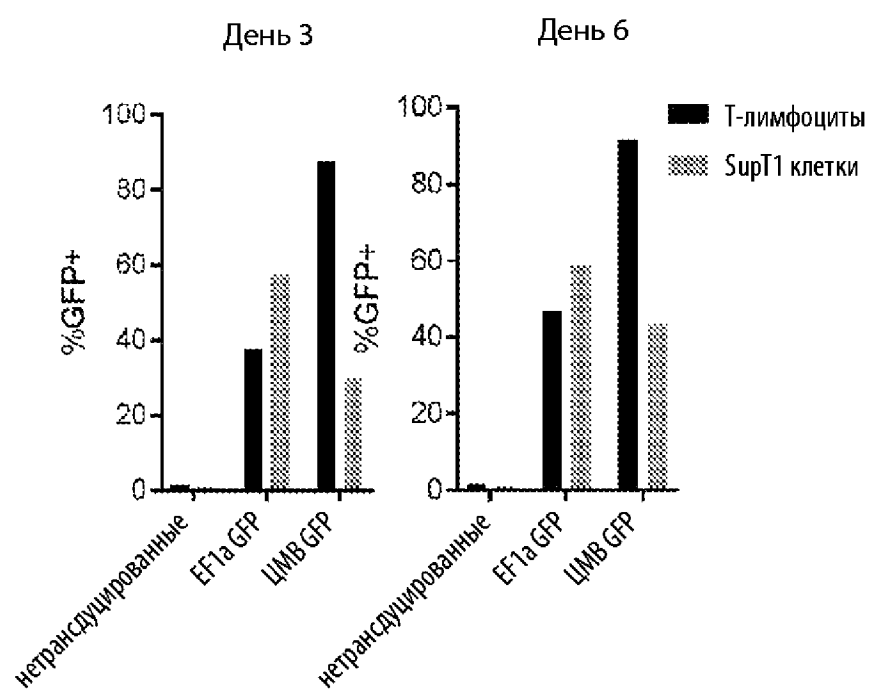
Фиг. 28С



Фиг. 28D

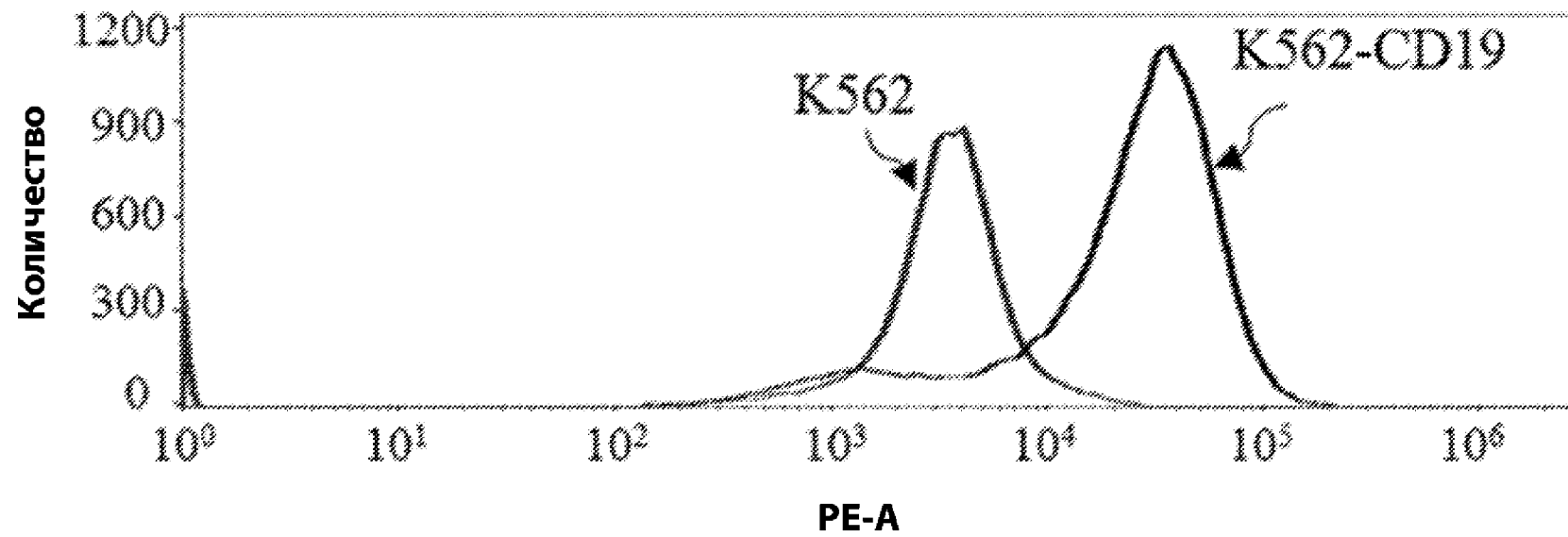


Фиг. 29

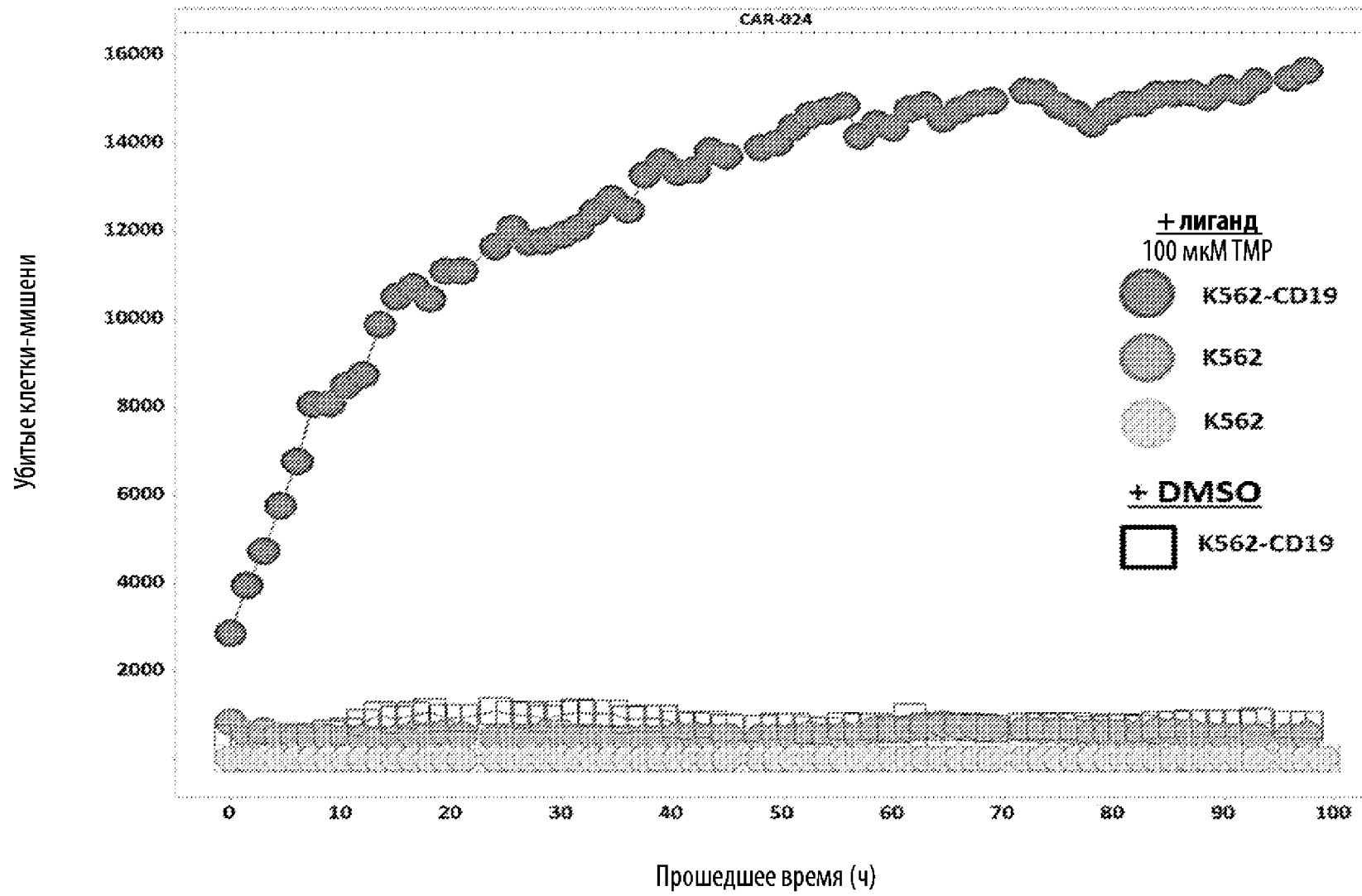


Фиг. 30А

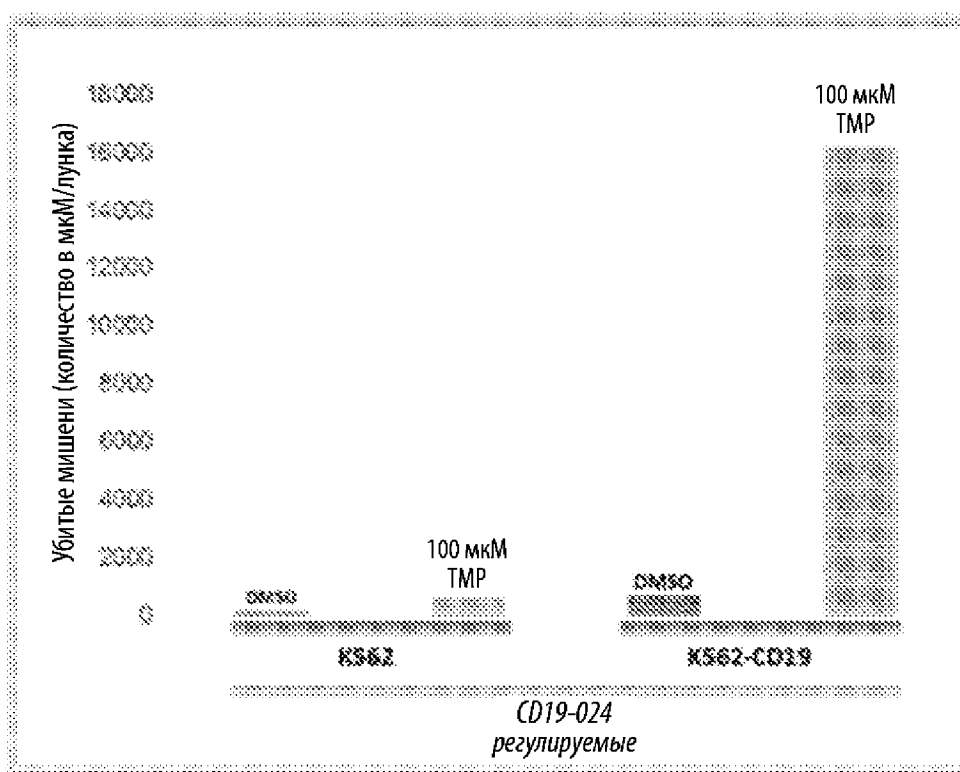
CD19 экспрессирующие клетки



