

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202092093

(13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.06.28

(51) Int. Cl. *A61K 35/12* (2015.01)  
*A61K 35/17* (2015.01)  
*A61K 35/26* (2015.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)  
*A61P 31/00* (2006.01)  
*A61P 31/12* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.03.08

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ TCR С ПРИМЕНЕНИЕМ СЛИТЫХ БЕЛКОВ

(31) 62/641,159  
(32) 2018.03.09  
(33) US  
(86) PCT/US2019/021315  
(87) WO 2019/173693 2019.09.12  
(71) Заявитель:  
ТСР2 ТЕРАПЬЮТИКС ИНК. (US)

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

(72) Изобретатель:  
Баеурле Патрик Александр,  
Хоффмейстер Роберт, Геттс Дэниэл,  
Кнеффер-Куон Филипп, Донахи  
Джули (US)

(57) В настоящем документе предложены рекомбинантные нуклеиновые кислоты, кодирующие слитые белки (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR) и константный домен TCR, модифицированные Т-клетки, экспрессирующие кодируемые молекулы, и способы их применения для лечения заболеваний, включая рак.

100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

202092093 A1

A1 202092093

## **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ TCR С ПРИМЕНЕНИЕМ СЛИТЫХ БЕЛКОВ**

### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА**

**[0001]** Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/641159, поданной 9 марта 2018 г., которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0002]** Большинство пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями или солидными опухолями на поздних стадиях не поддаются лечению с помощью стандартной терапии. Кроме того, традиционные методы лечения часто имеют серьезные побочные эффекты. Были предприняты многочисленные попытки с целью задействовать иммунную систему пациента для отторжения раковых клеток — такой подход коллективно именуется иммунотерапией рака. Однако из-за некоторых препятствий достижение клинической эффективности становится достаточно трудным. Несмотря на то, что были выявлены сотни так называемых опухолевых антигенов, они часто являются своими и поэтому могут направить действие иммунотерапии рака против здоровых тканей, или же они являются слабо иммуногенными. Более того, раковые клетки используют множество механизмов для того, чтобы стать невидимыми или враждебными к инициации и распространению иммунной атаки при иммунотерапии рака.

**[0003]** Недавние разработки, которые используют терапию на основе аутологических Т-клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами (CAR), которая основывается на перенаправлении генетически сконструированных Т-клеток к подходящей молекуле клеточной поверхности на раковых клетках, демонстрируют обещающие результаты с точки зрения использования возможностей иммунной системы для лечения В-клеточных злокачественных опухолей (см., например, Sadelain et al., *Cancer Discovery* 3:388-398 (2013)). Клинические результаты для CAR-Т-клеток, специфических к CD19 (которые называются CTL019), продемонстрировали полную ремиссию у пациентов, страдающих от хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), а также у детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) (см., например, Kalos et al., *Sci Transl Med* 3:95ra73 (2011), Porter et al., *NEJM* 365:725-733 (2011), Grupp et al., *NEJM* 368:1509-1518 (2013)). Альтернативный подход заключается в использовании альфа и бета цепей Т-клеточного рецептора (TCR), выбранных для ассоциированного с опухолью пептидного антигена для генетически сконструированных аутологических Т-клеток. Такие цепи TCR будут образовывать полные комплексы TCR и обеспечивать Т-клетки TCR для второй

определенной специфичности. Обнадёживающие результаты были получены для сконструированных аутологических Т-клеток, экспрессирующих альфа и бета цепи TCR, специфические к NY-ESO-1, у пациентов с синовиальной карциномой.

**[0004]** Помимо способности генетически модифицированных Т-клеток, экспрессирующих CAR или второй TCR, распознавать и уничтожать соответствующие клетки-мишени *in vitro* / *ex vivo*, успешная терапия для пациента с использованием сконструированных Т-клеток может требовать, чтобы Т-клетки были способны к сильной активации, размножению, стойкости с течением времени и, в случае рецидива болезни, к обеспечению вторичного иммунного ответа. Высокая и контролируемая клиническая эффективность CAR-Т-клеток на текущий момент ограничена и CD-19-положительными В-клеточными злокачественными опухолями и пациентами, экспрессирующими HLA-A2, с экспрессирующими NY-ESO-1-пептид синовиальными саркомами.

### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0005]** Существует очевидная потребность в улучшении генетически сконструированных Т-клеток для более широкого действия против различных злокачественных опухолей у человека.

**[0006]** В настоящем документе описаны модифицированные Т-клетки, содержащие слитые белки субъединиц TCR, включая CD3 эпсилон-, CD3 гамма-, CD3 дельта-цепи, гамма, дельта, альфа и бета цепи TCR со связывающими доменами, специфичными к антигенам клеточной поверхности, которые могут потенциально преодолеть ограничения существующих подходов. Кроме того, эти модифицированные Т-клетки могут иметь функциональное нарушение эндогенного TCR (например, TCR альфа, бета или обоих). Эти модифицированные Т-клетки могут обладать способностью уничтожать клетки-мишени более эффективно, чем CAR, но высвобождать сопоставимые или более низкие уровни провоспалительных цитокинов. Эти модифицированные Т-клетки и способы их использования могут представлять преимущество для этих клеток по сравнению с CAR, поскольку повышенные уровни таких цитокинов связаны с дозолимитирующей токсичностью адоптивной CAR-Т терапии.

**[0007]** В данном документе предложены модифицированные Т-клетки, содержащие слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR) и константный домен TCR, способы получения модифицированных Т-клеток и способы их применения для лечения заболеваний.

**[0008]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыта рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержащая (а) последовательность, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий (i) субъединицу TCR,

содержащую (1) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, (2) трансмембранный домен, и (3) внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, TCR гамма, TCR дельта, TCR альфа или TCR бета, и (ii) человеческое или гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающий домен; и (b) последовательность, кодирующую константный домен TCR, где константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа, константный домен TCR бета, константный домен TCR альфа и константный домен TCR бета, константный домен TCR гамма, константный домен TCR дельта, или константный домен TCR гамма и константный домен TCR дельта; причем субъединица TCR и антитело функционально связаны, и при этом TFP функционально внедряется в комплекс TCR при экспрессии в Т-клетке.

**[0009]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыта рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержащая (a) последовательность, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий (i) субъединицу TCR, содержащую (1) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, (2) трансмембранный домен, и (3) внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, TCR альфа или TCR бета, и (ii) связывающий лиганд или его фрагмент, который способен связываться с антителом или его фрагментом; и (b) последовательность, кодирующую константный домен TCR, где константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа, константный домен TCR бета или константный домен TCR альфа и константный домен TCR бета, причем субъединица TCR и связывающий лиганд или его фрагмент функционально связаны, и где TFP функционально внедряется в комплекс TCR при экспрессии в Т-клетке, что приводит к функциональному нарушению эндогенного TCR. В некоторых случаях связывающий лиганд способен связывать Fc-домен антитела. В некоторых случаях связывающий лиганд способен селективно связывать антитело IgG1. В некоторых случаях связывающий лиганд способен специфически связывать антитело IgG1. В некоторых случаях антитело или его фрагмент связывается с антигеном клеточной поверхности. В некоторых случаях антитело или его фрагмент связывается с антигеном клеточной поверхности на поверхности опухолевой клетки. В некоторых случаях связывающий лиганд включает мономер, димер, тример, тетрамер, пентамер, гексамер, гептамер, октомер, нонамер или декамер. В некоторых случаях связывающий лиганд не включает антитело или его фрагмент. В некоторых случаях связывающий лиганд включает полипептид CD 16 или его фрагмент. В некоторых случаях связывающий лиганд содержит CD 16-связывающий полипептид. В некоторых случаях связывающий лиганд является



человеческим или гуманизированным. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его фрагмент, способные связываться связывающим лигандом. В некоторых случаях антитело или его фрагмент могут секретироваться из клетки.

**[0010]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыта рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержащая (a) последовательность, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий (i) субъединицу TCR, содержащую (1) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, (2) трансмембранный домен, и (3) внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, TCR альфа или TCR бета, и (ii) домен антигена, содержащий лиганд или его фрагмент, который связывается с рецептором или полипептидом, экспрессируемым на поверхности клетки; и (b) последовательность, кодирующую константный домен TCR, где константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа, константный домен TCR бета или константный домен TCR альфа и константный домен TCR бета, причем субъединица TCR и домен антигена функционально связаны, и при этом TFP функционально внедряется в комплекс TCR при экспрессии в Т-клетке, что приводит к функциональному нарушению эндогенного TCR. В некоторых случаях домен антигена включает лиганд. В некоторых случаях лиганд связывается с рецептором клетки. В некоторых случаях лиганд связывается с полипептидом, экспрессируемым на поверхности клетки. В некоторых случаях рецептор или полипептид, экспрессируемый на поверхности клетки, включает рецептор или полипептид стрессовой реакции. В некоторых случаях рецептор или полипептид, экспрессируемый на поверхности клетки, представляет собой гликопротеин, родственник МНС класса I. В некоторых случаях гликопротеин, родственник МНС класса I, выбран из группы, состоящей из MICA, MICB, RAET1E, RAET1G, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4 и их комбинаций. В некоторых случаях домен антигена включает мономер, димер, тример, тетрамер, пентамер, гексамер, гептамер, октомер, нонамер или декамер. В некоторых случаях домен антигена включает мономер или димер лиганда или его фрагмент. В некоторых случаях лиганд или его фрагмент представляет собой мономер, димер, тример, тетрамер, пентамер, гексамер, гептамер, октомер, нонамер или декамер. В некоторых случаях лиганд или его фрагмент представляет собой мономер или димер. В некоторых случаях домен антигена не включает антитело или его фрагмент. В некоторых случаях домен антигена не содержит вариабельную область. В некоторых случаях домен антигена не содержит CDR. В некоторых случаях лиганд или его фрагмент представляет собой лиганд группы 2D натуральных киллеров (NKG2D) или его фрагмент.

[0011] В некоторых вариантах осуществления для рекомбинантных нуклеиновых кислот, раскрытых выше, константный домен TCR внедряется в функциональный комплекс TCR при экспрессии в Т-клетке. В некоторых случаях константный домен TCR внедряется в тот же функциональный комплекс TCR, что и функциональный комплекс TCR, в который внедряется TFP при экспрессии в Т-клетке. В некоторых случаях последовательность, кодирующая TFP, и последовательность, кодирующая константный домен TCR, содержатся в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях последовательность, кодирующая TFP, и последовательность, кодирующая константный домен TCR, содержатся в разных молекулах нуклеиновых кислот. В некоторых случаях субъединица TCR и домен антитела, домен антигена или связывающий лиганд или его фрагмент функционально связаны линкерной последовательностью. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит  $(G4S)_n$ , где  $n =$  от 1 до 4. В некоторых случаях трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен TCR из CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, TCR альфа или TCR бета. В некоторых случаях внутриклеточный домен получен только из CD3 эпсилон, только из CD3 гамма, только из CD3 дельта, только из TCR альфа или только из TCR бета. В некоторых случаях субъединица TCR включает (i) по крайней мере часть внеклеточного домена TCR, (ii) трансмембранный домен TCR и (iii) внутриклеточный домен TCR, причем по крайней мере два из (i), (ii) и (iii) относятся к одной и той же субъединице TCR. В некоторых случаях внеклеточный домен TCR включает внеклеточный домен белка или его часть, выбранного из группы, состоящей из альфа цепи TCR, бета цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, его функциональные фрагменты и его аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях субъединица TCR содержит трансмембранный домен, содержащий трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа цепи TCR, бета цепи TCR, гамма цепи TCR, дельта цепи TCR, дзета цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен белка, выбранный из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, или аминокислотную последовательность, имеющую по крайней мере одну модификацию. В некоторых случаях субъединица TCR содержит внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен

белка, выбранный из функционального сигнального домена 4-1BB и/или функционального сигнального домена CD3 дзета, или аминокислотную последовательность, имеющую к тому же по меньшей мере одну модификацию. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую костимулирующий домен. В некоторых случаях костимулирующий домен содержит функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a / CD18), ICOS (CD278), и 4-1BB (CD137), и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях субъединица TCR включает иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (IT AM) субъединицы TCR, который содержит IT AM белка или его часть, выбранного из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, дзета цепи TCR, цепи Fc-эпсилон-рецептора 1, цепи Fc-эпсилон-рецептора 2, цепи Fc-гамма-рецептора 1, цепи Fc-гамма-рецептора 2a, цепи Fc-гамма-рецептора 2b1, цепи Fc-гамма-рецептора 2b2, цепи Fc-гамма-рецептора 3a, цепи Fc-гамма-рецептора 3b, цепи Fc-бета-рецептора 1, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих к тому же по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях ITAM замещает IT AM CD3 гамма, CD3 дельта или CD3 эпсилон. В некоторых случаях IT AM выбран из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта, и замещает другой ITAM, выбранный из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта. В некоторых случаях TFP, константный домен TCR альфа, константный домен TCR бета и любая их комбинация способны функционально взаимодействовать с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR. В некоторых случаях (а) константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа, и TFP функционально интегрируется в комплекс TCR, содержащий эндогенную субъединицу TCR бета, CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта или их комбинацию; (b) константный домен TCR представляет собой константный домен TCR бета, и TFP функционально интегрируется в комплекс TCR, содержащий эндогенную субъединицу TCR альфа, CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта или их комбинацию; или (с) константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа и константный домен TCR бета, и TFP функционально интегрируется в комплекс TCR, содержащий эндогенную субъединицу CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3

дельта или их комбинацию. В некоторых случаях по меньшей мере одна, но не более 20 модификаций содержат модификацию аминокислоты, которая опосредует клеточную сигнализацию, или модификацию аминокислоты, которая фосфорилируется в ответ на связывание лиганда с TFP. В некоторых случаях человеческое или гуманизованное антитело представляет собой фрагмент антитела. В некоторых случаях фрагмент антитела представляет собой scFv, домен однодоменного антитела, домен V<sub>H</sub> или домен V<sub>L</sub>. В некоторых случаях человеческое или гуманизованное антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, выбранное из группы, состоящей из связывающего домена против CD 19, связывающего домена против антигена созревания В-клеток (BCMA), связывающего домена против мезотелина (MSLN), связывающего домена против IL13Ra2, связывающего домена против MUC16, связывающего домена против CD22, связывающего домена против PD-1, связывающего домена против рецептора BAFF или BAFF, и связывающего домена против ROR-1. В некоторых случаях нуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из ДНК и РНК. В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой мРНК. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота включает аналог нуклеиновой кислоты, где аналог нуклеиновой кислоты не входит в кодирующую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях нуклеиновый аналог выбран из группы, состоящей из 2'-О-метила, 2'-О-метоксиэтила (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропила, 2'-дезоксидезокси-2'-фтор, 2'-О-аминопропила (2'-О-АП), 2'-О-диметиламиноэтила (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропила (2'-О-DMAP), Т-О-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-О-DMAEOE), модифицированного 2'-О-N-метилацетида (2'-О-NMA), закрытой нуклеиновой кислоты (ЗНК), этиленнуклеиновой кислоты (ЭНК), пептидо-нуклеиновой кислоты (ПНК), ангидрогекситоловой нуклеиновой кислоты (АНК), морфолино, метилфосфонатного нуклеотида, тиолфосфонатного нуклеотида и 2'-фтор N3-P5'-фосфорамидита. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит лидерную последовательность. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит промоторную последовательность. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую поли(А)-хвост. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность 3'UTR. В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту или не встречающуюся в природе нуклеиновую кислоту. В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, транскрибируемую *in vitro*. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность,

кодирующую трансмембранный домен TCR альфа. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую трансмембранный домен TCR бета. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую трансмембранный домен TCR альфа, и последовательность, кодирующую трансмембранный домен TCR бета.