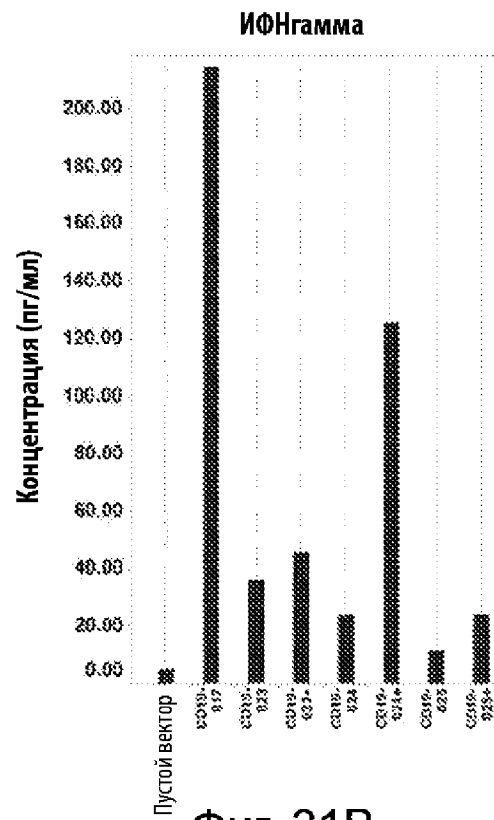
Фиг. 30В



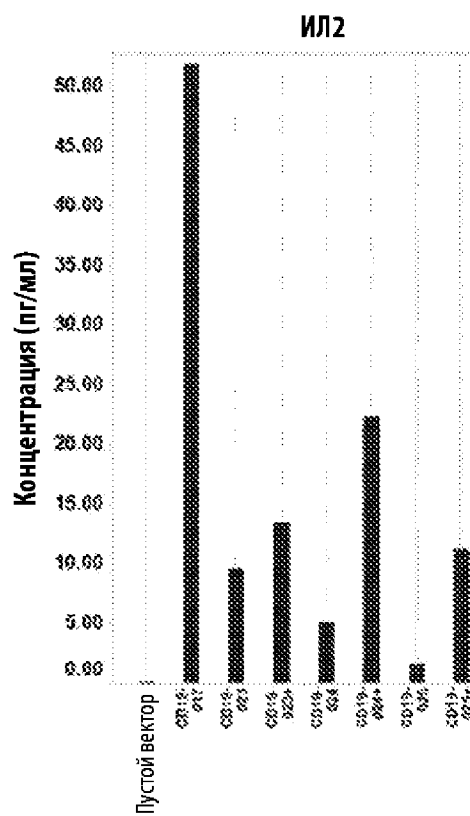
Фиг. 30С



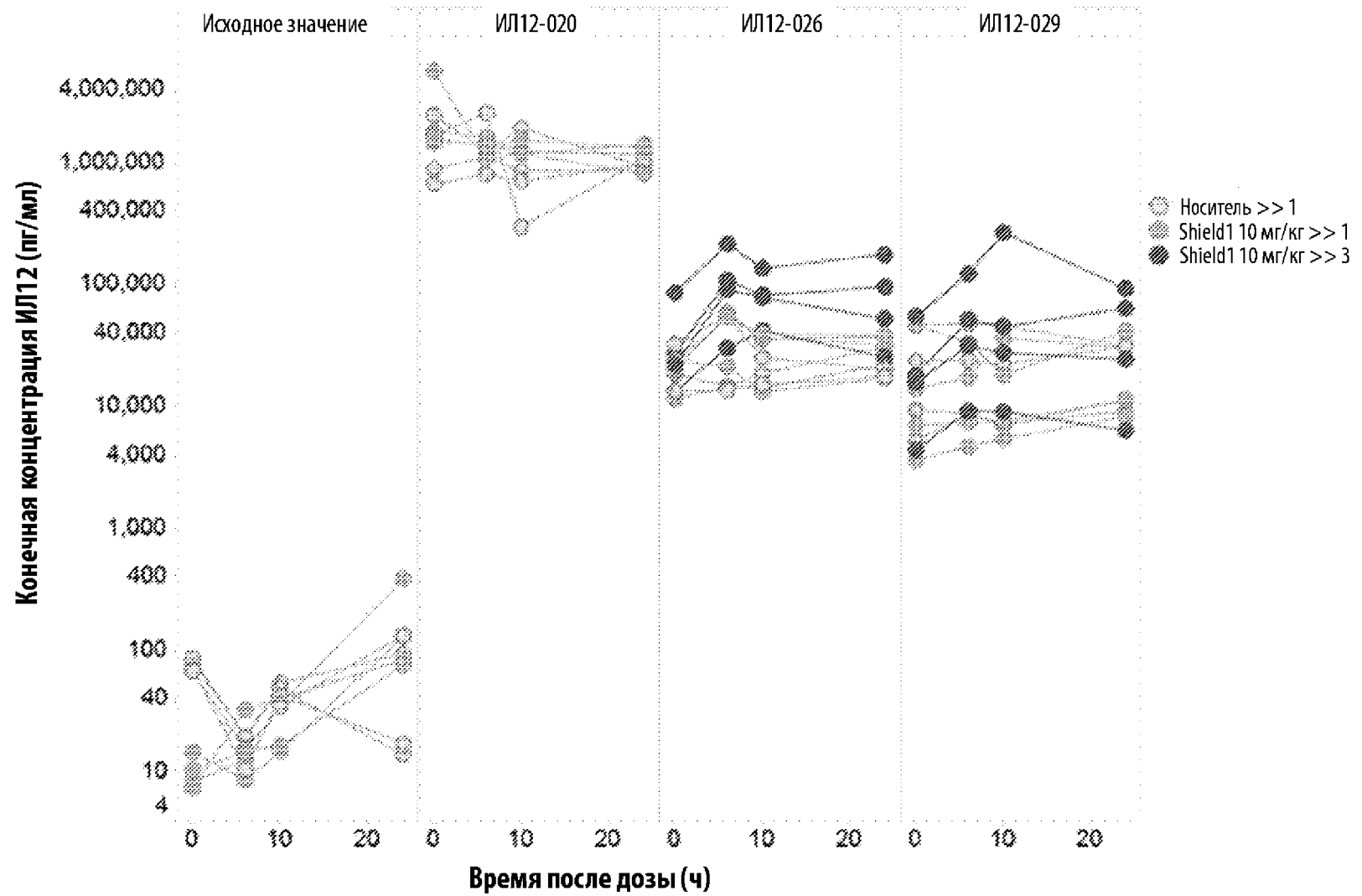
Фиг. 31А



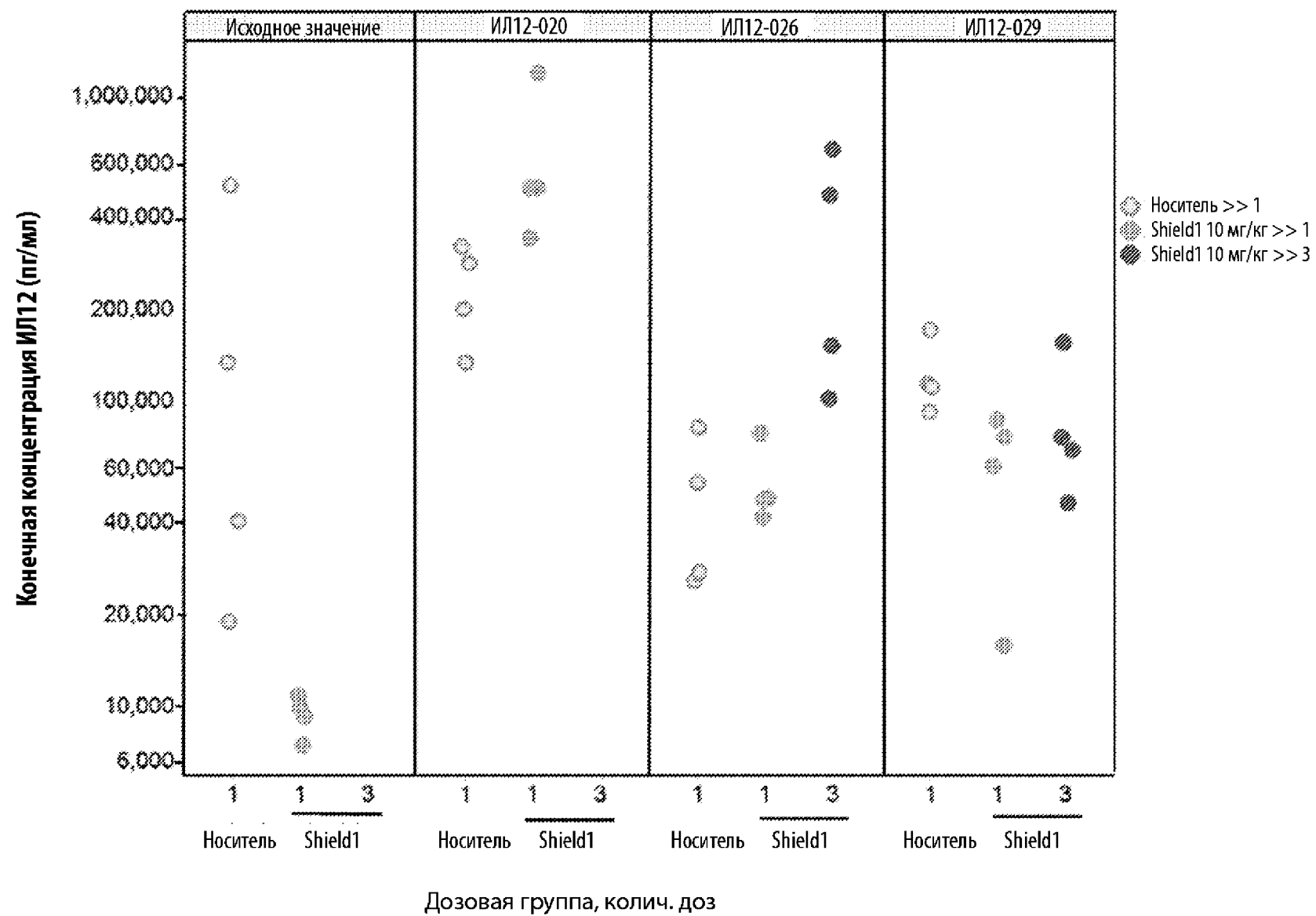
Фиг. 31В



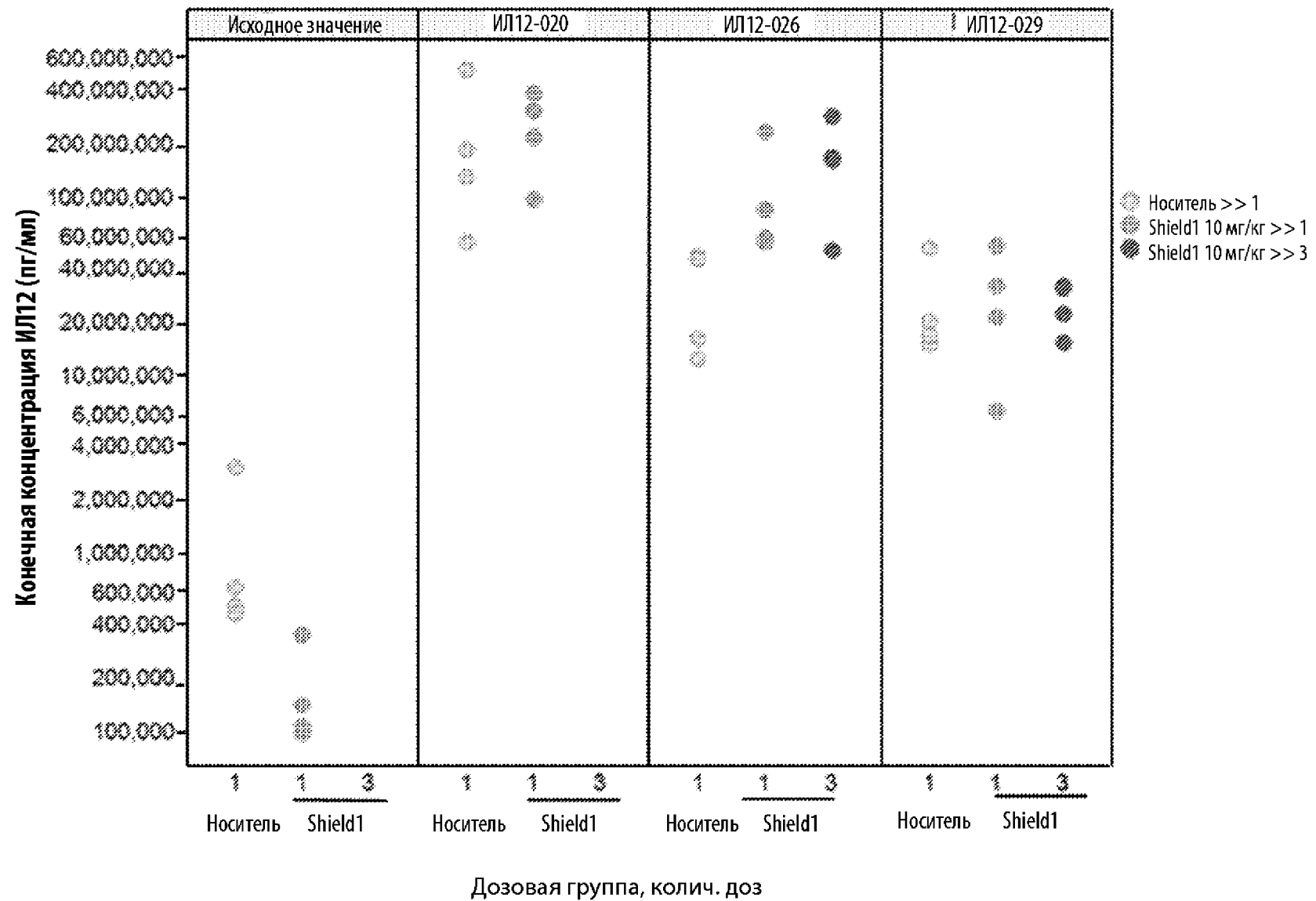
Фиг. 32А



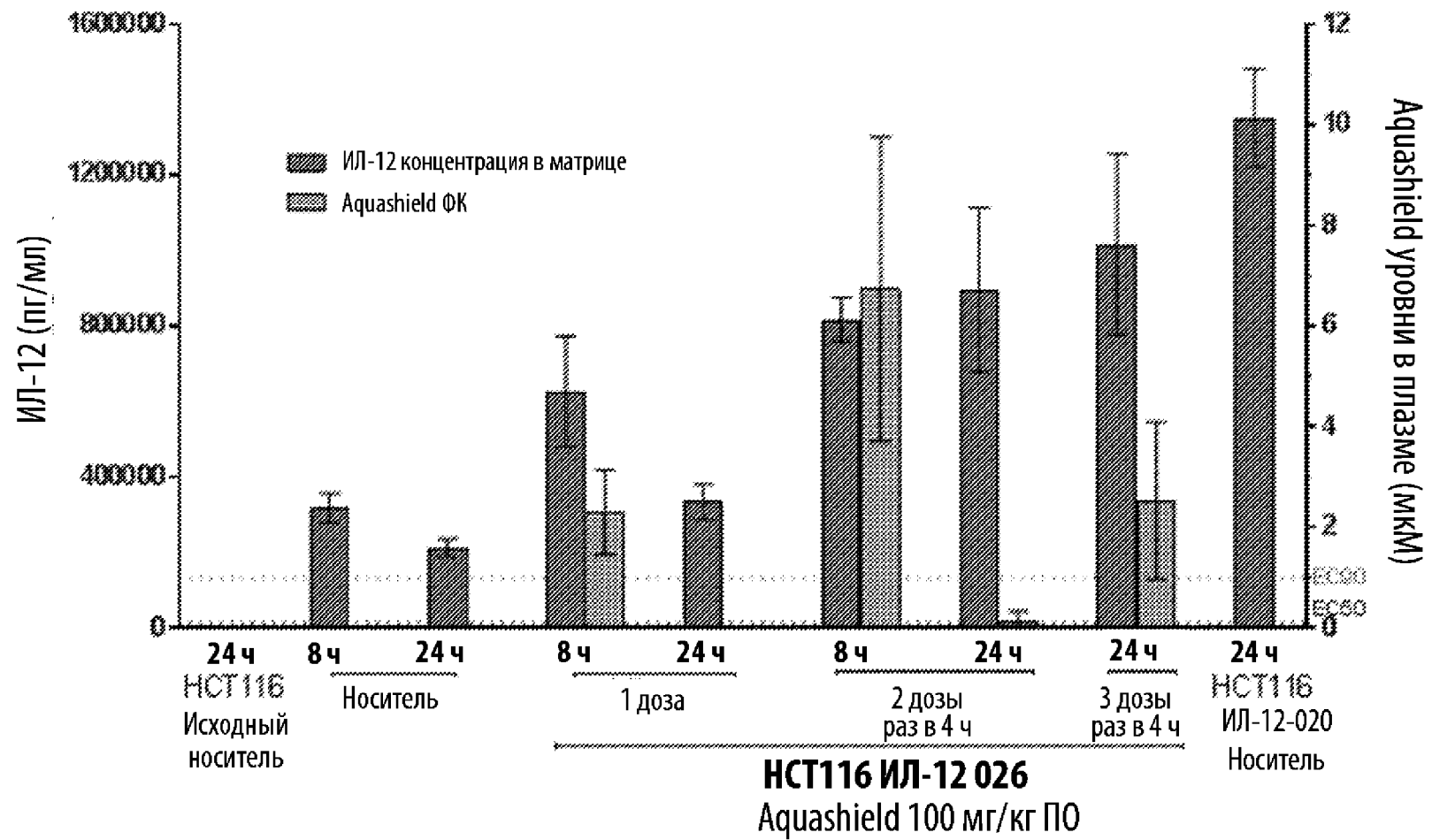
Фиг. 32В



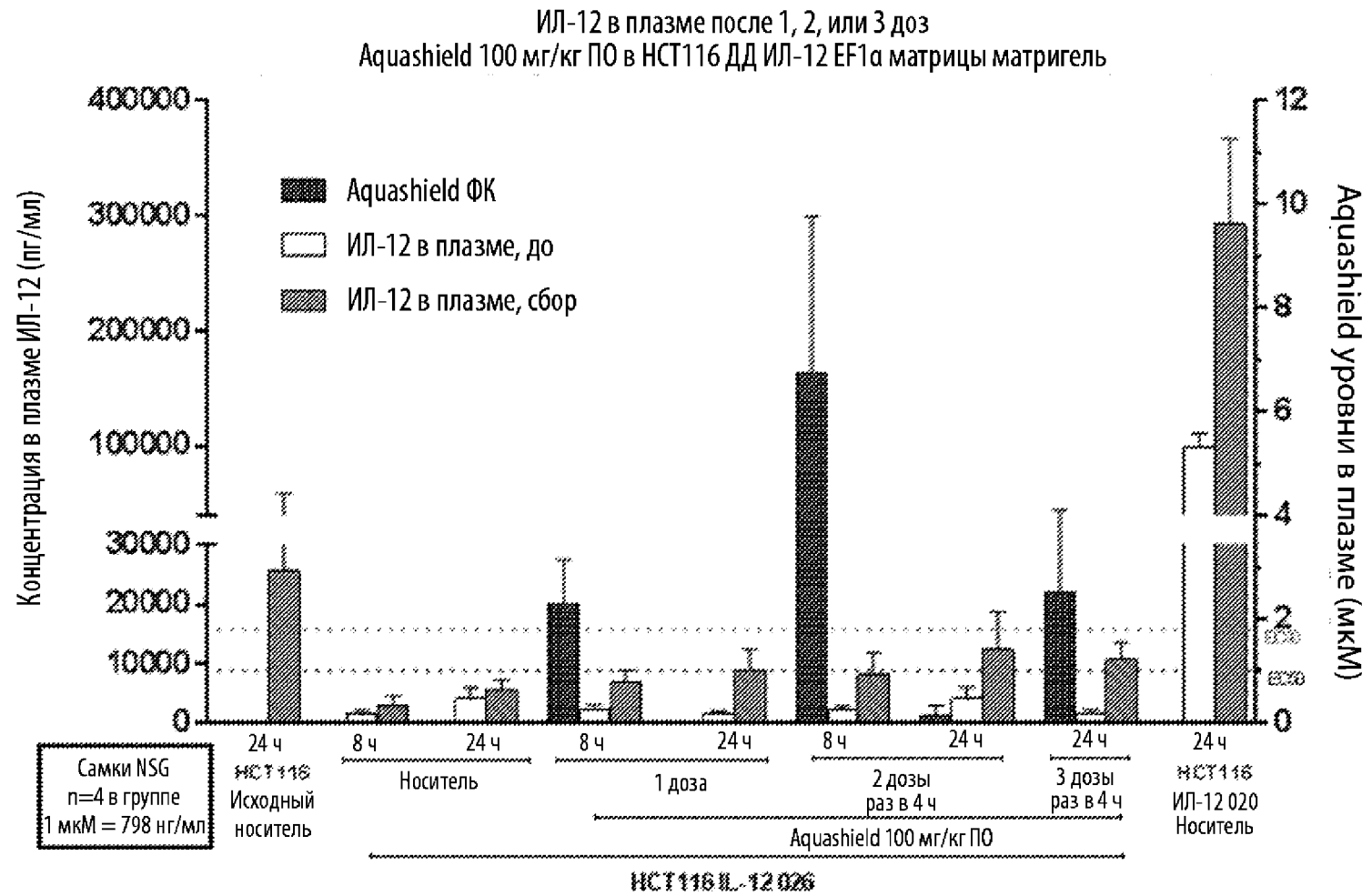
Фиг. 32С



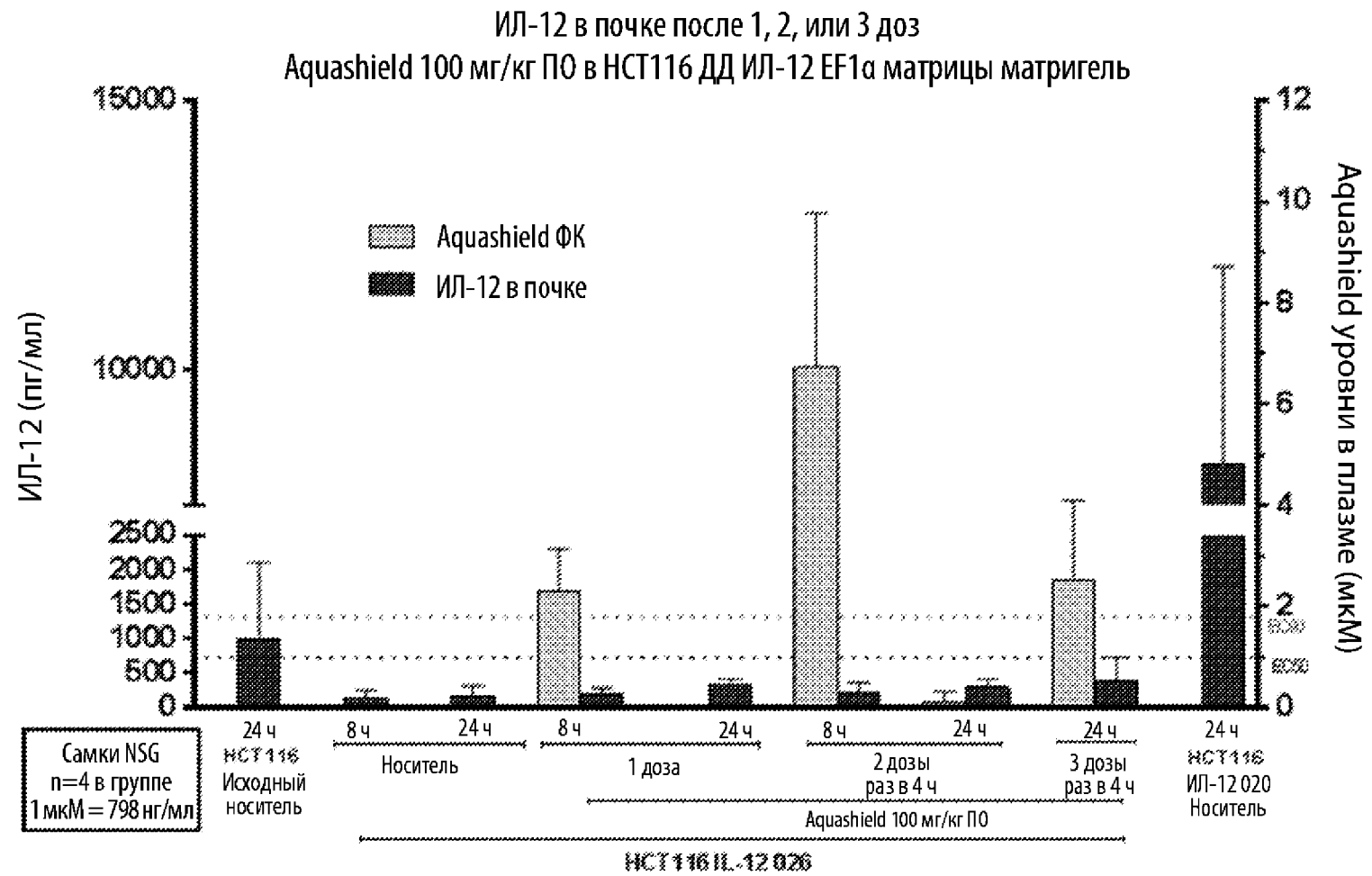
Фиг. 33А



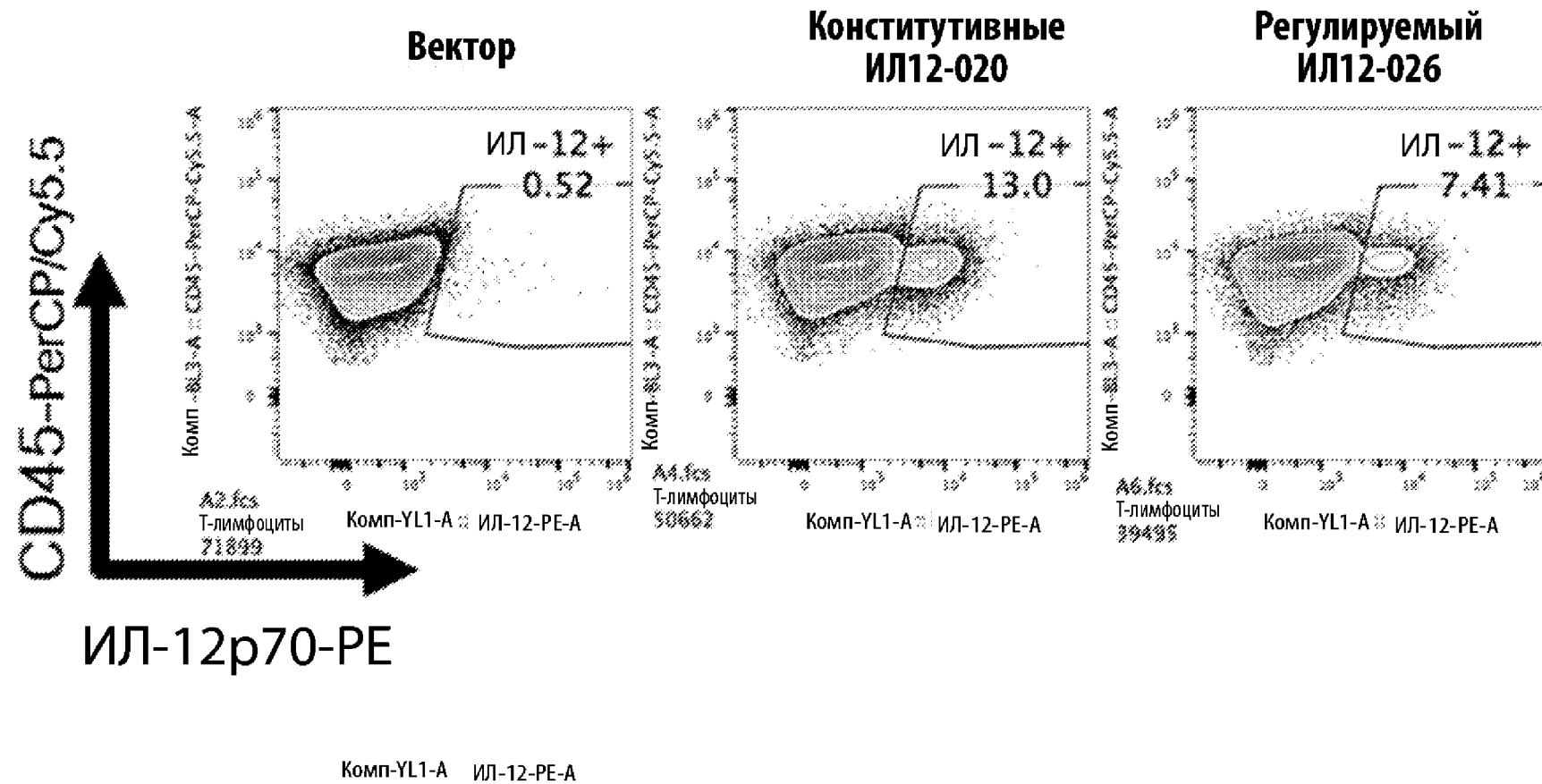
Фиг. 33В