**[0012]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыты векторы, содержащие рекомбинантную нуклеиновую кислоту, раскрытую в данном документе. В некоторых случаях вектор выбран из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, аденоассоциированного вирусного вектора (AAV), вектора на основе вируса саркомы Рауса (BCP) или ретровирусного вектора. В некоторых случаях вектор является вектором AAV6. В некоторых случаях вектор дополнительно содержит промотор. В некоторых случаях вектор представляет собой транскрибированный *in vitro* вектор.

**[0013]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыты модифицированные Т-клетки, содержащие рекомбинантную нуклеиновую кислоту, описанную выше, или вектор, описанный выше; причем модифицированная Т-клетка содержит функциональное нарушение эндогенного TCR. Кроме того, в данном документе в некоторых вариантах осуществления описаны модифицированные Т-клетки, содержащие последовательность, кодирующую TFP в виде нуклеиновой кислоты, описанной выше, или TFP, кодируемый последовательностью раскрытой выше нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP, где модифицированная Т-клетка содержит функциональное нарушение эндогенного TCR. В данном документе также раскрыты модифицированные аллогенные Т-клетки, содержащие последовательность, кодирующую TFP, описанную выше, или TFP, кодируемый последовательностью описанной выше нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP. В некоторых случаях Т-клетка дополнительно содержит гетерологичную последовательность, кодирующую константный домен TCR, где константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа, константный домен TCR бета или константный домен TCR альфа и константный домен TCR бета. В некоторых случаях эндогенный TCR, который функционально нарушен, представляет собой эндогенную альфа цепь TCR, эндогенную бета цепь TCR или эндогенную альфа цепь TCR и эндогенную бета цепь TCR. В некоторых случаях эндогенный TCR, который функционально нарушен, имеет пониженное связывание с комплексом МНС-пептид по сравнению с немодифицированной контрольной Т-клеткой. В некоторых случаях функциональное нарушение представляет собой нарушение работы гена, кодирующего эндогенный TCR. В некоторых случаях нарушение гена, кодирующего эндогенный TCR, представляет собой удаление

последовательности гена, кодирующего эндогенный TCR, из генома T-клетки. В некоторых случаях T-клетка является T-клеткой человека. В некоторых случаях T-клетка представляет собой CD8<sup>+</sup> T-клетку, CD4<sup>+</sup> T-клетку, наивную T-клетку, стволовую T-клетку памяти, центральную T-клетку памяти, дважды отрицательную T-клетку, эффекторную T-клетку памяти, эффекторную T-клетку, клетку ThO, клетку TcO, клетку Th1, клетку Tel, клетку Th2, клетку Tc2, клетку Th17, клетку Th22, гамма-дельта-T-клетку, натуральную клетку-киллер (NK), T-натуральную клетку-киллер (NKT), гемопоэтические стволовые клетки или плюрипотентные стволовые клетки. В некоторых случаях T-клетка является CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> T-клеткой. В некоторых случаях T-клетка является аллогенной T-клеткой. В некоторых случаях модифицированные T-клетки дополнительно содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанной со вторым полипептидом, содержащим положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена. В некоторых случаях ингибирующая молекула содержит первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть PD1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и первичный сигнальный домен.

**[0014]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты фармацевтические композиции, содержащие: (a) модифицированные T-клетки согласно данному документу; и (b) фармацевтически приемлемый носитель.

**[0015]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ получения модифицированной T-клетки по изобретению, включающий (a) нарушение эндогенного гена TCR, кодирующего альфа цепь TCR, бета цепь TCR или альфа цепь TCR и бета цепь TCR; тем самым продуцируя T-клетку, содержащую функциональное нарушение эндогенного гена TCR; и (b) трансдуцируя T-клетку, содержащую функциональное нарушение эндогенного гена TCR рекомбинантной нуклеиновой кислотой или вектором, раскрытыми в данном документе. В некоторых случаях нарушение включает трансдукцию T-клетки белком нуклеазы или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок нуклеазы, нацеленной на эндогенный ген, кодирующий альфа цепь TCR, бета цепь TCR или альфа цепь TCR и бета цепь TCR. Далее в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описан способ получения модифицированной T-клетки по изобретению, который включает трансдукцию T-клетки, содержащей функциональное нарушение эндогенного гена TCR рекомбинантной нуклеиновой кислотой или вектором, раскрытыми в данном документе. В некоторых случаях T-клетка, содержащая функциональное нарушение эндогенного гена TCR, представляет собой T-клетку, содержащую функциональное нарушение эндогенного гена TCR, кодирующего

альфа цепь TCR, бета цепь TCR или альфа цепь TCR и бета цепь TCR. В некоторых случаях Т-клетка является Т-клеткой человека. В некоторых случаях Т-клетка, содержащая функциональное нарушение эндогенного гена TCR, имеет пониженное связывание с комплексом МНС-пептид по сравнению с немодифицированной контрольной Т-клеткой. В некоторых случаях нуклеаза представляет собой мегануклеазу, нуклеазу «цинковые пальцы» (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активатору транскрипции (TALEN), нуклеазу CRISPR/Cas или нуклеазу megaTAL. В некоторых случаях последовательность, содержащаяся в рекомбинантной нуклеиновой кислоте или векторе, вставляется в ген эндогенной субъединицы TCR в сайте рестрикции, и при этом вставка последовательности в ген эндогенной субъединицы TCR функционально нарушает эндогенную субъединицу TCR. В некоторых случаях нуклеаза представляет собой мегануклеазу. В некоторых случаях мегануклеаза содержит первую субъединицу и вторую субъединицу, причем первая субъединица связывается с первым полусайтом распознавания последовательности распознавания, а вторая субъединица связывается со вторым полусайтом распознавания последовательности распознавания. В некоторых случаях мегануклеаза представляет собой одноцепочечную мегануклеазу, содержащую линкер, при этом линкер ковалентно соединяет первую субъединицу и вторую субъединицу.

**[0016]** В настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления, описан способ лечения рака у субъекта, который в этом нуждается, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе. Также в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления, описан способ лечения рака у субъекта, который в этом нуждается, причем способ включает введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей (а) модифицированные Т-клетки, полученные в соответствии со способами по изобретению; и (b) фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых случаях модифицированная Т-клетка является аллогенной Т-клеткой. В некоторых случаях у субъекта высвобождается меньше цитокинов по сравнению с субъектом, которому вводят эффективное количество немодифицированных контрольных Т-клеток. В некоторых случаях у субъекта высвобождается меньше цитокинов по сравнению с субъектом, которому вводят эффективное количество модифицированной Т-клетки, содержащей рекомбинантную нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе, или вектор, описанный в данном документе. В некоторых случаях способ включает введение фармацевтической композиции в комбинации с агентом, повышающим эффективность фармацевтической композиции. В некоторых случаях способ включает введение фармацевтической композиции в комбинации с агентом, который ослабляет один или несколько побочных эффектов,

связанных с фармацевтической композицией. В некоторых случаях рак представляет собой солидный рак, лимфому или лейкоз. В некоторых случаях рак выбирают из группы, состоящей из почечно-клеточной карциномы, рака груди, рака легкого, рака яичников, рака простаты, рака толстой кишки, рака шейки матки, рака мозга, рака печени, рака поджелудочной железы, рака почки и желудка.

**[0017]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыты рекомбинантная нуклеиновая кислота, вектор, модифицированная Т-клетка или фармацевтическая композиция для применения в качестве лекарственного средства или для приготовления лекарственного средства.

### **ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ**

**[0018]** Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

**[0019]** На **ФИГ. 1** показано выравнивание последовательностей TRBC1 и TRBC2, выбранные сгРНК представлены стрелками над последовательностью TRBC1.

**[0020]** На **ФИГ. 2А-В** показаны примерные графики, показывающие поверхностную экспрессию CD3 (SK7) в сравнении с TCR $\alpha\beta$  (IP26) в клетках с отредактированным TRA (**ФИГ. 2А**) и отредактированным TRB (**ФИГ. 2В**). Клетки Jurkat дикого типа были отредактированы по генам либо TRAC, либо по TRBC, чтобы нарушить поверхностную экспрессию TRA или TRB. Клетки, отрицательные по CD3 и TCR $\alpha\beta$ , очищали с помощью активируемой магнитным полем сортировки клеток. Границы на графиках были нарисованы для разграничения CD3-отрицательной и TCR $\alpha\beta$ -отрицательной популяций клеток, а процент клеток, остающихся в каждом квадранте, показан в углах.

**[0021]** На **ФИГ. 3А-Е** показаны примерные графики, показывающие поверхностную экспрессию CD3 по сравнению с TCR $\alpha\beta$  в клетках дикого типа по сравнению с отредактированными (TRA/В нарушенными) клетками до и после очистки. Т-клетки Донор 1 дикого типа (**ФИГ. 3А**) были отредактированы по генам либо TRAC (**FIG. 3В** или **ФИГ. 3D**) либо TRBC (**FIG. 3С** или **ФИГ. 3Е**), чтобы нарушить поверхностную экспрессию TRA или TRB. На **ФИГ. 3В** и **ФИГ. 3С** показан статус поверхностных маркеров CD3 и TCR $\alpha\beta$  сразу после редактирования, в то время как на **ФИГ. 3D** и **ФИГ. 3Е** показан статус этих поверхностных маркеров после их негативной селекции с помощью магнитно-активированной сортировки клеток (MACS). Границы на графиках были нарисованы для



разграничения CD3-отрицательной и TCR $\alpha\beta$ -отрицательной популяций клеток, а процент клеток, остающихся в каждом квадранте, показан в углах.

**[0022] На ФИГ. 4** показаны примерные графики измерения аллогенности TCR-отрицательных Т-клеток путем наблюдения за скоростью их пролиферации. TCR-отрицательные Т-клетки были постоянно помечены красителем CFSE, концентрация которого снижается вдвое при делении клеток. Полностью серые пики вдоль оси X показывают сигнал CFSE в немеченых клетках в качестве отрицательного контроля. Серые линии показывают количество CFSE в клетках после 24 часов без какой-либо стимуляции, а черные линии показывают количество CFSE после 5 дней совместного культивирования (со стимуляцией). Ось Y показывает процентное содержание клеток. TRA-отрицательные Т-клетки показаны на четырех верхних графиках, тогда как TRB-отрицательные Т-клетки показаны на четырех нижних графиках. Алло-реакция указывает на то, что Т-клетки Донора 2 TRA КО были смешаны с РВМС от донора другого гаплотипа (Донор 1), тогда как автоматическая реакция указывает, что Т-клетки и РВМС одного и того же донора культивировались совместно. Положительный контроль для независимой от TCR стимуляции был указан на графиках с РМА и иономицином.

**[0023] На ФИГ. 5** показаны примерные стратегии для создания аллогенных TFP-Т-клеток. Цифры ниже соответствуют пронумерованным чертежам на **ФИГ. 5**. (1) демонстрирует эндогенный TCR $\alpha\beta$  на Т-клетке, взаимодействующий с МНСI на антигенпрезентирующей клетке и антигене. (2) демонстрирует совместную экспрессию TRBC с TRAC, слитым со связующим агентом TFP, в TRA -/- или TRB -/- клетках. (3) демонстрирует коэкспрессию TRBC мыши с TRAC мыши, слитым со связывающим агентом TFP, в TRA -/- или TRB-/- клетках. (4) демонстрирует совместную экспрессию муринизированного TRBC с муринизированным TRAC, слитым со связывающим агентом TFP, в TRA -/- или TRB -/- клетках. (5) демонстрирует связывающий агент TFP, переносимый усиленным белком TRAC с сильной аффинностью к TCR $\beta$  в TRA -/- клетках. (6) демонстрирует стратегию, в которой для усиления взаимодействия между TRAC и TRBC константные домены IgG были слиты на С-конце каждого из константных доменов TCR. Связывающий агент TFP слит с С-концом константного домена IgG в TRA -/- или TRB -/- клетках. (7) демонстрирует стратегию, при которой N-концевые части TRAC и TRBC были замещены их частями-гомологами в TCR $\gamma$  и TCR $\delta$ , соответственно. Связывающий агент TFP переносится TRAC и/или TRBC в TRA -/- или TRB -/- клетки.