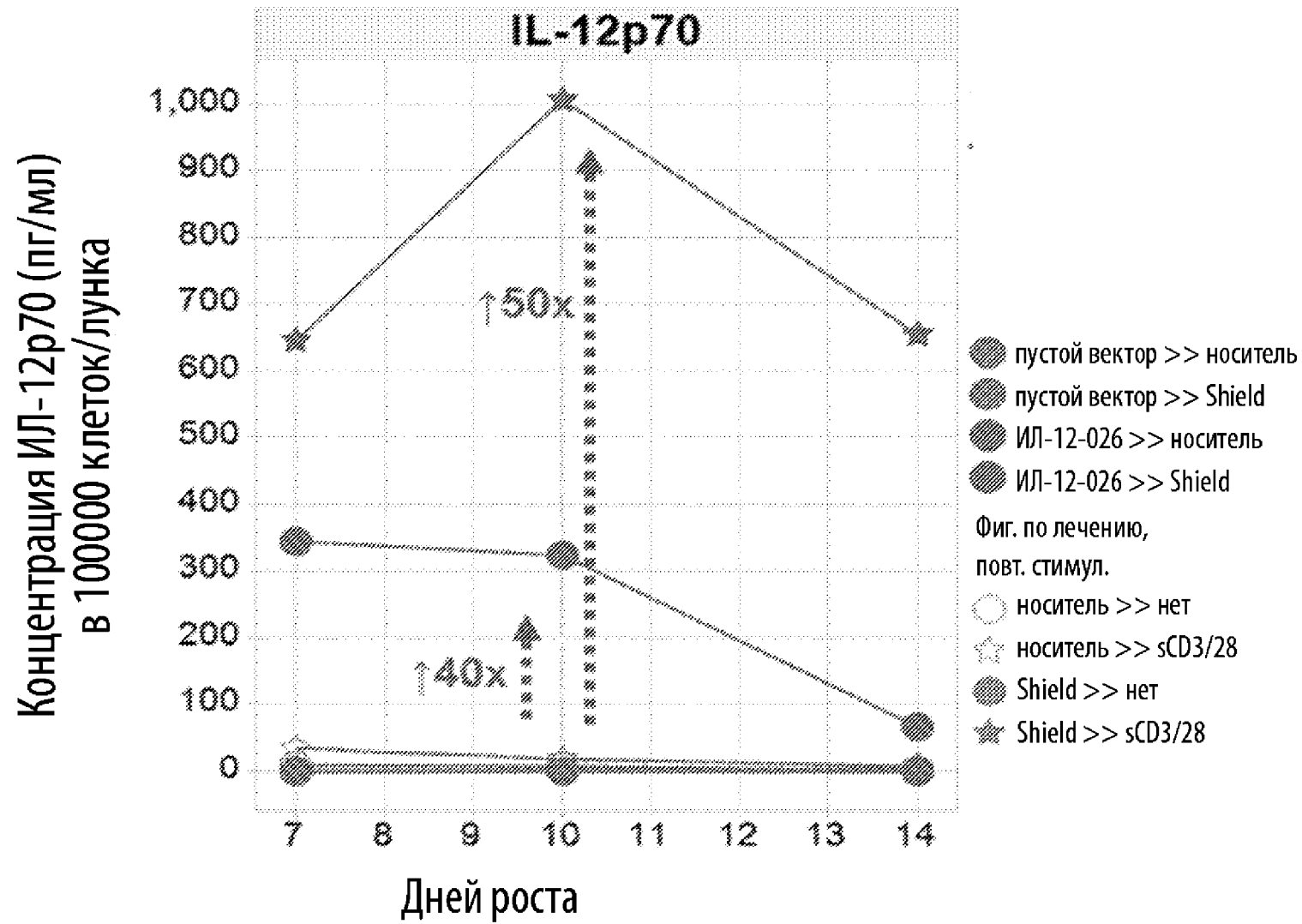
Фиг. 33С



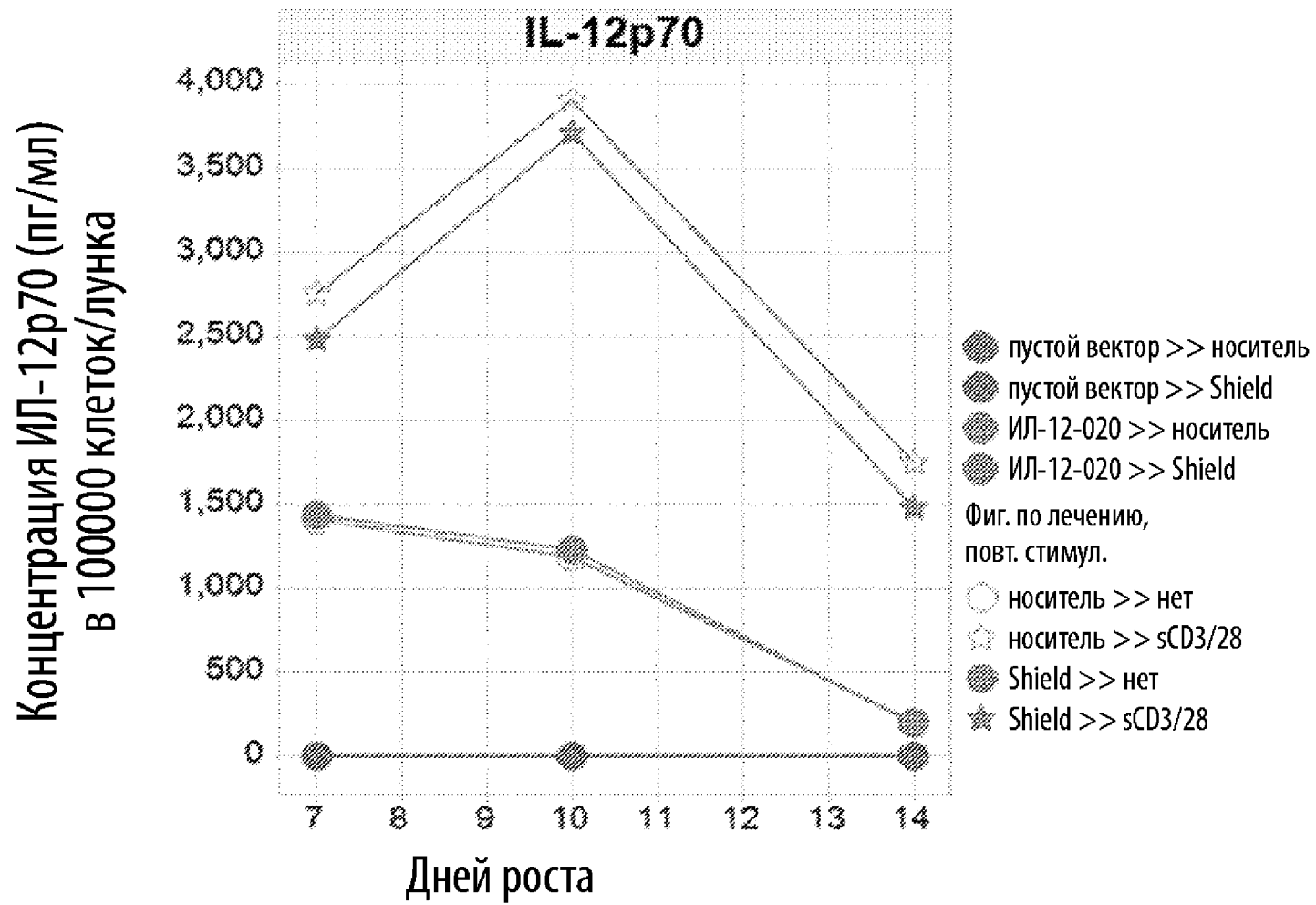
Фиг. 34А



Фиг. 34В

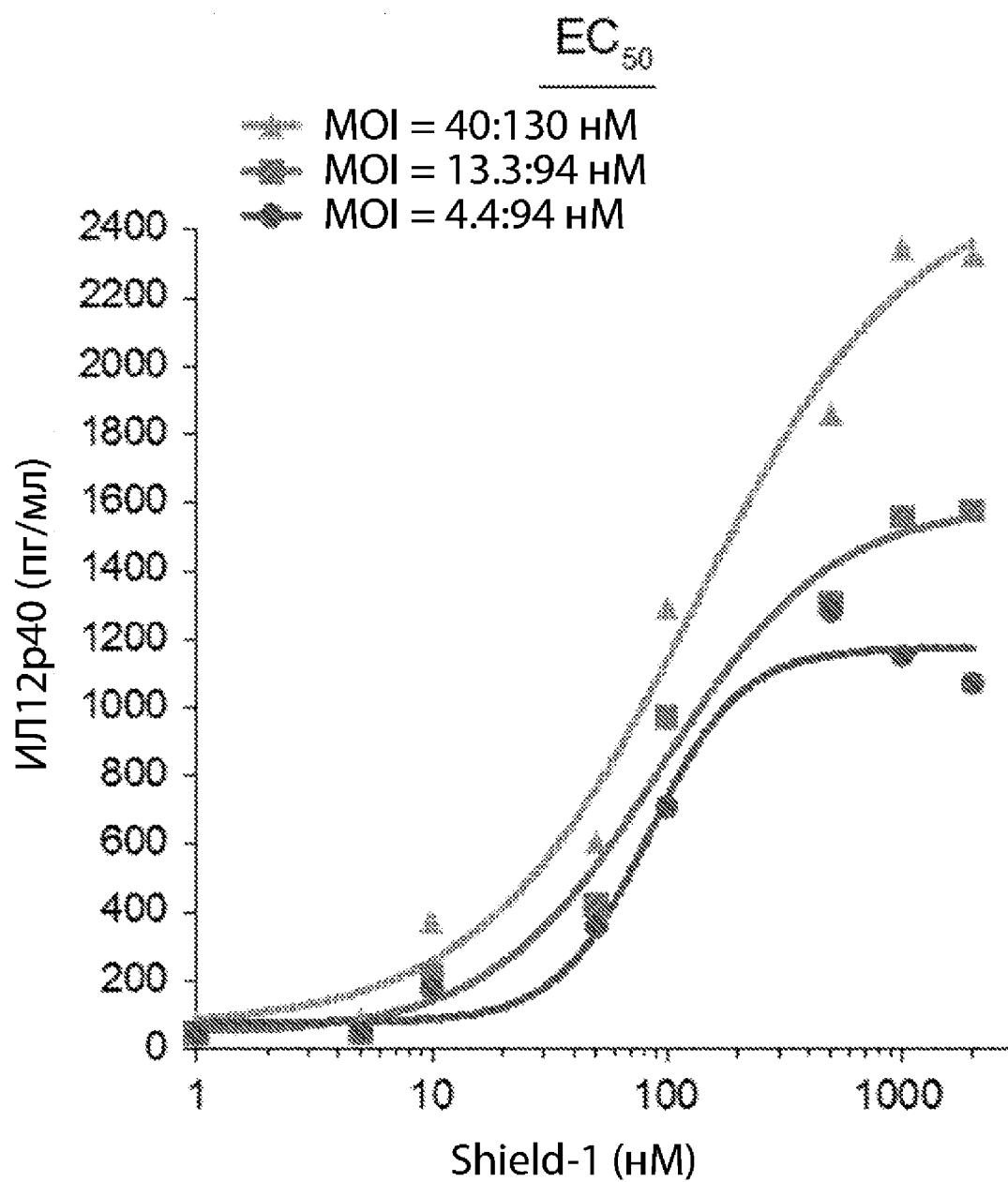


Фиг. 34С



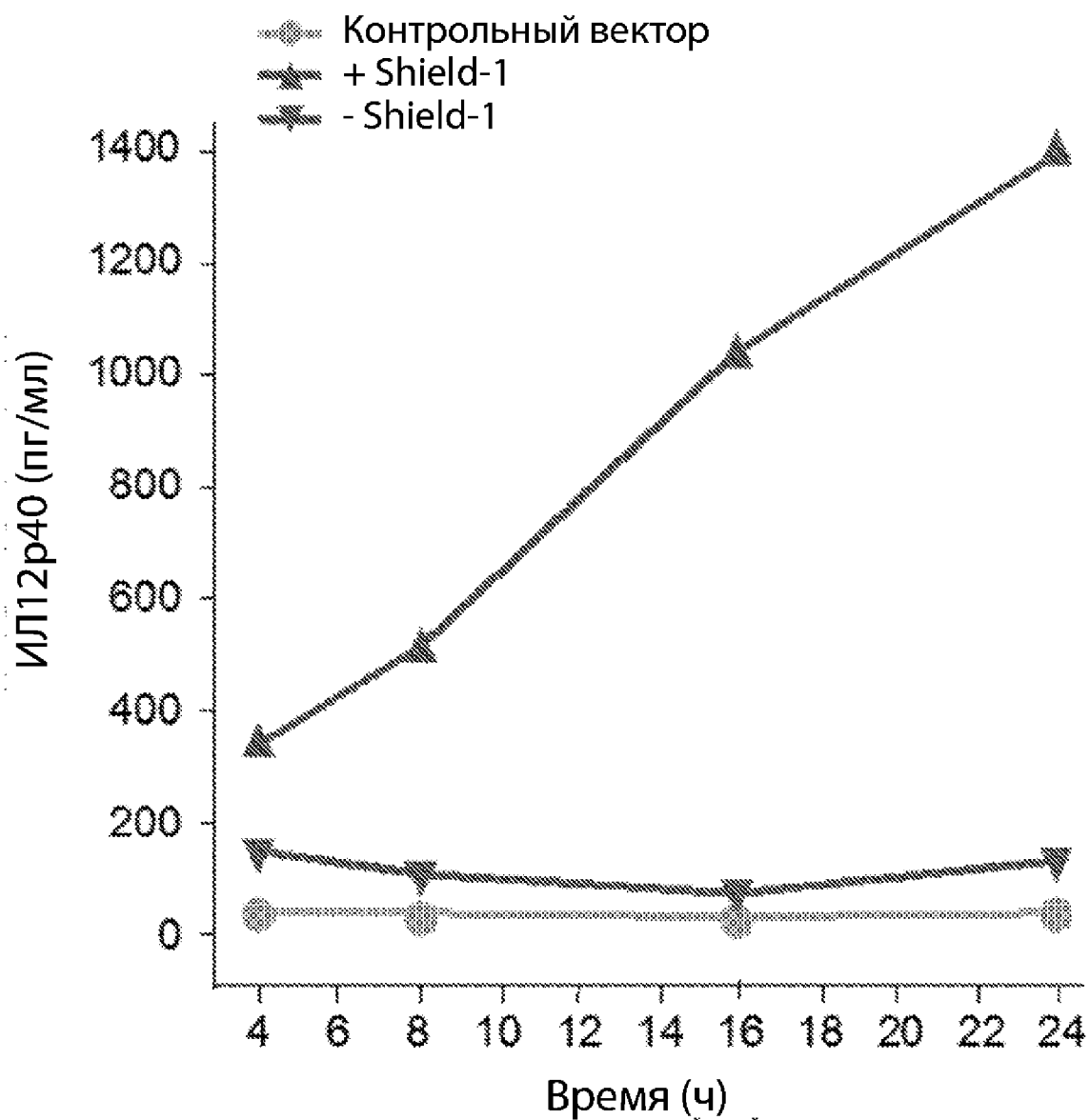
Фиг. 35А

**Зависимая от концентрации индукция
секреции ИЛ12 из первичных
Т-лимфоцитов человека**

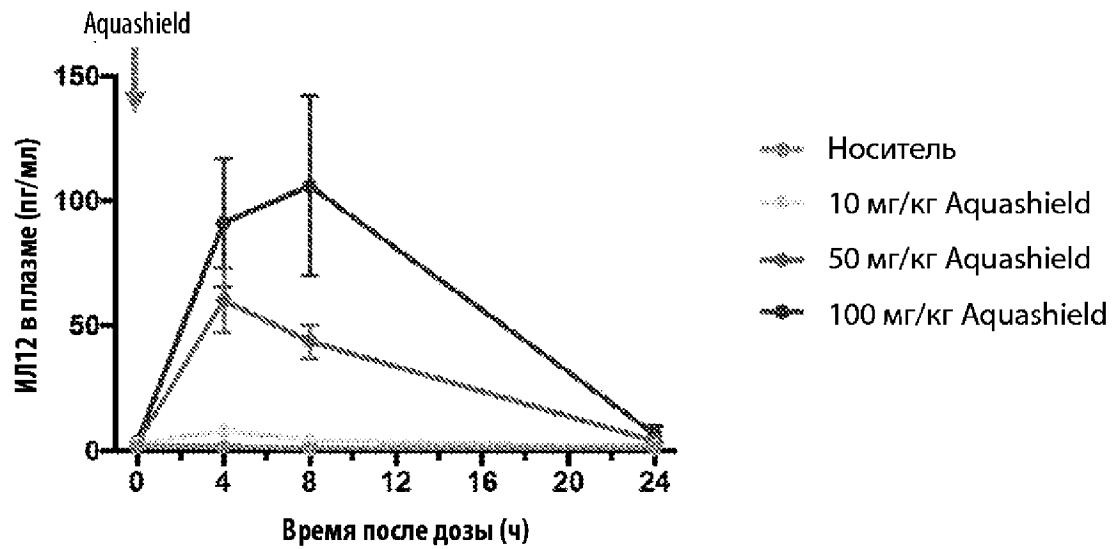


Фиг. 35В

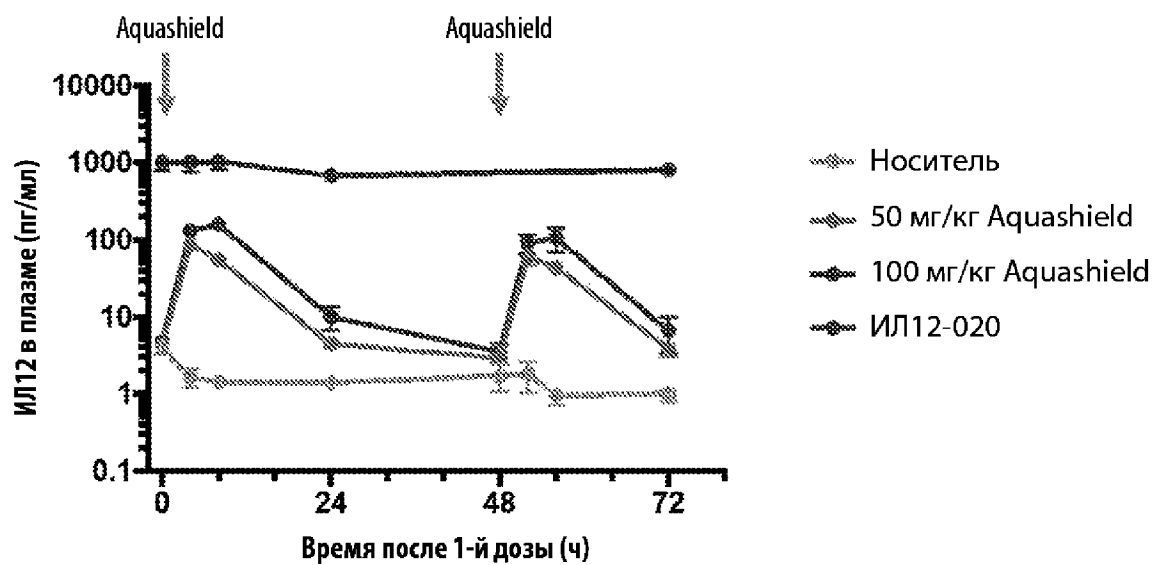
**Зависимость от времени индукции секреции
ИЛ12 из первичных Т-лимфоцитов
человека**