**[0024] На ФИГ. 6** показана примерная схема, показывающая нокин-стратегию саморасщепляющейся последовательности T2A, чтобы обеспечить образование аллогенных TFP-Т-клеток.

[0025] На **ФИГ. 7** показаны примерные графики, показывающие поверхностную экспрессию TCR $\alpha\beta$  и CD3 $\epsilon$  (человека) или мышинового TCR $\beta$ , что определено с помощью анализа Lys-Cyto, как описано в Примере. 6.

[0026] На **ФИГ. 8** показаны примерные графики, показывающие Lys-Cyto анализ эффекторных Т-клеток, культивированных с опухолевыми клетками-мишенями (клетки Na1m 6 на верхнем графике, клетки K562 на нижнем графике) в соотношениях 3 к 1, 1 к 1 или 1 к 3. Целевые (CD19-положительные) клетки показаны на левом графике. Оси x представляют процентное содержание лизиса опухолевых клеток.

[0027] На **ФИГ. 9А-С** показаны примерные графики, показывающие поверхностную экспрессию CD3 по сравнению с TCR $\alpha\beta$  в клетках дикого типа (**ФИГ. 9А**), в клетках КО по TRB без трансдукции (**ФИГ. 9В**), в клетках КО по TRB с трансдукцией полноразмерными (FL) TFP TCR $\beta$  (**ФИГ. 9С**), границы на графиках были нарисованы для разграничения CD3-отрицательной и TCR $\alpha\beta$ -отрицательной популяций клеток, а процент клеток, остающихся в каждом квадранте, показан в углах.

[0028] На **ФИГ. 10А-В** показаны примерные графики, показывающие поверхностную экспрессию CD3 по сравнению с TCR $\alpha\beta$  в клетках с нокаутом TRB, трансдуцированных геном TRBC человека (**ФИГ. 10А**) и мышинным геном TRAC-T2A-TRBC (**ФИГ. 10В**). Границы на графиках были нарисованы для разграничения CD3-отрицательной и TCR $\alpha\beta$ -отрицательной популяций клеток, а процент клеток, остающихся в каждом квадранте, показан в углах.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0029] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыта рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержащая (а) последовательность, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий (i) субъединицу TCR, содержащую (1) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, (2) трансмембранный домен, и (3) внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, TCR альфа, TCR бета, TCR гама или TCR дельта, и (ii) человеческое или гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающий домен; и (b) последовательность, кодирующую константный домен TCR, где константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа, константный домен TCR бета, или константный домен TCR альфа и константный домен TCR бета; причем субъединица TCR и антитело функционально связаны, и при этом TFP функционально внедряется в комплекс TCR при экспрессии в Т-клетке.

[0030] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты

рекомбинантные нуклеиновые кислоты, содержащие (а) последовательность, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий (i) субъединицу TCR, содержащую (1) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, (2) трансмембранный домен, и (3) внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, TCR альфа или TCR бета, и (ii) связывающий лиганд или его фрагмент, который способен связываться с антителом или его фрагментом; и (b) последовательность, кодирующую константный домен TCR, где константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа, константный домен TCR бета или константный домен TCR альфа и константный домен TCR бета, причем субъединица TCR и связывающий лиганд или его фрагмент функционально связаны, и где TFP функционально внедряется в комплекс TCR при экспрессии в Т-клетке.

**[0031]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты рекомбинантные нуклеиновые кислоты, содержащие, содержащая (а) последовательность, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий (i) субъединицу TCR, содержащую (1) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, (2) трансмембранный домен, и (3) внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, TCR альфа или TCR бета, и (ii) домен антигена, содержащий лиганд или его фрагмент, который связывается с рецептором или полипептидом, экспрессируемым на поверхности клетки; и (b) последовательность, кодирующую константный домен TCR, где константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа, константный домен TCR бета или константный домен TCR альфа и константный домен TCR бета, причем субъединица TCR и домен антигена функционально связаны, и при этом TFP функционально внедряется в комплекс TCR при экспрессии в Т-клетке.

**[0032]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыты векторы, содержащие рекомбинантную нуклеиновую кислоту, раскрытую в данном документе.

**[0033]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыты модифицированные Т-клетки, содержащие рекомбинантную нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе, или вектор, описанный в данном документе; причем модифицированная Т-клетка содержит функциональное нарушение эндогенного TCR.

**[0034]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыты модифицированные Т-клетки, содержащие последовательность, кодирующую TFP в виде нуклеиновой кислоты, раскрытой в данном документе, или TFP, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, раскрытой в данном документе, причем

модифицированная Т-клетка содержит функциональное нарушение эндогенного TCR.

**[0035]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыты модифицированные аллогенные Т-клетки, содержащие последовательность, кодирующую TFR, раскрытый в данном документе, или TFR, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, раскрытой в данном документе.

**[0036]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты фармацевтические композиции, содержащие: (а) модифицированные Т-клетки согласно данному документу; и (b) фармацевтически приемлемый носитель.

**[0037]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты способы получения модифицированной Т-клетки согласно раскрытию, включающие (а) нарушение эндогенного гена TCR, кодирующего альфа цепь TCR, бета цепь TCR или альфа цепь TCR и бета цепь TCR; тем самым продуцируя Т-клетку, содержащую функциональное нарушение эндогенного гена TCR; и (b) трансдукцию Т-клетки, содержащей функциональное нарушение эндогенного гена TCR, рекомбинантной нуклеиновой кислотой по изобретению или вектором, раскрытым в данном документе.

**[0038]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты способы получения модифицированной Т-клетки по изобретению, включающие трансдукцию Т-клетки, содержащей функциональное нарушение эндогенного гена TCR, рекомбинантной нуклеиновой кислотой, раскрытой в настоящем документе, или векторами, раскрытыми в настоящем документе.

**[0039]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыты способы лечения рака у субъекта, который в этом нуждается, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций, раскрытых в данном документе.

**[0040]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыты способы лечения рака у субъекта, который в этом нуждается, включающие введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей (а) модифицированные Т-клетки, полученные в соответствии со способами, раскрытыми в настоящем документе; и (b) фармацевтически приемлемый носитель.

### **Определенная терминология**

**[0041]** Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понимается обычным специалистом в области техники, к которой относится изобретение.

**[0042]** Форма единственного числа используется для грамматического обозначения одного или более чем одного (т. е. по меньшей мере одного) объекта. В качестве примера,

«элемент» означает один элемент или более одного элемента.

**[0043]** Как используется в настоящем описании, «примерно» может означать плюс или минус меньше 1 или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 или более 30 процентов, в зависимости от ситуации и от того, что известно специалисту в данной области техники.

**[0044]** Как используется в настоящем описании, «субъект», или «субъекты», или «индивиды» могут включать млекопитающих, таких как люди или млекопитающие, не относящиеся к человеку, например, одомашненные, сельскохозяйственные или дикие животные, а также птицы и водные животные, но не ограничиваются ими. «Пациенты» — это субъекты, страдающие от заболевания, нарушения или патологического состояния, подверженные риску их развития либо любым другим образом нуждающиеся в композициях и способах, представленных в настоящем документе.

**[0045]** Как используется в настоящем документе, термины «лечить» или «лечение» относятся к любому признаку успеха при лечении или облегчении заболевания или патологического состояния. Лечение может включать в себя, например, снижение, замедление или облегчение тяжести одного или более симптомов заболевания или патологического состояния, или оно может включать в себя снижение частоты проявления симптомов заболевания, дефекта, нарушения, нежелательного состояния или т. п. у пациента. Как используется в настоящем документе, термин «лечить или предотвратить» иногда используется для обозначения способа, который дает в результате определенный уровень лечения или облегчения заболевания или патологического состояния и предполагает ряд результатов, направленных для достижения этой цели, включая, помимо прочего, полное предотвращение патологического состояния.

**[0046]** Как используется в настоящем документе, термин «предотвращение» относится к предотвращению заболевания или патологического состояния, например, образования опухоли, у пациента. Например, если индивид, подверженный риску развития опухоли или другой формы рака, получает лечение способами по настоящему изобретению, и у него впоследствии не будет развиваться опухоль или другая форма рака, в таком случае у этого индивида заболевание будет предотвращено, по крайней мере в течение определенного периода времени.

**[0047]** Как используется в настоящем документе, «терапевтически эффективное количество» представляет собой такое количество композиции или ее активного компонента, которого будет достаточно для обеспечения положительного эффекта или для сокращения любым другим образом пагубного влияния на индивида, которому вводят эту композицию. Под термином «терапевтически эффективная доза» в настоящем документе

понимают дозу, которая обеспечивает один или более желаемых или предпочтительных (например, положительных) эффектов, для достижения которых ее вводят, при этом подобное введение происходит один или более раз в течение заданного периода времени. Точная доза будет зависеть от цели лечения и устанавливаться специалистом в данной области техники с использованием известных методик (см., например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); and Pickar, *Dosage Calculations* (1999))

**[0048]** Как используется в настоящем документе, «слитый белок Т-клеточного рецептора (TCR)» или «TFP» включает в себя рекомбинантный полипептид, полученный из различных полипептидов, содержащих TCR, который, как правило, способен i) связываться с поверхностным антигеном на клетках-мишенях и ii) взаимодействовать с другими полипептидными компонентами интактного комплекса TCR, как правило, при совместном размещении в Т-клетке или на ее поверхности.

**[0049]** Термин «стимуляция» относится к первичному ответу, индуцированному связыванием стимулирующего домена или стимулирующей молекулы (например, комплекс TCR/CD3) с их распознаваемым лигандом, опосредуя, таким образом, событие передачи сигналов, такое как, помимо прочего, передача сигналов через комплекс TCR/CD3. Стимуляция может опосредовать измененную экспрессию определенных молекул и/или реорганизацию цитоскелетных структур и т. п.

**[0050]** Термин «стимулирующая молекула» или «стимулирующий домен» относится к молекуле или ее части, экспрессируемой Т-клеткой, которая обеспечивает последовательность(и) первичной цитоплазматической сигнализации, которые регулируют первичную активацию комплекса TCR стимулирующим путем для по меньшей мере определенного аспекта сигнального пути Т-клетки. В одном аспекте первичный сигнал инициируется посредством, например, связывания комплекса TCR/CD3 с молекулой МНС, загруженной пептидом, что приводит к опосредованию Т-клеточного ответа, включая, помимо прочего, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т. п. Последовательность первичной цитоплазматической сигнализации (также называемая «домен первичной сигнализации»), которая действует стимулирующим путем, может содержать мотив сигнализации, который известен как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или «ИТ АМ». К примерам последовательности первичной цитоплазматической сигнализации, содержащей ИТ АМ, для конкретного применения в настоящем изобретении относятся, помимо прочего, те, что получены от TCR дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эpsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также известный как «ICOS») и CD66d.

**[0051]** Термин «антигенпрезентирующая клетка» или «АПС» относится к клетке иммунной системы, такой как вспомогательная клетка (например, В-клетка, дендритная клетка и т. п.), которая демонстрирует чужеродный антиген, входящий в состав основных комплексов гистосовместимости (МНС), на ее поверхности. Т-клетки могут распознавать эти комплексы с помощью своих Т-клеточных рецепторов (TCR). АПС процессируют антигены и презентуют их Т-клеткам.

**[0052]** «Молекулы главного комплекса гистосовместимости» (МНС) обычно связываются TCR как часть комплекса пептид:МНС. Молекула МНС может быть молекулой МНС класса I или II. Комплекс может находиться на поверхности антигенпрезентирующей клетки, такой как дендритная клетка или В-клетка, или любой другой клетки, включая раковые клетки, или он может быть иммобилизован, например, путем нанесения покрытия на шарик или планшет.

**[0053]** Система лейкоцитарных антигенов человека (HLA) - это название генного комплекса, который кодирует главный комплекс гистосовместимости (МНС) у человека и включает антигены класса I HLA (A, B и C) и антигены класса II HLA (DP, DQ и DR.). Аллели A, B и C HLA представляют пептиды, полученные в основном из внутриклеточных белков, например, белков, экспрессируемых внутри клетки.

**[0054]** Во время развития Т-клеток *in vivo*, Т-клетки проходят этап положительной селекции, чтобы гарантировать распознавание собственных МНС, за которым следует отрицательный этап, чтобы удалить Т-клетки, которые слишком сильно связываются с МНС, которые представляют аутоантигены. Как следствие, определенные Т-клетки и экспрессируемые ими TCR будут распознавать только пептиды, представленные определенными типами молекул МНС, то есть те, которые кодируются определенными аллелями HLA. Это известно как ограничение HLA.

**[0055]** Одним из представляющих интерес аллелей HLA является HLA-A\*0201, который экспрессируется у подавляющего большинства (> 50%) популяции европеоидной расы. Соответственно, TCR, которые связывают пептиды WT1, представленные МНС, кодируемыми HLA-A\*0201 (т.е. ограничены HLA-A\*0201), являются предпочтительными, поскольку иммунотерапия с использованием таких TCR будет подходящей для лечения большей части популяции европеоидной расы.

**[0056]** Другими представляющими интерес аллелями HLA-A являются HLA-A\*0101, HLA-A\*2402 и HLA-A\*0301.

**[0057]** Представляющими интерес широко экспрессируемыми аллелями HLA-B являются HLA-B\*3501, HLA-B\*0702 и HLA-B\*3502.

**[0058]** Как используется в настоящем документе, термин «внутриклеточный сигнальный

домен» относится к внутриклеточной части молекулы. Внутриклеточный сигнальный домен генерирует сигнал, который вызывает иммунную эффекторную функцию клетки, содержащей TFR, например, модифицированной Т-Т-клетки. К примерам иммунной эффекторной функции, например, в модифицированной Т-Т-клетке, относится цитолитическая активность и активность хелперных Т-клеток, включая секрецию цитокинов. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать домен первичной внутриклеточной сигнализации. К примерам доменов первичной внутриклеточной сигнализации относятся домены, полученные от молекул, которые отвечают за первичную стимуляцию или стимуляцию, зависящую от антигена. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать костимулирующий внутриклеточный домен. К примерам костимулирующих внутриклеточных сигнальных доменов относятся домены, полученные из молекул, которые отвечают за костимулирующие сигналы или стимуляцию, зависящую от антигена.

**[0059]** Домен первичной внутриклеточной сигнализации может содержать IT AM («иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив»). К примерам последовательностей первичной цитоплазматической сигнализации, содержащих IT AM, относятся, помимо прочего, производные CD3 дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d DAP10 и DAP12.

**[0060]** Термин «костимулирующая молекула» относится к распознаваемому партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, опосредуя, таким образом, костимулирующий ответ Т-клетки, такой как, помимо прочего, пролиферация. Костимулирующие молекулы являются молекулами клеточной поверхности, отличными от рецепторов антигенов или их лигандов, которые необходимы для эффективного иммунного ответа. Костимулирующие молекулы включают, помимо прочего, молекулу MHC класса I, BTLA и рецептор к Толл-лигандам, а также OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) и 4-1BB (CD137). Костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может представлять собой внутриклеточную часть костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула может быть представлена в следующих семействах белков: Рецепторные белки TNF, иммуноглобулиноподобные белки, рецепторы к цитокинам, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM) и активирующие рецепторы NK-клеток. К примерам подобных молекул относится CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83 и т. п. Внутриклеточный сигнальный домен может содержать всю внутриклеточную часть



или весь нативный внутриклеточный сигнальный домен молекулы, из которой он был получен, или его функциональный фрагмент. Термин «4-1BB» относится к члену суперсемейства TNFR с аминокислотной последовательностью, предоставленной под учетным номером GenBank AAA62478.2, или эквивалентным остаткам отличных от человека видов, например, мышей, грызунов, мартышковых, человекообразных обезьян и т. п.; а «костимулирующий домен 4-1BB» определяется как аминокислотные остатки 214–255 учетного номера GenBank AAA62478.2 или эквивалентные остатки отличных от человека видов, например, мышей, грызунов, мартышковых, человекообразных обезьян и т. п.

**[0061]** Как используется в настоящем документе, термин «антитело» относится к белковым или полипептидным последовательностям, полученным из молекулы иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном. Антитела могут представлять собой интактные иммуноглобулины поликлонального или моноклонального происхождения или их фрагменты и могут быть получены из естественных или рекомбинантных источников.

**[0062]** Термины «фрагмент антитела» относятся к по меньшей мере одной части антитела или его рекомбинантным вариантам, которые содержат антигенсвязывающий домен, т. е. антигенную определяющую переменную область интактного антитела, которого будет достаточно для обеспечения распознавания и специфического связывания фрагмента антитела с мишенью, такой как антиген и его определенный эпитоп. К примерам фрагментов антител относятся, помимо прочего, Fab-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub>- и Fv-фрагменты, одноцепочечные (sc)Fv-фрагменты антител («scFv»), линейные антитела, однодоменные антитела такие как sdAbVL (V<sub>L</sub> или V<sub>H</sub>), верблюжьи домены V<sub>HH</sub> и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

**[0063]** Термин «scFv» относится к слитому белку, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область легкой цепи, и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, причем переменные области легкой и тяжелой цепи непрерывно соединены посредством короткого гибкого полипептидного линкера и способны быть экспрессированы как одна полипептидная цепь, и причем scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он был получен.

**[0064]** «Переменная область тяжелой цепи» или «V<sub>H</sub>» в отношении антитела относится к фрагменту тяжелой цепи, который содержит три CDR, перемежающих фланкирующие участки, известные как каркасные области, эти каркасные области, как правило, более высоко консервативны, чем CDR, и образуют каркас для поддержки CDR. Верблюжий домен «V<sub>HH</sub>» представляет собой тяжелую цепь, содержащую единственный переменный

домен антитела.

**[0065]** Как используется в настоящем документе, если не указано иное, scFv может иметь переменные области  $V_L$  и  $V_H$  в любом порядке, *например*, по отношению к N- или C-концам полипептида scFv может содержать  $V_L$ -линкер- $V_H$  или может содержать  $V_H$ -линкер- $V_L$ .

**[0066]** Часть композиции TFP по настоящему изобретению, содержащая антитело или фрагмент этого антитела, может существовать в различных формах, где антигенсвязывающий домен экспрессируется как часть непрерывной полипептидной цепи, включая, например, фрагмент однодоменного антитела (sdAb), одноцепочечное антитело (scFv), полученное из мышинового, гуманизированного или человеческого антитела (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). В одном аспекте антигенсвязывающий домен композиции TFP по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В дополнительном аспекте TFP содержит фрагмент антитела, который содержит scFv или sdAb. **[0067]** Термин «рекомбинантное антитело» относится к антителу, которое получают с применением технологии рекомбинантной ДНК, такому как, например, антитело, экспрессируемое бактериофагом или экспрессирующей системой дрожжей. Термин также следует воспринимать как обозначающий антитело, которое было получено путем синтеза молекулы ДНК, кодирующей антитело, и которая экспрессирует белок антитела, или аминокислотную последовательность, определяющую антитело, причем ДНК или аминокислотная последовательность были получены с применением технологии рекомбинантной ДНК или аминокислотной последовательности, которая является доступной и хорошо известной в данной области техники.

**[0068]** Термин «антиген» или «Аг» относится к молекуле, которая способна специфически связываться антителом или которая провоцирует иммунный ответ каким-либо другим образом. Такой иммунный ответ может предполагать или выработку антител, или активацию специфических иммунокомпетентных клеток, или и то, и другое.

**[0069]** Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить в качестве антигена. Более того, антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность или часть нуклеотидной последовательности, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, таким образом кодирует «антиген» в том значении, в

котором этот термин используется в настоящем документе. Более того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген не обязательно должен кодироваться исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Очевидно, что настоящее изобретение включает в себя, помимо прочего, использование частей нуклеотидных последовательностей более одного гена, и что эти нуклеотидные последовательности располагаются в различных комбинациях для того, чтобы кодировать полипептиды, которые вызывают желаемый иммунный ответ. Более того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген совсем не обязательно должен кодироваться «геном». Очевидно, что антиген может быть образован путем синтеза, или может быть получен из биологического образца, или может представлять собой макромолекулу, помимо полипептида. Подобный биологический образец может включать в себя, помимо прочего, образец тканей, образец опухоли, клетку или жидкость с другими биологическими компонентами.

**[0070]** Как используется в настоящем документе, «CD 19» относится к белку кластера дифференцировки 19, который является антигенной детерминантой, обнаруживаемой на клетках-предшественниках В-клеточного лейкоза, других злокачественных В-клетках и большинстве клеток нормальной В-клеточной линии дифференцировки.

**[0071]** Как используется в настоящем документе, термин «BCMA» относится к антигену созревания В-клеток, также известному как член 17 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF17), а белок кластера дифференцировки 269 (CD269) представляет собой белок, который у людей кодируется геном TNFRSF17. TNFRSF17 представляет собой рецептор клеточной поверхности суперсемейства рецепторов TNF, который распознает фактор активации В-клеток (BAFF) (см., например, Laabi et al., EMBO 11 (11): 3897-904 (1992)). Этот рецептор экспрессируется в зрелых В-лимфоцитах и может быть важным для развития В-клеток и аутоиммунного ответа.

**[0072]** Используемый в данном документе термин «CD16» (также известный как FcγRIII) относится к молекуле кластера дифференцировки, обнаруживаемой на поверхности натуральных клеток-киллеров, нейтрофильных полиморфноядерных лейкоцитов, моноцитов и макрофагов. CD 16 был идентифицирован как рецепторы Fc FcγRIIIa (CD 16a) и FcγRIIIb (CD 16b), которые участвуют в передаче сигнала. CD 16 представляет собой молекулу суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF), участвующую в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

**[0073]** «NKG2D» в контексте настоящего документа относится к трансмембранному белку, принадлежащему к семейству CD94/NKG2 лектин-подобных рецепторов С-типа. У человека NKG2D экспрессируется NK-клетками, γδ Т-клетками и CD8+ αβ Т-клетками.

NKG2D распознает индуцированные собственные белки из семейств MIC и RAET1/ULBP, которые появляются на поверхности подвергнутых стрессу, злокачественно трансформированных и инфицированных клеток.

**[0074]** Мезотелин (MSLN) относится к антигену дифференцировки опухоли, который обычно присутствует в мезотелиальных клетках, выстилающих плевру, брюшину и перикард. Мезотелин сверхэкспрессируется в нескольких опухолях человека, включая мезотелиому, аденокарциному яичников и поджелудочной железы.

**[0075]** Трансмембранный рецептор тирозин-протеинкиназы ROR1, также известный как нейротрофическая тирозинкиназа, связанная с рецептором 1 (NTRKR1), является членом семейства орфанных рецепторов типа рецепторной тирозинкиназы (ROR). Он играет роль в метастазировании рака.

**[0076]** Термин «MUC16», также известный как «муцин 16, ассоциированный с клеточной поверхностью» или «опухолевый маркер CA125, связанный с раком яичников», представляет собой связанный с мембраной муцин, который содержит внеклеточный домен на своем amino-конце, большой тандемный повторяющийся домен, и трансмембранный домен с коротким цитоплазматическим доменом. Продукты этого гена использовались в качестве маркера для различных видов рака, при этом более высокие уровни экспрессии связаны с худшими результатами.

**[0077]** Термин «CD22», также известный как Ig-подобный лектин 2, связывающий сиаловую кислоту, SIGLEC-2, поверхностный антиген Т-клеток leu-14 и рецептор CD22 В-клеток, представляет собой белок, который опосредует взаимодействия В-клетка/В-клетка, и считается, что он участвует в локализации В-клеток в лимфоидных тканях и связан с заболеваниями, включая резистентную гематологическую злокачественную опухоль и волосатоклеточный лейкоз. Полностью человеческое моноклональное антитело против CD22 («M971»), подходящее для использования с раскрытыми в данном документе способами, описано, например, в Xiao et al., MAbs. 2009 May-Jun; 1(3): 297- 303.

**[0078]** Гены «CD79 $\alpha$ » и «CD79 $\beta$ » кодируют белки, которые составляют рецептор антигена В-лимфоцитов, мультимерный комплекс, который включает антигенспецифический компонент, поверхностный иммуноглобулин (Ig). Поверхностный Ig нековалентно связывается с двумя другими белками, Ig-альфа и Ig-бета (кодируемыми CD79 $\alpha$  и его паралогом CD79 $\beta$ , соответственно), которые необходимы для экспрессии и функции рецептора В-клеточного антигена. Нарушение функции этого комплекса может привести, например, к хроническим лимфоцитарным В-клеточным лейкозам человека.

**[0079]** Фактор активации В-клеток, или BAFF, представляет собой цитокин, который принадлежит к семейству лигандов фактора некроза опухоли (TNF). Этот цитокин является

лигандом рецепторов TNFRSF13B/TACI, TNFRSF17/BCMA и TNFRSF13C/BAFF-R. Этот цитокин экспрессируется в клетках В-клеточной линии дифференцировки и действует как мощный активатор В-клеток. Также было показано, что он играет важную роль в пролиферации и дифференцировке В-клеток.

**[0080]** Термин «противоопухолевый эффект» относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными способами, включая, помимо прочего, *например*, уменьшение объема опухоли, уменьшение количества опухолевых клеток, уменьшение количества метастаз, увеличение вероятной продолжительности жизни, снижение пролиферации опухолевых клеток, снижение выживаемости опухолевых клеток или облегчение различных физиологических симптомов, связанных с раковым состоянием. «Противоопухолевый эффект» также может проявляться в способности пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител по настоящему изобретению в первую очередь предотвращать появление опухоли.

**[0081]** Термин «аутологический» относится к любому материалу, полученному от того же индивида, которому впоследствии он будет вводиться.

**[0082]** Термин «генетически отличающийся» или, альтернативно, «аллогенный» относится к любому материалу, полученному от другого животного того же вида или другого пациента, отличных от того индивида, которому будет вводиться материал. Считается, что два или более индивидов являются аллогенными по отношению друг к другу, когда гены в одном или более локусов не являются идентичными. В некоторых аспектах аллогенный материал, полученный от индивидов одного и того же вида, может достаточно отличаться генетически для антигенного взаимодействия.

**[0083]** Термин «ксеногенный» относится к трансплантату, полученному от животного другого вида.

**[0084]** Термин «рак» относится к заболеванию, которое характеризуется быстрым и неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Раковые клетки могут распространяться локально или через кровотоки и лимфатическую систему в другие части тела. Примеры различных раковых заболеваний описаны в настоящем документе, к ним относятся, помимо прочего, рак молочных желез, рак предстательной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почек, рак печени, рак головного мозга, лимфома, лейкоз, рак легкого и т. п.

**[0085]** Термин «кодирующий» относится к присущему свойству конкретных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих или определенную последовательность нуклеотидов (*например*,

рРНК, тРНК и мРНК), или определенную последовательность аминокислот, а также к биологическим свойствам, полученным в результате этого. Таким образом, ген, кДНК или РНК кодируют белок, если в результате транскрипции и трансляции мРНК, соответствующей этому гену, вырабатывается белок в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно предоставляется в перечнях последовательностей, так и некодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут рассматриваться как кодирующие белок или другой продукт этого гена или кДНК.

**[0086]** Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность» включает в себя все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза «нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок или РНК» также может включать в себя интроны в той мере, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в некоторых версиях содержать один или более интронов.

**[0087]** Термины «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к количеству соединения, состава, материала или композиции, как описано в настоящем документе, эффективному для достижения конкретного биологического или терапевтического результата.

**[0088]** Термин «эндогенный» относится к любому материалу, полученному от организма, клетки, ткани или системы либо произведенному внутри них.