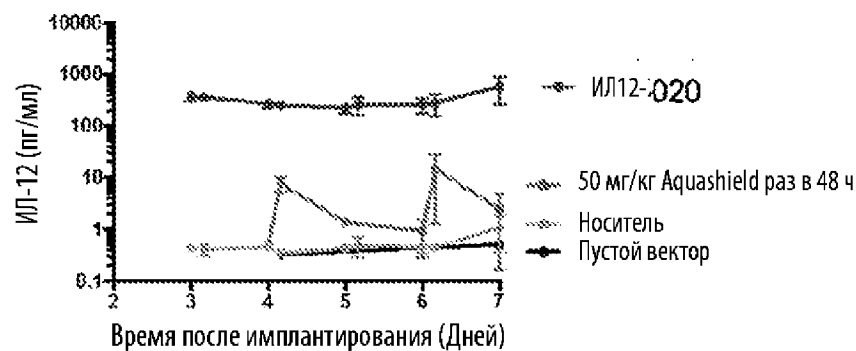
Фиг. 36А



Фиг. 36В



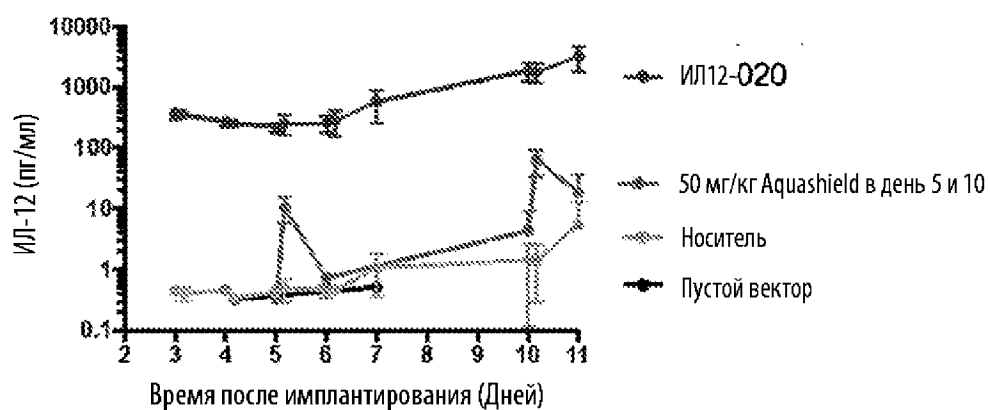
Фиг. 37А



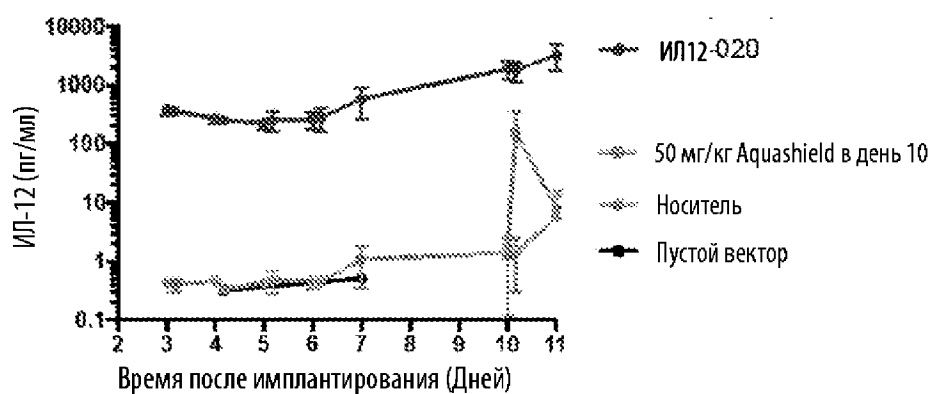
Фиг. 37В



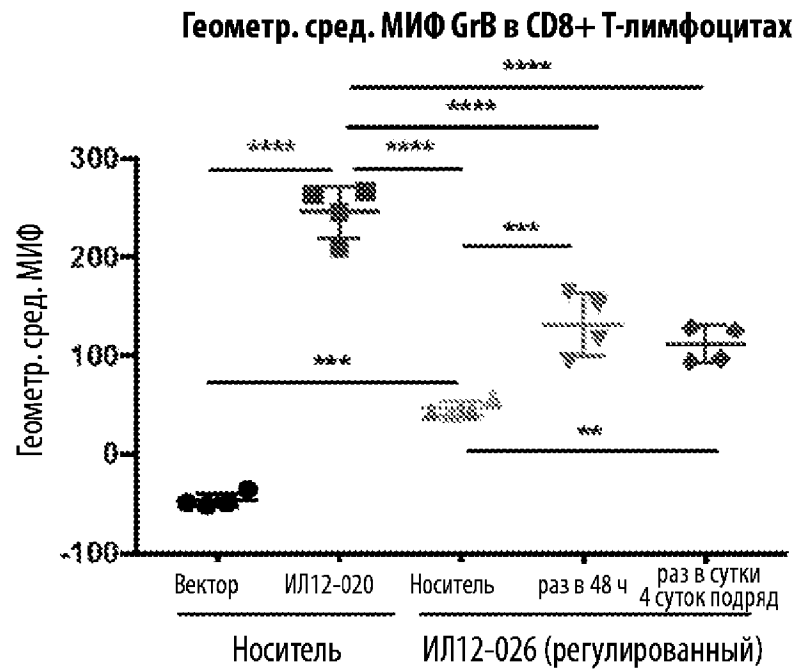
Фиг. 37С



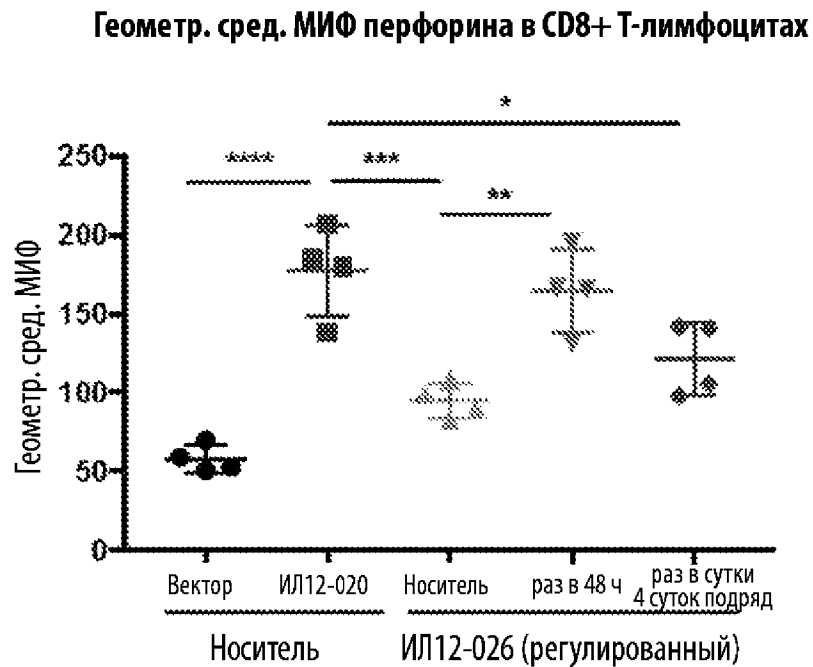
Фиг. 37D



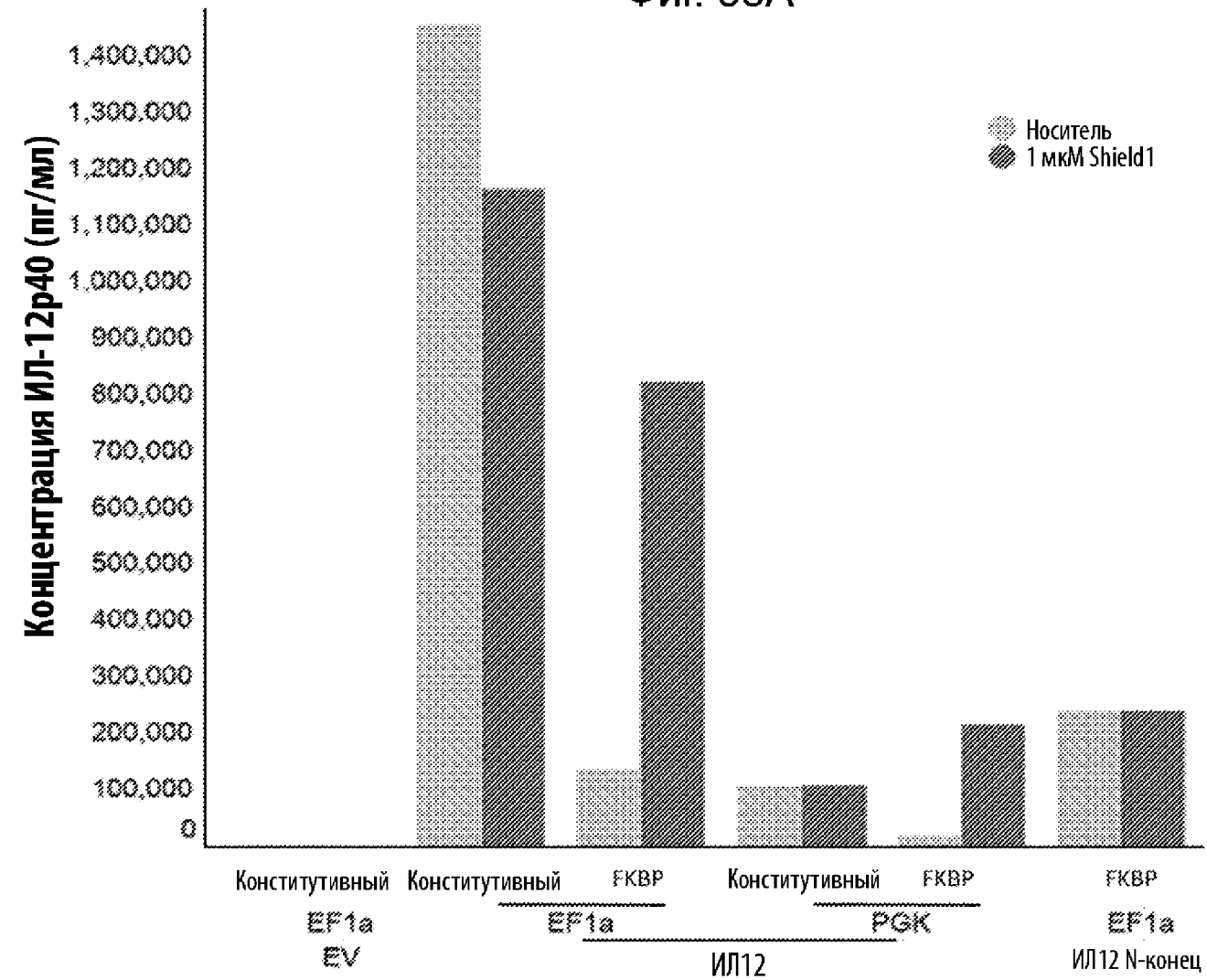
Фиг. 37Е