**[0089]** Термин «экзогенный» относится к любому материалу, введенному из организма, клетки, ткани или системы либо произведенному за их пределами.

**[0090]** Термин «экспрессия» относится к транскрипции и/или трансляции конкретной нуклеотидной последовательности, управляемой промотором.

**[0091]** Термин «функциональное нарушение» относится к физическому или биохимическому изменению конкретной (например, целевой) нуклеиновой кислоты (например, гена, транскрипта РНК, белка, кодируемого ею), которое предотвращает ее нормальную экспрессию и/или поведение в клетке. В одном варианте осуществления функциональное нарушение относится к модификации гена с помощью метода редактирования генов. В другом варианте осуществления функциональное нарушение предотвращает экспрессию целевого гена (например, эндогенного гена).

**[0092]** Термин «вектор переноса» относится к композиции вещества, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту и которая может использоваться для доставки

выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. Многочисленные векторы известны в данной области техники, включая, помимо прочего, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин «вектор для переноса» включает в себя способную к автономной репликации плазмиду или вирус. Термин также следует воспринимать как такой, который дополнительно включает в себя неплазмидные и невирусные соединения, которые способствуют переносу нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, полилизинное соединение, липосома и т. п. К примерам вирусных векторов переноса относятся, помимо прочего, аденовирусные векторы, векторы аденоассоциированного вируса, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и т. п.

**[0093]** Термин «вектор экспрессии» относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, который содержит регулирующие экспрессию последовательности, функционально соединенные с нуклеотидной последовательностью, которая подлежит экспрессии. Вектор экспрессии содержит достаточно цис-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть обеспечены клеткой-хозяином или в *in vitro* системе экспрессии. Векторы экспрессии включают в себя все известные в данной области техники векторы, включая космиды, плазмиды (например, «голые» или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые содержат рекомбинантный полинуклеотид.

**[0094]** Термин «лентивирус» относится к роду семейства *Retroviridae*. Лентивирусы являются уникальными среди ретровирусов благодаря способности инфицировать неделящиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической информации в ДНК клетки-хозяина, таким образом, они являются одним из наиболее эффективных вариантов вектора доставки генов. ВИЧ, вирус иммунодефицита обезьян, вирус кошачьего иммунодефицита являются примерами лентивирусов.

**[0095]** Термин «лентивирусный вектор» относится к вектору, полученному из по меньшей мере части лентивирусного генома, включая, в особенности, самоинактивирующий лентивирусный вектор, как предлагается у Milone et al., *Mol. Ther.* 17(8): 1453-1464 (2009). К другим примерам лентивирусных векторов, которые могут использоваться в клинической практике, относится, помимо прочего, например, технология доставки генов LENTIVECTOR™ от компании Oxford BioMedica, система векторов LENTIMAX™ от компании Lentigen и т. п. Неклинические типы лентивирусных векторов также доступны и известны специалисту в данной области техники.

**[0096]** Термин «гомологичный» или «идентичность» относится к идентичности последовательности субъединицы между двумя полимерными молекулами, *например,*

между двумя молекулами нуклеиновой кислоты, такими как две молекулы ДНК или две молекулы РНК, или между двумя полипептидными молекулами. Когда положение субъединицы в обеих молекулах занимает одна и та же мономерная субъединица, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занимает аденин, в таком случае они являются гомологичными или идентичными в этом положении. Гомология между двумя последовательностями прямо пропорциональна количеству совпадающих или гомологичных положений; например, если половина (например, пять положений в полимере длиной десять субъединиц) положений в двух последовательностях будет гомологичной, две последовательности являются на 50% гомологичными; если 90% положений (например, 9 из 10) будут совпадать или будут гомологичными, две последовательности являются на 90% гомологичными.

[0097] «Гуманизированные» формы антител нечеловеческого происхождения (*например*, мышьиные) представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> или другие антигенсвязывающие последовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. В большинстве случаев гуманизированные антитела и фрагменты антител представляют собой иммуноглобулины человека (антитело-реципиент или фрагмент антитела), в которых остатки определяющей комплементарности области (CDR) реципиента замещены остатками CDR видов, отличных от человека (антитело-донор), таких как мышь, крыса или кролик, обладающими желаемой специфичностью, аффинностью и эффективностью. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Более того, гуманизированное антитело/фрагмент антитела может содержать остатки, которые не обнаружены ни в реципиентном антителе, ни в импортированной CDR или каркасных последовательностях. Данные модификации могут дополнительно улучшать и оптимизировать эффективности антител или фрагментов антител. В целом, гуманизированное антитело или фрагмент антитела будут содержать практически все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или практически все области CDR соответствуют таким областям иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, а все или значительная часть областей FR являются областями последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело или фрагмент антитела также могут содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, из иммуноглобулина человека. Для получения дополнительной информации см. Jones et al., *Nature*, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-329, 1988; Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596,



1992.

**[0098]** «Человеческий» или «полностью человеческий» относится к иммуноглобулину, такому как антитело или фрагмент антитела, где вся молекула будет человеческого происхождения или будет состоять из аминокислотной последовательности, идентичной человеческой форме антитела или иммуноглобулина.

**[0099]** Термин «выделенный» означает измененный или удаленный из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественно присутствующие в живом существе, не являются «выделенными», однако эта же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сосуществующих материалов в естественном состоянии, будут «выделенными». Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в по существу очищенной форме или могут существовать в чужеродной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

**[0100]** В контексте настоящего изобретения для часто встречающихся оснований нуклеиновых кислот используются следующие сокращения. «А» относится к аденозину, «С» относится к цитозину, «G» относится к гуанозину, «Т» относится к тимидину, а «U» относится к уридину.

**[0101]** Термин «консервативные модификации в последовательностях» относится к аминокислотным модификациям, которые в значительной степени не влияют и не изменяют характеристики связывания антитела или фрагмента антитела, содержащего аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают в себя аминокислотные замещения, вставки и делеции. Модификации могут быть внесены в антитело или фрагмент антитела по настоящему изобретению с помощью стандартных способов, известных в данной области техники, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замещения — это такие замещения, в которых аминокислотный остаток замещают аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники. Эти семейства включают в себя аминокислоты с основными боковыми цепями (*например*, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (*например*, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (*например*, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (*например*, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (*например*, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (*например*, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или более аминокислотных остатков в пределах TFR по

настоящему изобретению могут быть замещены другими аминокислотными остатками из одного и того же семейства боковых цепей, а измененный TFR может быть протестирован с помощью функциональных анализов, описанных в настоящем документе.

**[0102]** Термин «функционально соединенный» или «транскрипционный контроль» относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной нуклеотидной последовательностью, которая приводит к экспрессии последней. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты является функционально соединенной со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты попадает в функциональную взаимосвязь со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор является функционально соединенным с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Функционально соединенные последовательности ДНК могут быть смежными друг с другом и, *например*, если необходимо соединить две кодирующие белок области, находиться в одной и той же рамке считывания.

**[0103]** Термин «парентеральное» введение иммуногенной композиции включает в себя, *например*, подкожную (п/к), внутривенную (в/в), внутримышечную (в/м) или внутригрудинную инъекцию, внутриопухолевое введение или методы инфузии.

**[0104]** Термин «нуклеиновая кислота» или «полинуклеотид» относится к дезоксирибонуклеиновым кислотам (ДНК) или рибонуклеиновым кислотам (РНК) и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме. При отсутствии специальных ограничений данный термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, обладающие свойствами связывания, аналогичными свойствам эталонной нуклеиновой кислоты, и метаболизирующиеся аналогично нуклеотидам природного происхождения. Если не указано иное, то конкретная последовательность нуклеиновых кислот также неявно включает их консервативно модифицированные варианты (*например*, замещения вырожденных кодонов), аллели, ортологи, ОНП и комплементарные последовательности, а также последовательность, указанную явно. Конкретно, замещения вырожденных кодонов можно получать, генерируя последовательности, в которых третье положение одного или более из выбранных (или всех) кодонов замещено остатками смешанных оснований и/или дезоксиинозина (Batzet et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

**[0105]** Термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и относятся к соединению, содержащему аминокислотные остатки, ковалентно связанные

пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и не ограничивается максимальным количеством аминокислот, которые могут содержать последовательность белка или пептида. Полипептиды включают в себя любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Как используется в настоящем документе, этот термин относится как к коротким цепям, которые в данной области техники также часто называются пептидами, олигопептидами и олигомерами, например, так и к более длинным цепям, которые в данной области техники обычно называются белками, которых существует множество типов. К «полипептидам» относятся, например, биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, слитые белки, среди прочих. Полипептид включает в себя природный пептид, рекомбинантный пептид или их комбинацию.

**[0106]** Термин «промотор» относится к последовательности ДНК, распознаваемой клеточным аппаратом транскрипции или введенным синтетическим аппаратом, необходимыми для инициации специфической транскрипции полинуклеотидной последовательности.

**[0107]** Термин «промоторная/регуляторная последовательность» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая необходима для экспрессии продукта гена, функционально соединенного с промоторной/регуляторной последовательностью. В некоторых случаях эта последовательность может являться последовательностью корового промотора, а в других случаях эта последовательность может также включать в себя энхансерную последовательность и другие регуляторные элементы, которые необходимы для экспрессии продукта гена. Промоторная/регуляторная последовательность может, например, быть такой, которая экспрессирует продукт гена тканеспецифическим способом.

**[0108]** Термин «конститутивный» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, если она функционально соединена с полинуклеотидом, кодирующим или определяющим продукт гена, вызывает выработку продукта гена в клетке при большинстве или всех физиологических условиях клетки.

**[0109]** Термин «индуцибельный» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, если она функционально соединена с полинуклеотидом, кодирующим или определяющим продукт гена, вызывает выработку продукта гена в клетке по существу только тогда, когда в клетке присутствует индуктор, который соответствует этому промотору.

**[0110]** Термин «тканеспецифический» промотор относится к нуклеотидной

последовательности, которая, если она функционально соединена с полинуклеотидом, кодирующим ген или определяющимся геном, вызывает выработку продукта гена в клетке по существу только в том случае, если клетка представляет собой клетку такого типа ткани, который соответствует промотору.

**[0111]** Термины «линкер» и «гибкий полипептидный линкер», употребляемые в контексте scFv, относятся к пептидному линкеру, который состоит из аминокислот, таких как глициновые и/или сериновые остатки, используемые отдельно или в комбинации, для соединения вместе вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи. В одном варианте осуществления гибкий полипептидный линкер представляет собой линкер Gly/Ser и содержит аминокислотную последовательность (Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub>, где n — это положительное целое число, которое равняется или больше 1. Например, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5, n=6, n=7, n=8, n=9 и n=10. В одном варианте осуществления гибкий полипептидный линкер включает в себя, помимо прочего, (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub> или (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>. В другом варианте осуществления линкеры включают в себя множество повторов (Gly<sub>2</sub>Ser), (GlySer) или (Gly<sub>3</sub>Ser). В объем настоящего изобретения также включены линкеры, описанные в WO2012/138475 (включен в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых случаях линкерная последовательность содержит длинную линкерную (ДЛ) последовательность. В некоторых случаях длинная линкерная последовательность содержит (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>, где n = от 2 до 4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит короткую линкерную (КЛ) последовательность. В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>, где n = от 1 до 3.

**[0112]** Как используется в настоящем документе, 5'-кэп (также называемый кэп РНК, кэп РНК 7-метилгуанозин или кэп РНК m7G) представляет собой модифицированный гуаниновый нуклеотид, который добавили в «переднюю часть» или к 5'-концу эукариотической матричной РНК вскоре после начала транскрипции. 5'-кэп состоит из концевой группы, которая связана с первым транскрибированным нуклеотидом. Его присутствие является критическим для распознавания рибосомой и защиты от РНКаз. Добавление кэпа связано с транскрипцией и происходит котранскрипционно таким образом, что одно влияет на другое. Вскоре после начала транскрипции 5'-конец синтезируемой мРНК связывается с синтезирующим кэп комплексом, связанным с РНК-полимеразой. Этот ферментный комплекс катализирует химические реакции, необходимые для кэпирования мРНК. Синтез протекает как многоступенчатая биохимическая реакция. Кэпирующий фрагмент может быть модифицирован для модуляции функциональности мРНК, такой как ее стабильность или эффективность трансляции.

**[0113]** Как используется в настоящем документе, термин «транскрибированная *in vitro*

РНК» относится к РНК, предпочтительно мРНК, которая была синтезирована *in vitro*. В целом, транскрибированную *in vitro* РНК получают из *in vitro* транскрипционного вектора. *In vitro* транскрипционный вектор содержит матрицу, которая используется для получения транскрибированной *in vitro* РНК.

**[0114]** Как используется в настоящем документе, «поли(А)» представляет собой серию аденозинов, присоединенных путем полиаденилирования к мРНК. В предпочтительном варианте осуществления конструкции для временной экспрессии поли(А) находится между 50 и 5000, предпочтительно более чем 64, более предпочтительно более чем 100, наиболее предпочтительно более чем 300 или 400. Последовательности поли(А) могут быть модифицированы химически или ферментативно для модуляции функциональности мРНК, такой как локализация, стабильность или эффективность трансляции.

**[0115]** Используемый в данном документе, термин «полиаденилирование» относится к ковалентной связи полиаденилового фрагмента или его модифицированного варианта с молекулой матричной РНК. У эукариот большинство молекул матричной РНК (мРНК) являются полиаденилированными на 3'-конце. 3'-поли(А)-хвост представляет собой длинную последовательность адениновых нуклеотидов (часто несколько сотен), добавленных к пре-мРНК посредством действия фермента полиаденилат-полимеразы. У высших эукариот поли(А)-хвост добавляют на транскрипты, которые содержат конкретную последовательность, сигнал полиаденилирования. Поли(А)-хвост и связанный с ним белок способствуют защите мРНК от деградации экзонуклеазами. Полиаденилирование также является важным для терминации транскрипции, экспорта мРНК из ядра и трансляции. Полиаденилирование происходит в ядре непосредственно после транскрипции ДНК в РНК, однако может дополнительно происходить позже в цитоплазме. После окончания транскрипции цепь мРНК расщепляется действием комплекса эндонуклеазы, связанного с РНК-полимеразой. Участок расщепления, как правило, характеризуется присутствием последовательности оснований AAUAAA возле участка расщепления. После расщепления мРНК аденозиновые остатки добавляют к свободному 3'-концу на участке расщепления.

**[0116]** Как используется в настоящем документе, «временный» относится к экспрессии неинтегрированного трансгена в течение периода времени, выраженного в часах, днях или неделях, причем период времени экспрессии меньше, чем период времени для экспрессии гена, интегрированного в геном или содержащегося в стабильном репликоне плазмиды в клетке-хозяине.

**[0117]** Термин «путь передачи сигнала» относится к биохимической взаимосвязи между различными молекулами передачи сигналов, которые играют роль в передаче сигнала от одной части клетки к другой части клетки. Фраза «рецептор клеточной поверхности»

включает в себя молекулы и комплексы молекул, способные принимать сигнал и передавать его через мембрану клетки.

**[0118]** Термин «субъект» предназначен для включения в себя живых организмов, у которых может быть вызван иммунный ответ (*например*, млекопитающие, человек).

**[0119]** Термин «по существу очищенная» клетка относится к клетке, которая практически не содержит другие типы клеток. По существу очищенная клетка также относится к клетке, которая была отделена от других типов клеток, с которыми она обычно связана в своем естественном состоянии. В некоторых случаях популяция по существу очищенных клеток относится к гомогенной популяции клеток. В других случаях этот термин относится просто к клеткам, которые были отделены от клеток, с которыми они естественным образом связаны в своем естественном состоянии. В некоторых аспектах эти клетки культивируются *in vitro*. В других аспектах эти клетки не культивируются *in vitro*.

**[0120]** Как используется в настоящем документе, термин «терапевтический» означает лечение. Терапевтический эффект достигается путем уменьшения, подавления, ремиссии или устранения болезненного состояния.

**[0121]** Как используется в настоящем документе, термин «профилактика» означает предотвращение заболевания или болезненного состояния либо их профилактическое лечение.

**[0122]** В контексте настоящего изобретения «опухольный антиген», или «антиген гиперпролиферативного заболевания», или «антиген, связанный с гиперпролиферативным заболеванием» относится к антигенам, которые характерны для конкретных гиперпролиферативных заболеваний. В определенных аспектах антигены гиперпролиферативного заболевания по настоящему изобретению происходят от рака, включая первичную или метастатическую меланому, тимому, лимфому, саркому, рак легкого, рак печени, НХЛ, лейкозы, рак матки, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак почки и аденокарциномы, такие как рак груди, рак простаты, рак яичников, рак поджелудочной железы и тому подобное, но не ограничиваясь ими.

**[0123]** Термин «трансфицированный», или «трансформированный», или «трансдуцированный» относится к процессу, посредством которого экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или вводят в клетку-хозяина. «Трансфицированная», или «трансформированная», или «трансдуцированная» клетка — это клетка, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована с помощью экзогенной нуклеиновой кислоты. Клетка включает первичную клетку субъекта и ее потомство.

**[0124]** Термин «специфически связывается» относится к антителу, фрагменту антитела или конкретному лиганду, который распознает и связывается с распознаваемым партнером по

связыванию (*например*, CD 19), присутствующим в образце, однако который не будет обязательно и по существу распознавать и связываться с другими молекулами в этом образце.

**[0125]** Используемый в данном документе термин «мегануклеаза» относится к эндонуклеазе, которая связывает двухцепочечную ДНК с последовательностью распознавания, которая превышает 12 пар оснований. Предпочтительно последовательность распознавания мегануклеазы по настоящему изобретению составляет 22 пары оснований. Мегануклеаза может быть эндонуклеазой, полученной из I-Crel, и может относиться к сконструированному варианту I-Crel, который был модифицирован относительно природного I-Crel, например, в отношении специфичности связывания ДНК, активности расщепления ДНК, ДНК-связывающей аффинности или свойств димеризации. Способы получения таких модифицированных вариантов I-Crel известны в данной области техники (*например*, WO 2007/047859). Используемая в данном документе мегануклеаза связывается с двухцепочечной ДНК как гетеродимер или как «одноцепочечная мегануклеаза», в которой пара ДНК-связывающих доменов объединена в один полипептид с использованием пептидного линкера. Термин «хоуминг-эндонуклеаза» является синонимом термина «мегануклеаза». Мегануклеазы по настоящему изобретению являются по существу нетоксичными при экспрессии в клетках, особенно в человеческих Т-клетках, так что клетки можно трансфицировать и поддерживать при 37 °С без наблюдения вредного воздействия на жизнеспособность клеток или значительного снижения активности расщепления мегануклеаз при измерении с использованием методов, описанные в данном документе.

**[0126]** Используемый в данном документе термин «одноцепочечная мегануклеаза» относится к полипептиду, содержащему пару субъединиц нуклеазы, соединенных линкером. Одноцепочечная мегануклеаза имеет организацию: N-концевая субъединица - Линкер - C-концевая субъединица. Две субъединицы мегануклеазы обычно не идентичны по аминокислотной последовательности и распознают неидентичные последовательности ДНК. Таким образом, одноцепочечные мегануклеазы обычно расщепляют псевдопалиндромные или непалиндромные последовательности распознавания. Одноцепочечная мегануклеаза может называться «одноцепочечной гетеродимерной» или «одноцепочечной гетеродимерной мегануклеазой», хотя на самом деле она не является димерной. Для ясности, если не указано иное, термин «мегануклеаза» может относиться к димерной или одноцепочечной мегануклеазе.

**[0127]** Используемый в данном документе термин «TALEN» относится к эндонуклеазе, содержащей ДНК-связывающий домен, содержащий 16-22 повторов домена TAL, слитых с

любой частью домена нуклеазы FokI.

**[0128]** Используемый в данном документе термин «компактный TALEN» относится к эндонуклеазе, содержащей ДНК-связывающий домен с 16-22 повторами домена TAL, слитыми в любой ориентации с любой каталитически активной частью нуклеазного домена хоуминг-эндонуклеазы I-TevI. **[0129]** Используемый в данном документе термин «CRISPR» относится к эндонуклеазе на основе каспазы, содержащей каспазу, такую как Cas9, и направляющую РНК, которая направляет расщепление ДНК каспазы путем гибридизации с сайтом узнавания в геномной ДНК.

**[0130]** В контексте настоящего описания термин «мегаTAL» относится к одноцепочечной нуклеазе, содержащей подобный активаторам транскрипции эффекторный (TALE) ДНК-связывающий домен, со сконструированной, последовательность-специфичной хоуминг-эндонуклеазой.

**[0131]** Диапазоны: по всему тексту этого описания различные аспекты изобретения могут быть представлены в виде диапазонов. Следует понимать, что описание в виде диапазонов предоставляется

исключительно для удобства и краткости, и его не следует воспринимать как негибкое ограничение объема настоящего изобретения. Соответствующим образом, описание диапазона следует считать таким, которое конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах этого диапазона. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, следует считать таким, которое конкретно раскрывает поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. п.; а также отдельные числа в пределах этого диапазона, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. В качестве другого примера, диапазон, такой как 95-99% идентичности, включает что-либо с 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности, а также включает такие поддиапазоны, как 96-99%, 96-98%, 96-97%, 97-99%, 97-98% и 98-99% идентичности. Это применяется независимо от ширины диапазона.

## **ОПИСАНИЕ**

**[0132]** В настоящем документе предложены композиции веществ и способы применения для лечения такого заболевания, как рак, с использованием модифицированных Т-клеток, содержащих слитый белок Т-клеточных рецепторов (TCR) (TFP и константный домен TCR, причем модифицированная Т-клетка также имеет функционально нарушенную эндогенную субъединицу TCR. Используемый в данном документе термин «слитый белок Т-клеточного рецептора (TCR)» или «TFP» включает рекомбинантный полипептид, полученный из различных полипептидов, содержащих TCR, который обычно способен i) связываться с



поверхностным антигеном на клетках-мишенях и ii) взаимодействовать с другими полипептидными компонентами интактного комплекса TCR, как правило, когда они совместно расположены внутри или на поверхности T-клетки. Как предлагается в настоящем документе, TFP обеспечивают значительные преимущества по сравнению с химерными антигенными рецепторами. Термин «химерный антигенный рецептор» или альтернативно «CAR» относится к рекомбинантному полипептиду, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен в форме scFv, трансмембранный домен и домены цитоплазматической сигнализации (также называемые в настоящем документе как «внутриклеточные сигнальные домены»), содержащие функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы, как определено ниже. В целом, центральный внутриклеточный сигнальный домен CAR получают из дзета цепи CD3, которая обычно связана с комплексом TCR. Сигнальный домен CD3 дзета может быть конденсирован с одним или более функциональных сигнальных доменов, полученных из по меньшей мере одной костимулирующей молекулы, такой как 4-1BB (т. е., CD137), CD27 и/или CD28.

#### **Слитые белки Т-клеточного рецептора (TCR) (TFP)**

[0133] Настоящее изобретение охватывает конструкции рекомбинантной ДНК, кодирующие TFP, причем TFP содержит фрагмент антитела, который специфически связывается с CD 19, *например*, человеческим CD 19, причем последовательность фрагмента антитела является смежной с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей субъединицу TCR или ее часть, и находится с ней в одной рамке считывания. Настоящее изобретение охватывает конструкции рекомбинантной ДНК, кодирующие TFP, причем TFP содержит фрагмент антитела, который специфически связывается с ВСМА, *например*, человеческим ВСМА, причем последовательность фрагмента антитела является смежной с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей субъединицу TCR или ее часть, и находится с ней в одной рамке считывания. Настоящее изобретение охватывает конструкции рекомбинантной ДНК, кодирующие TFP, причем TFP содержит фрагмент антитела, который специфически связывается с ROR1, *например*, человеческим ROR1, причем последовательность фрагмента антитела является смежной с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей субъединицу TCR или ее часть, и находится с ней в одной рамке считывания. Настоящее изобретение охватывает конструкции рекомбинантной ДНК, кодирующие TFP, причем TFP содержит фрагмент антитела, который специфически связывается с CD22, *например*, человеческим CD22, причем последовательность фрагмента антитела является смежной с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей субъединицу TCR или ее часть, и находится с ней в

одной рамке считывания. TFR, представленные в настоящем документе, способны связываться с одной или более эндогенными (или альтернативно, с одной или более экзогенными или с комбинацией эндогенных и экзогенных) субъединицами TCR с целью образования функционального комплекса TCR.

**[0134]** В одном аспекте TFR по настоящему изобретению содержит мишень-специфический элемент связывания, иначе называемый антигенсвязывающим доменом. Выбор фрагмента зависит от типа и количества антигенов-мишеней, которые определяют поверхность клетки-мишени. Например, антигенсвязывающий домен может выбираться для распознавания антигена-мишени, который выступает в качестве маркера клеточной поверхности на клетках-мишенях, связанных с конкретным болезненным состоянием. Таким образом, примеры маркеров клеточной поверхности, которые могут выступать в качестве антигенов-мишеней для антигенсвязывающего домена в TFR по настоящему изобретению, включают в себя маркеры, связанные с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями; аутоиммунными заболеваниями и раковыми заболеваниями (*например*, злокачественными заболеваниями).

**[0135]** В одном аспекте TFR-опосредованный Т-клеточный ответ может быть направлен на представляющий интерес антиген путем встраивания антигенсвязывающего домена в TFR, который специфически связывается с желаемым антигеном.

**[0136]** В одном аспекте часть TFR, содержащая антигенсвязывающий домен, содержит антигенсвязывающий домен, который нацелен на CD 19. В одном аспекте антигенсвязывающий домен нацелен на человеческий CD19. В одном аспекте часть TFR, содержащая антигенсвязывающий домен, содержит антигенсвязывающий домен, который нацелен на ВСМА. В одном аспекте антигенсвязывающий домен нацелен на человеческий ВСМА.

**[0137]** Антигенсвязывающий домен может представлять собой любой домен, который связывается с антигеном, включая, помимо прочего, моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело и их функциональные фрагменты, включая, помимо прочего, однодоменное антитело, такое как переменный домен тяжелой цепи ( $V_H$ ), переменный домен легкой цепи ( $V_L$ ) и переменный домен ( $V_{HH}$ ) нанотела верблюжьего происхождения, а также с альтернативным каркасом, известным в данной области техники, который функционирует в качестве антигенсвязывающего домена, таким как домен рекомбинантного фибронектина, антикалин, DARPIN и т. п. Аналогично, природный или синтетический лиганд, специфически распознающий и связывающийся с антигеном-мишенью, может использоваться в качестве антигенсвязывающего домена для TFR. В

некоторых случаях было бы полезно, чтобы антигенсвязывающий домен был получен от того же вида, в котором TFP будет в конечном итоге использоваться. Например, для использования у людей было бы полезно, чтобы антигенсвязывающий домен TFP содержал человеческие или гуманизированные остатки для антигенсвязывающего домена антитела или фрагмента антитела.