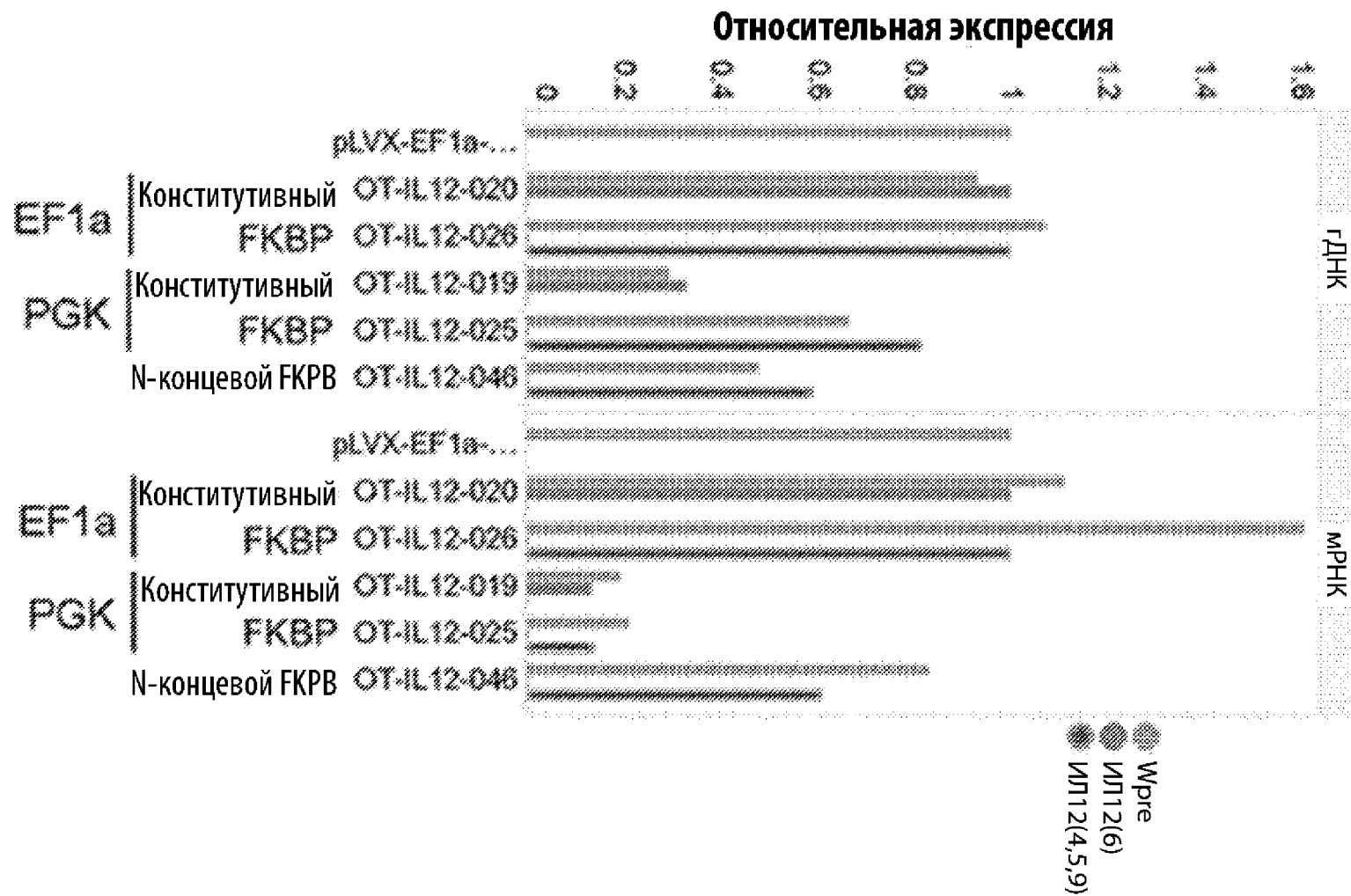


Фиг. 37F



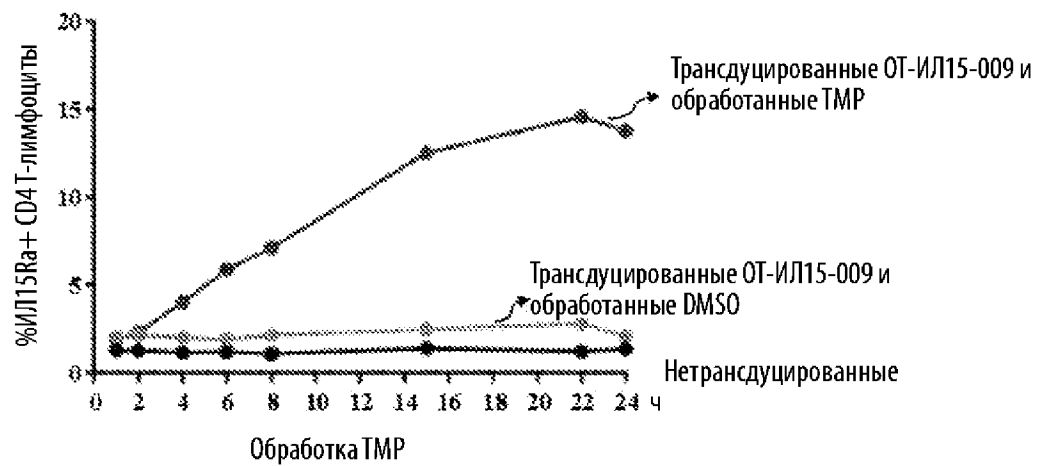
Фиг. 38А





Фиг. 38В

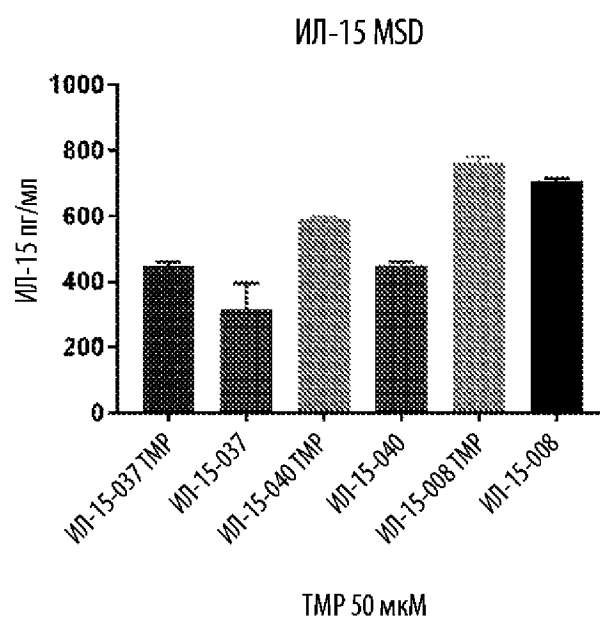
Фиг. 39



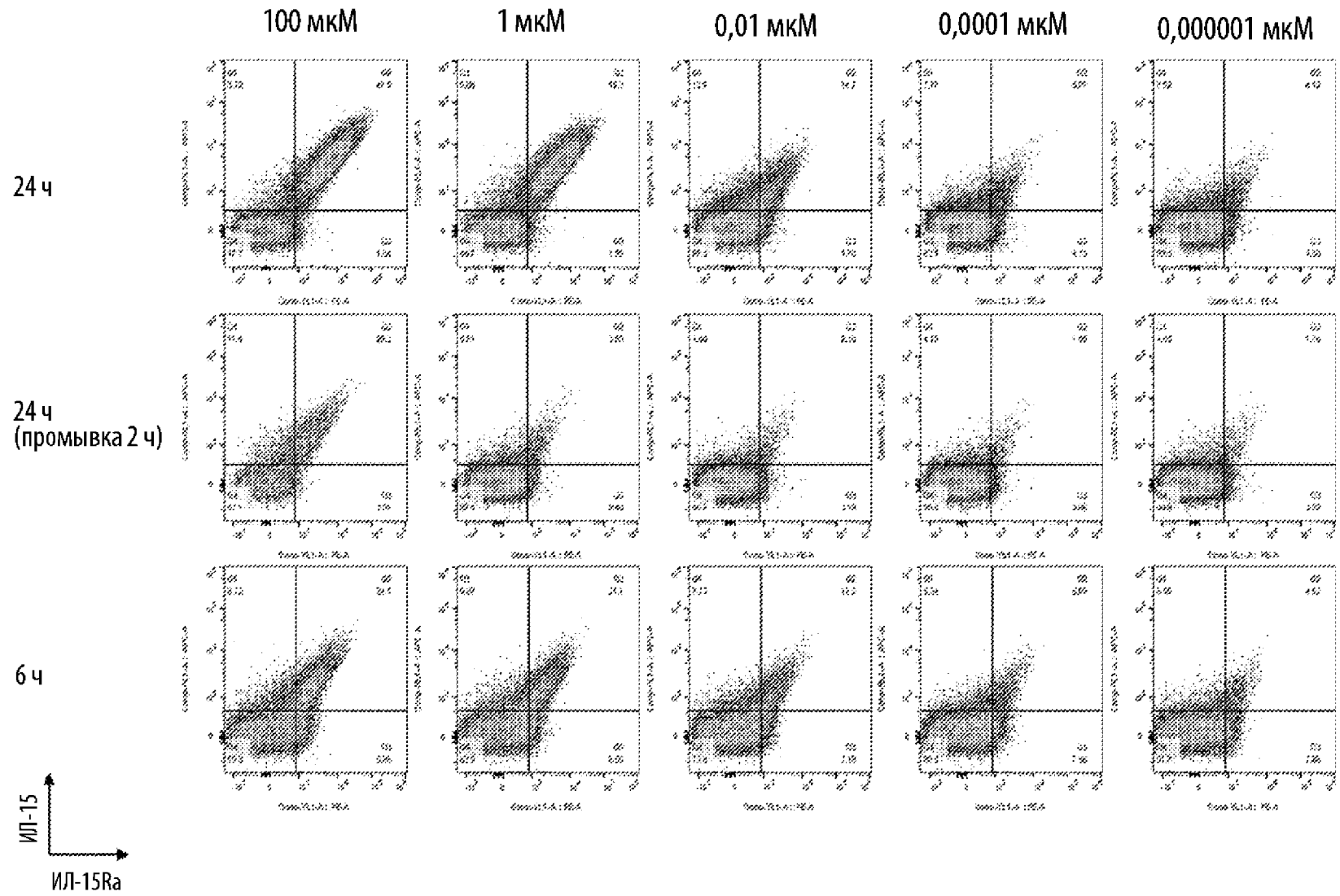
Фиг. 40



Фиг. 41

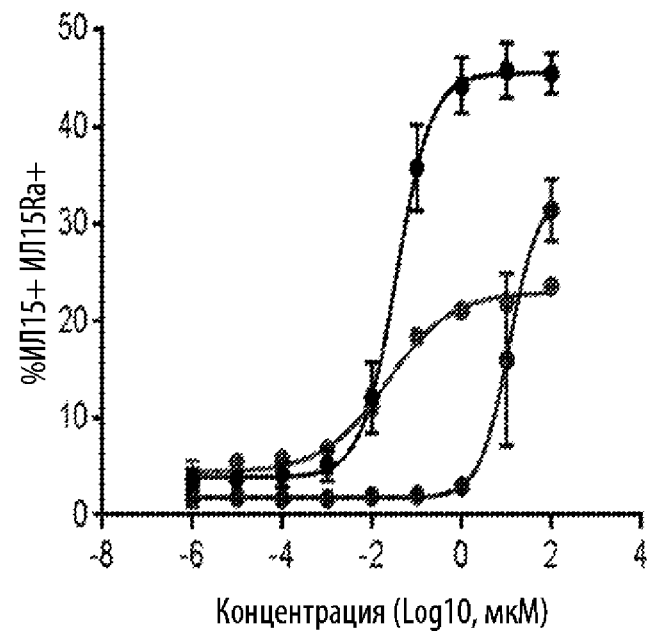


Фиг. 42А

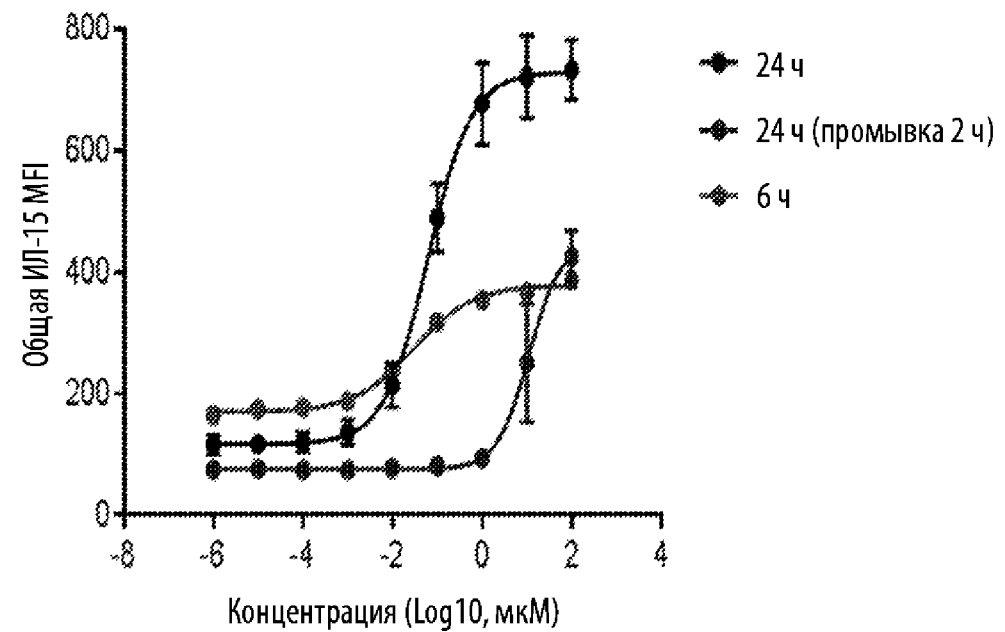