**[0138]** Таким образом, в одном аспекте антигенсвязывающий домен содержит гуманизированное или человеческое антитело или фрагмент антитела, или мышинное антитело или фрагмент антитела. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий связывающий домен против CD19 или против ВСМА содержит одну или более (*например*, все три) из определяющей комплементарности области 1 легкой цепи (CDR1 LC), определяющей комплементарности области 2 легкой цепи (CDR2 LC), и определяющей комплементарности области 3 легкой цепи (CDR3 LC) описанного в настоящем документе гуманизированного или человеческого связывающего домена против CD19 или против ВСМА и/или одну или более (*например*, все три) из определяющей комплементарности области 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющей комплементарности области 2 тяжелой цепи (CDR2 HC), и определяющей комплементарности области 3 тяжелой цепи (CDR3 HC) описанного в настоящем документе гуманизированного или человеческого связывающего домена против CD 19, *например*, гуманизированный или человеческий связывающий домен против CD 19 или против ВСМА содержит одну или более, например, все три, CDR LC и одну или несколько, *например*, все три, CDR HC. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий связывающий домен против CD 19 содержит одну или более (*например*, все три) из определяющей комплементарности области 1 тяжелой цепи (HC CDR1), определяющей комплементарности области 2 тяжелой цепи (HC CDR2) и определяющей комплементарности области 3 тяжелой цепи (HC CDR3) гуманизированного или человеческого связывающего домена против CD 19 или против ВСМА, описанного в данном документе, *например*, гуманизированный или человеческий связывающий домен против CD 19 или против ВСМА имеет две переменные области тяжелой цепи, каждая из которых содержит CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC, описанные в данном документе. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий связывающий домен против CD19 или против ВСМА содержит гуманизованную или человеческую переменную область легкой цепи, описанную в настоящем документе, и/или гуманизованную или человеческую переменную область тяжелой цепи, описанную в настоящем документе. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий связывающий домен против CD 19 или против ВСМА содержит

гуманизованную или человеческую переменную область тяжелой цепи, описанную в настоящем документе, *например*, по меньшей мере две гуманизованные или человеческие переменные области тяжелой цепи, описанные в настоящем документе. В одном варианте осуществления связывающий домен против CD19 или против ВСМА представляет собой scFv, содержащий легкую цепь и тяжелую цепь аминокислотной последовательности, представленной в настоящем документе. В одном варианте осуществления связывающий домен против CD 19 или против ВСМА (*например*, scFv) содержит: переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (*например*, замещения), но не более 30, 20 или 10 модификаций (*например*, замещений) аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи, представленной в настоящем документе, или последовательность с 95–99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в настоящем документе; и/или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (*например*, замещения), но не более 30, 20 или 10 модификаций (*например*, замещений) аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в настоящем документе, или последовательность с 95–99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в настоящем документе. В одном варианте осуществления гуманизованной или человеческой связывающий домен против CD19 или против ВСМА представляет собой scFv, а переменная область легкой цепи, содержащая аминокислотную последовательность, описанную в настоящем документе, присоединена к переменной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в настоящем документе, посредством линкера, *например*, линкера, описанного в настоящем документе. В одном варианте осуществления гуманизованной связывающий домен против CD 19 или против ВСМА включает в себя линкер  $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_n$ , где  $n$  равняется 1, 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно 3 или 4. Переменная область легкой цепи и переменная область тяжелой цепи scFv могут быть, *например*, в любой из следующих ориентаций: переменная область легкой цепи–линкер–переменная область тяжелой цепи или переменная область тяжелой цепи–линкер–переменная область легкой цепи. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит длинную линкерную (ДЛ) последовательность. В некоторых случаях длинная линкерная последовательность содержит  $(\text{G}_4\text{S})_n$ , где  $n$  = от 2 до 4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит короткую линкерную (КЛ) последовательность. В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит  $(\text{G}_4\text{S})_n$ , где  $n$  = от 1 до 3.

**[0139]** В некоторых аспектах нечеловеческое антитело является гуманизированным, где конкретные последовательности или участки антитела модифицируют для повышения сходства с антителом, которое естественным образом вырабатывается у человека, или его фрагментом. В одном аспекте антигенсвязывающий домен является гуманизированным.

**[0140]** Гуманизированное антитело может быть получено с помощью различных методик, известных в данной области техники, включая, помимо прочего, CDR-прививки (см., *например*, Европейский патент EP 239400; международную публикацию WO 91/09967 и патенты США 5225539, 5530101 и 5585089, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки), маскировку поверхностных остатков или изменение поверхности (см., *например*, Европейские патенты EP 592106 и EP 519596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814 и Roguska et al., 1994, *PNAS*, 91:969-973, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки), перестановку цепей (см., *например*, патент США 5565332, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки), а также методики, описанные, например, в публикации заявки на патент США US2005/0042664, публикации заявки на патент США US2005/0048617, патенте США 6407213, в патенте США 5766886, международной публикации WO 9317105, Tan et al., *J. Immunol.*, 169:1119-25 (2002), Caldas et al., *Protein Eng.*, 13(5):353-60 (2000), Morea et al., *Methods*, 20(3):267-79 (2000), Baca et al., *J. Biol. Chem.*, 272(16): 10678-84 (1997), Roguska et al., *Protein Eng.*, 9(10):895-904 (1996), Couto et al., *Cancer Res.*, 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., *Cancer Res.*, 55(8): 1717-22 (1995), Sandhu J S, *Gene*, 150(2):409-10 (1994), и Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235(3):959-73 (1994), полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Часто каркасные остатки в каркасных областях будут замещены соответствующим остатком из антитела-донора CDR для изменения, например, улучшения связывания с антигеном. Эти каркасные замещения идентифицируются с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, *например*, путем моделирования взаимодействий CDR и каркасных остатков для определения каркасных остатков, важных для связывания с антигеном, и сравнения последовательностей для определения необычных каркасных остатков в конкретных положениях (см., *например*, Queen et al., патент США 5585089 и Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки).

**[0141]** Гуманизированное антитело или фрагмент антитела имеет один или более аминокислотных остатков, оставшихся в нем из источника нечеловеческого происхождения. Такие аминокислотные остатки нечеловеческого происхождения часто

называются «импортированными» остатками, которые обычно взяты из «импортированного» варибельного домена. Как представлено в настоящем документе, гуманизированные антитела или фрагменты антител содержат одну или более CDR из молекул иммуноглобулина и каркасных областей нечеловеческого происхождения, причем аминокислотные остатки, содержащие каркас, получены полностью или в основном из зародышевой линии человека. Различные методики гуманизации антител или фрагментов антител хорошо известны в данной области техники и могут преимущественно осуществляться, следуя методу Винтера с сотрудниками (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), путем замещения CDR или последовательностей CDR грызунов на соответствующие последовательности человеческого антитела, т. е., CDR-прививки (EP 239400; публикация согласно PCT WO 91/09967 и патент США 4816567; 6331415; 5225539; 5530101; 5585089; 6548640, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки). В таких гуманизированных антителах и фрагментах антител по существу менее чем интактный человеческий варибельный домен был замещен соответствующей последовательностью отличного от человека вида. Гуманизированные антитела часто являются человеческими антителами, в которых некоторые остатки CDR и, вероятно, некоторые каркасные (FR) остатки замещены остатками аналогичных участков антител грызунов. Гуманизация антител и фрагментов антител также может достигаться путем маскировки поверхностных остатков, или изменения поверхности (EP 592106; EP 519596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., *Protein Engineering*, 7(6):805-814 (1994) и Roguska et al., *PNAS*, 91:969-973 (1994)), или перестановки цепей (патент США 5565332), полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

**[0142]** Выбор человеческих варибельных доменов, как легких, так и тяжелых, которые будут использоваться для создания гуманизированных антител, заключается в уменьшении антигенности. Согласно так называемому методу «наилучшего соответствия» проводится скрининг последовательности варибельного домена антитела грызуна по всей библиотеке известных человеческих последовательностей варибельного домена. Человеческая последовательность, которая будет ближайшей к последовательности грызуна, затем принимается за человеческий каркас (FR) для гуманизированного антитела (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987), полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки). В другом методе используют конкретный каркас, полученный из консенсусной последовательности всех человеческих антител конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Аналогичный

каркас может использоваться для нескольких различных гуманизированных антител (см., *например*, Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993), полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления каркасную область, *например*, все четыре каркасные области, вариабельной области тяжелой цепи получают из последовательности зародышевой линии V<sub>H</sub>4-4-59. В одном варианте осуществления каркасная область может содержать одну, две, три, четыре или пять модификаций, *например*, замещений, *например*, из аминокислоты в соответствующей мышиной последовательности. В одном варианте осуществления каркасная область, *например*, все четыре каркасные области вариабельного участка легкой цепи получают из последовательности зародышевой линии VK3-1.25. В одном варианте осуществления каркасная область может содержать одну, две, три, четыре или пять модификаций, *например*, замещений, *например*, из аминокислоты в соответствующей мышиной последовательности.

**[0143]** В некоторых аспектах часть композиции TFR по настоящему изобретению, которая содержит фрагмент антитела, является гуманизированной с сохранением высокой аффинности к антигену-мишени и других предпочтительных биологических свойств. В соответствии с одним аспектом изобретения гуманизированные антитела и фрагменты антител получают в процессе анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов, используя трехмерные модели исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулина являются общедоступными и известны специалистам в данной области техники. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают возможные трехмерные конформационные структуры выбранных кандидатных последовательностей иммуноглобулина. Изучение таких отображений позволяет провести анализ вероятной роли остатков в функционировании потенциально пригодных последовательностей иммуноглобулина, *например*, анализ остатков, которые влияют на способность потенциально пригодного иммуноглобулина связываться с антигеном-мишенью. Следовательно, FR-остатки могут выбираться и объединяться из реципиентных и импортированных последовательностей, таким образом, что будет достигаться характеристика желаемого антитела или фрагмента антитела, такая как повышенная аффинность к антигену-мишени. В целом, остатки CDR непосредственно и в существенной степени вовлечены в воздействие на связывание с антигеном.

**[0144]** Гуманизированное антитело или фрагмент антитела может сохранять аналогичную антигенную специфичность, что и исходное антитело, *например*, в настоящем изобретении

способность связываться с человеческим CD 19. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело или фрагмент антитела может иметь улучшенную аффинность и/или специфичность связывания с человеческим CD 19 или человеческим ВСМА.

**[0145]** В одном аспекте связывающий домен против CD19 или против ВСМА характеризуется конкретными функциональными особенностями или свойствами антитела или фрагмента антитела. Например, в одном аспекте часть композиции TFP по настоящему изобретению, которая содержит антигенсвязывающий домен, специфически связывается с человеческим CD19 или человеческим ВСМА. В одном аспекте антигенсвязывающий домен имеет такую же или схожую специфичность связывания с человеческим CD 19, что и FMC63 scFv, описанный у Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997). В одном аспекте изобретение относится к антигенсвязывающему домену, содержащему антитело или фрагмент антитела, причем антигенсвязывающий домен специфически связывается с белком CD 19 или ВСМА или его фрагментом, причем антитело или фрагмент антитела содержит переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи, которая включает в себя аминокислотную последовательность, представленную в настоящем документе. В некоторых аспектах scFv является смежным с лидерной последовательностью и находится с ней в одной рамке считывания.

**[0146]** В одном аспекте связывающий домен против CD19 или против ВСМА представляет собой фрагмент, *например*, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). В одном аспекте связывающий домен против CD19 представляет собой Fv, Fab, (Fab')<sub>2</sub> или бифункциональное (*например*, биспецифическое) гибридное антитело (*например*, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). В одном аспекте антитела и их фрагменты согласно настоящему изобретению связывают белок CD 19 с аффинностью дикого типа или с повышенной аффинностью.

**[0147]** Также в настоящем документе предлагаются способы получения антигенсвязывающего домена антитела, специфического к антигену-мишени (*например*, к CD 19, ВСМА или любому антигену-мишени, описанному в другом месте настоящего документе, для нацеливания связывающих доменов гибридного фрагмента), при этом способ включает в себя обеспечение путем добавления, делеции, замещения или вставки одной или более аминокислот в аминокислотной последовательности домена V<sub>H</sub>, указанного в настоящем документе, причем домен V<sub>H</sub>, который является вариантом аминокислотной последовательности домена V<sub>H</sub>, необязательно объединяет предоставленный таким образом домен V<sub>H</sub> с одним или более доменов V<sub>L</sub>, и тестирование домена V<sub>H</sub> или комбинации, или комбинаций V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> для выявления конкретного члена связывания или антигенсвязывающего домена антитела, специфического к



представляющему интерес антигену-мишени (*например*, CD 19 или ВСМА) и необязательно имеющего одно или более желаемых свойств.

**[0148]** В некоторых случаях домены  $V_H$  и scFv могут быть получены в соответствии со способом, известным в данной области техники (см., например, Bird et al., (1988) Science 242:423-426 and Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Молекулы scFv могут быть получены путем связывания вместе участков  $V_H$  и  $V_L$ , используя гибкие полипептидные линкеры. Молекулы scFv содержат линкер (*например*, линкер Ser-Gly) с оптимизированной длиной и/или аминокислотной композицией. Длина линкера может в значительной степени повлиять на то, каким образом будут складываться и взаимодействовать переменные участки. Фактически, если используется короткий полипептидный линкер (*например*, между 5 и 10 аминокислотами), предотвращается внутрицепочечное складывание. Внутрицепочечное складывание также требуется для того, чтобы соединить два переменных участка вместе для образования участка связывания функционального эпитопа. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит длинную линкерную (ДЛ) последовательность. В некоторых случаях длинная линкерная последовательность содержит  $(G_4S)_n$ , где  $n =$  от 2 до 4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит короткую линкерную (КЛ) последовательность. В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит  $(G_4S)_n$ , где  $n =$  от 1 до 3. Примеры ориентации и размеров линкера см., *например*, в Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, публикациях патентных заявок США 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794 и публикациях PCT WO 2006/020258 и WO 2007/024715, включенных в настоящее описание посредством ссылки.

**[0149]** scFv может содержать линкер с около 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более чем 15 остатками между его областями  $V_L$  и  $V_H$ . Линкерная последовательность может содержать любую встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит аминокислоты глицин и серин. В другом варианте осуществления линкерная последовательность содержит наборы глициновых и сериновых повторов, таких как  $(Gly_4Ser)_n$ , где  $n$  — это положительное целое число, которое равняется или больше 1. В одном варианте осуществления линкер может представлять собой  $(Gly_4Ser)_4$  или  $(Gly_4Ser)_3$ . Вариации длины линкера могут сохранять или повышать активность, обуславливая превосходную эффективность в исследованиях активности. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит длинную линкерную (ДЛ) последовательность. В некоторых случаях длинная линкерная последовательность содержит  $(G_4S)_n$ , где  $n =$  от 2 до 4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит короткую линкерную (КЛ) последовательность. В некоторых случаях короткая

линкерная последовательность содержит  $(G_4S)_n$ , где  $n =$  от 1 до 3.