Фиг. 42В

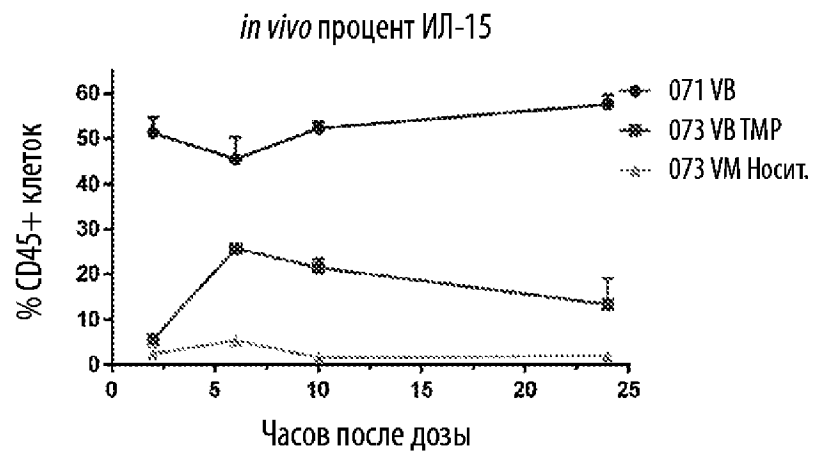
% клеток, экспрессирующих mbIL-15



Уровень экспрессии mbIL-15



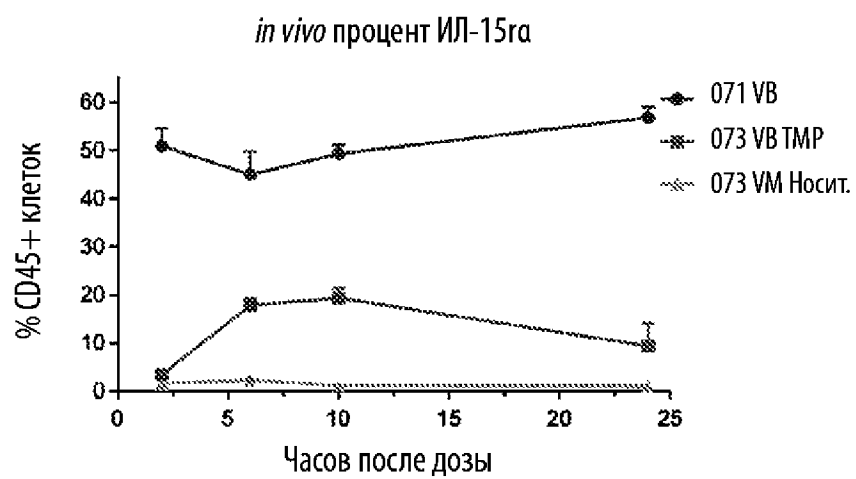
Фиг. 43А



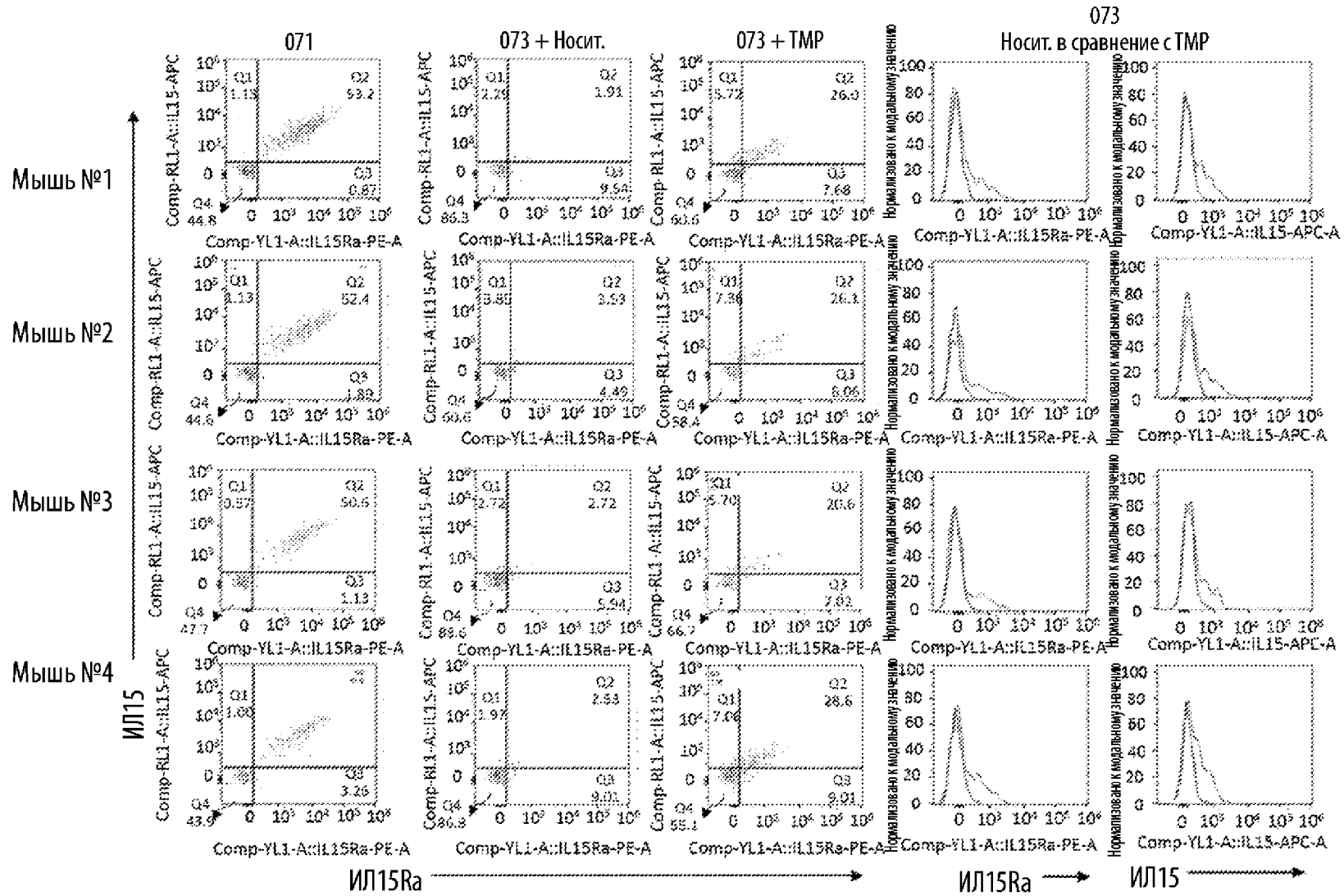
Фиг. 43В



Фиг. 43С



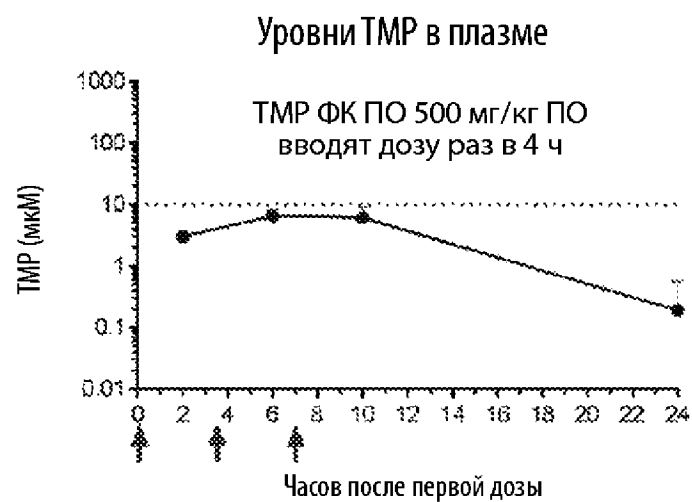
Фиг. 43D



Фиг. 43Е



Фиг. 43F



Фиг. 44