### Стабильность и мутации

**[0150]** Стабильность связывающего домена против CD 19 или против ВСМА, *например*, молекул scFv (*например*, растворимого scFv), можно оценивать по отношению к биофизическим свойствам (*например*, термической стабильности) традиционной контрольной молекулы scFv или полноразмерного антитела. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий scFv обладает термической стабильностью, которая составляет более чем около 0,1, около 0,25, около 0,5, около 0,75, около 1, около 1,25, около 1,5, около 1,75, около 2, около 2,5, около 3, около 3,5, около 4, около 4,5, около 5, около 5,5, около 6, около 6,5, около 7, около 7,5, около 8, около 8,5, около 9, около 9,5, около 10 градусов, около 11 градусов, около 12 градусов, около 13 градусов, около 14 градусов или около 15 градусов Цельсия по сравнению с родительским scFv в описанных анализах.

**[0151]** Улучшенная термическая стабильность связывающего домена против CD 19 или против ВСМА, *например*, scFv, впоследствии будет присуща всей конструкции CD19-TFP, что приведет к улучшению терапевтических свойств конструкции TFP против CD19 или против ВСМА. Термическую стабильность связывающего домена против CD 19 или против ВСМА, *например*, scFv, можно улучшить на по меньшей мере около 2 °C или 3 °C по сравнению с традиционным антителом. В одном варианте осуществления связывающий домен против CD19 или против ВСМА, *например*, scFv, имеет улучшенную на 1 °C термическую стабильность по сравнению с традиционным антителом. В другом варианте осуществления связывающий домен против CD19, *например*, scFv, имеет улучшенную на 2 °C термическую стабильность по сравнению с традиционным антителом. В другом варианте осуществления scFv имеет на 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C или 15 °C улучшенную термическую стабильность по сравнению с обычным антителом. Сравнения можно проводить, например, между молекулами scFv, описанными в настоящем документе, и молекулами scFv или Fab-фрагментами антитела, из которого были получены  $V_H$  и  $V_L$  scFv. Термическую стабильность можно измерить с помощью способов, известных в данной области техники. Например, в одном варианте осуществления можно измерить  $T_M$ . Способы измерения  $T_M$  и другие способы определения стабильности белка более подробно описаны ниже.

**[0152]** Мутации в scFv (возникающие вследствие гуманизации или мутагенеза растворимого scFv) изменяют стабильность scFv и улучшают общую стабильность scFv и конструкции TFP против CD19 или против ВСМА. Стабильность гуманизованного scFv сравнивают по отношению к мышинному scFv, используя измерения, такие как  $T_M$ ,

температурная денатурация и температурная агрегация. В одном варианте осуществления связывающий домен против CD 19 или против ВСМА, *например*, scFv, содержит по меньшей мере одну мутацию, возникающую вследствие процесса гуманизации таким образом, что мутировавший scFv обеспечивает улучшенную стабильность в конструкции TFP против CD19. В другом варианте осуществления связывающий домен против CD19, *например*, scFv, содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 мутаций, возникающих вследствие процесса гуманизации таким образом, что мутировавший scFv обеспечивает улучшенную стабильность в конструкции CD19-TFP или ВСМА-TFP.

**[0153]** В одном аспекте антигенсвязывающий домен TFP содержит аминокислотную последовательность, которая является гомологичной с аминокислотной последовательностью антигенсвязывающего домена, описанной в настоящем документе, а антигенсвязывающий домен сохраняет желаемые функциональные свойства фрагментов антител к CD 19 или к ВСМА, описанных в настоящем документе. В одном конкретном аспекте композиция TFP по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В дополнительном аспекте фрагмент антитела содержит scFv.

**[0154]** В различных аспектах антигенсвязывающий домен TFP сконструирован путем модификации одной или более аминокислот в одной или обеих переменных областях (*например*,  $V_H$  и/или  $V_L$ ), *например*, в одной или более областях CDR и/или в одной или более каркасных областях. В одном конкретном аспекте композиция TFP по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В дополнительном аспекте фрагмент антитела содержит scFv.

**[0155]** Специалисту в данной области техники будет понятно, что антитело или фрагмент антитела по настоящему изобретению может дополнительно модифицироваться таким образом, что они будут отличаться в отношении аминокислотной последовательности (*например*, от дикого типа), однако не в отношении желаемой активности. *Например*, дополнительные нуклеотидные замещения, приводящие к аминокислотным замещениям в «заменяемых» аминокислотных остатках, могут быть выполнены для белка. *Например*, заменяемый аминокислотный остаток в молекуле может быть замещен другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. В другом варианте осуществления участок аминокислот может быть замещен структурно аналогичным участком, который отличается порядком и/или композицией членов семейства боковых цепей, *например*, может быть осуществлено консервативное замещение, в котором аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь.

**[0156]** Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были

определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (*например*, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (*например*, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (*например*, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (*например*, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (*например*, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (*например*, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

**[0157]** Процент идентичности в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относится к двум или более последовательностям, которые являются одинаковыми. Две последовательности являются «по существу идентичными», если две последовательности обладают указанным процентным содержанием аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (*например*, 60% идентичности, необязательно 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности в указанной области или, если это не указано, во всей последовательности), при сравнении или выравнивании для максимального совпадения в окне сравнения или обозначенной области, как определено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей, либо путем выравнивания вручную и при визуальной проверке. Необязательно, идентичность существует в отношении области, составляющей в длину по меньшей мере около 50 нуклеотидов (или 10 аминокислот), или более предпочтительно в отношении области, составляющей в длину от 100 до 500 или 1000 или более нуклеотидов (или 20, 50, 200 или более аминокислот).

**[0158]** Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность служит эталонной последовательностью, с которой сравнивают исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей исследуемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости, обозначают координаты последовательности и указывают программные параметры алгоритма для работы с последовательностями. Можно использовать программные параметры по умолчанию или указать альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности последовательностей для исследуемых последовательностей по сравнению с эталонной последовательностью на основании программных параметров. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно выполнять, *например*, посредством алгоритма

локальной гомологии согласно Smith and Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c, алгоритма гомологичного выравнивания согласно Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443, поиска по методу сходства согласно Pearson and Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, путем компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., г. Мэдисон, штат Висконсин, США) или ручного выравнивания и визуального осмотра (см., *например*, Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biology). Двумя примерами алгоритмов, подходящих для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 и Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, соответственно. Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST является общедоступным через Национальный центр биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information).

**[0159]** В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает модификации исходной аминокислотной последовательности антитела или фрагмента (*например*, scFv), которые образуют функционально эквивалентные молекулы. Например,  $V_H$  или  $V_L$  связывающего домена против CD19 или против BCMA, например, scFv, входящего в состав TFR, можно модифицировать для сохранения по меньшей мере около 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности исходной каркасной области  $V_H$  или  $V_L$  связывающего домена против CD19, например, scFv. Настоящее изобретение предусматривает модификации всей конструкции TFR, *например*, модификации одной или более аминокислотных последовательностей различных доменов конструкции TFR, чтобы получить функционально эквивалентные молекулы. Конструкцию TFR можно модифицировать, чтобы сохранить по меньшей мере около или 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности исходной конструкции TFR.

### **Внеклеточный домен**

**[0160]** Внеклеточный домен может быть получен либо из природного, либо из рекомбинантного источника. Если источник является природным, то домен может быть получен из любого белка, однако в частности из связанного с мембраной или трансмембранного белка. В одном аспекте внеклеточный домен способен связываться с трансмембранным доменом. Внеклеточный домен для конкретного применения в настоящем изобретении может включать в себя по меньшей мере внеклеточную область(и), *например*, альфа, бета или дзета цепи Т-клеточного рецептора либо CD3 эпсилон, CD3

гамма или CD3 дельта, или в альтернативных вариантах осуществления CD28, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154.

### Трансмембранный домен

**[0161]** В целом, последовательность TFP содержит внеклеточный домен и трансмембранный домен, кодируемые одной геномной последовательностью. В альтернативных вариантах осуществления TFP может быть сконструирован с возможностью включения в себя трансмембранного домена, который является гетерологичным внеклеточному домену TFP. Трансмембранный домен может включать одну или более дополнительных аминокислот, смежных с трансмембранной областью, *например*, одну или более аминокислот, связанных с внеклеточной областью белка, из которого был получен трансмембранный белок (*например*, по меньшей мере, 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, 30 или более аминокислот внеклеточной области) и/или одну или более дополнительных аминокислот, связанных с внутриклеточной областью белка, из которого был получен трансмембранный белок (*например*, 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, 30 или более аминокислот внутриклеточной области). В некоторых случаях трансмембранный домен может включать по меньшей мере 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 или более аминокислот внеклеточной области. В некоторых случаях трансмембранный домен может включать по меньшей мере 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 или более аминокислот внутриклеточной области. В одном аспекте применяют трансмембранный домен, который связан с одним из доменов в TFP. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть выбран из или модифицирован посредством аминокислотного замещения во избежание связывания таких доменов с трансмембранными доменами аналогичных или различных белков поверхностной мембраны, *например*, для сведения к минимуму взаимодействий с другими членами комплекса рецепторов. В одном аспекте трансмембранный домен способен к гомодимеризации с другим TFP на поверхности TFP-Т-клетки. В другом аспекте аминокислотная последовательность трансмембранного домена может быть модифицирована или замещена таким образом, чтобы минимизировать взаимодействия со связывающими доменами нативного партнера по связыванию, который присутствует в том же TFP.

**[0162]** Трансмембранный домен может быть получен либо из природного, либо из рекомбинантного источника. Если источник является природным, то домен может быть образован из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. В одном аспекте трансмембранный домен способен к передаче сигналов внутриклеточным доменам каждый раз, когда TFP связался с мишенью. Трансмембранный домен для конкретного

применения в настоящем изобретении может включать, по меньшей мере, трансмембранную область(и), *например*, альфа, бета, гамма, дельта или дзета цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154.

**[0163]** В некоторых случаях трансмембранный домен может быть присоединен к внеклеточной области TFP, *например*, антигенсвязывающему домену TFP посредством шарнира, *например*, шарнира из человеческого белка. Например, в одном варианте осуществления шарнир может представлять собой шарнир человеческого иммуноглобулина (Ig), *например*, шарнир IgG4 или шарнир CD8a.

### Линкеры

**[0164]** Необязательно, короткий олиго- или полипептидный линкер длиной от 2 до 10 аминокислот может образовать связь между трансмембранным доменом и цитоплазматической областью TFP. В некоторых случаях линкер может иметь длину, по меньшей мере, около 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более. Глицин-сериновый дублет обеспечивает особенно подходящий линкер. Например, в одном аспекте линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления линкер кодируется нуклеотидной последовательностью GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO: 4).

### Цитоплазматический домен

**[0165]** Цитоплазматический домен TFP может включать в себя внутриклеточный сигнальный домен, если TFP содержит полипептиды CD3 гамма, дельта или эпсилон; субъединицы TCR альфа и TCR бета, как правило, не содержат сигнальный домен. Внутриклеточный сигнальный домен, как правило, отвечает за активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки, в которую был введен TFP. Термин «эффекторная функция» относится к специализированной функции клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность или хелперную активность, в том числе секрецию цитокинов. Таким образом, термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к части белка, которая передает сигнал эффекторной функции и направляет клетку на выполнение специализированной функции. Тогда как обычно может использоваться весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать всю цепь. В той мере, в которой используется усеченная часть внутриклеточного сигнального домена, такая усеченная часть может использоваться вместо интактной цепи до тех пор, пока она будет передавать сигнал эффекторной функции. Таким образом, подразумевается, что термин внутриклеточный сигнальный домен включает в себя любую усеченную часть внутриклеточного сигнального

домена, достаточную для передачи сигнала эффекторной функции.

**[0166]** К примерам внутриклеточных сигнальных доменов для использования в TFP по настоящему изобретению относятся цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR) и корецепторы, которые действуют согласованно для инициации трансдукции сигнала после задействования рецепторов антигенов, а также любое производное или вариант этих последовательностей и любая рекомбинантная последовательность с такой же функциональной способностью.

**[0167]** Известно, что создаваемых только TCR сигналов недостаточно для полной активации интактных Т-клеток и что требуется вторичный и/или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация интактных Т-клеток может опосредоваться двумя различными классами цитоплазматических последовательностей сигнализации: теми, что иницируют антигензависимую первичную активацию посредством TCR (домены первичной внутриклеточной сигнализации), и теми, что действуют независимым от антигенов образом для обеспечения вторичного или костимулирующего сигнала (вторичный цитоплазматический домен, *например*, костимулирующий домен).

**[0168]** Домен первичной сигнализации регулирует первичную активацию комплекса TCR либо стимулирующим путем, либо ингибирующим путем. Домены первичной внутриклеточной сигнализации, действующие стимулирующим путем, могут содержать мотивы сигнализации, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM).

**[0169]** Примеры ITAM, содержащих домены первичной внутриклеточной сигнализации, которые предназначены для конкретного применения в настоящем изобретении, включают в себя ITAM CD3 дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эpsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В одном варианте осуществления TFP по настоящему изобретению содержит внутриклеточный сигнальный домен, *например*, домен первичной сигнализации CD3 эpsilon. В одном варианте осуществления домен первичной сигнализации содержит модифицированный домен ITAM, *например*, мутировавший домен ITAM, который изменил (*например*, повысил или снизил) активность по сравнению с нативным доменом ITAM. В одном варианте осуществления домен первичной сигнализации содержит модифицированный домен первичной внутриклеточной сигнализации, содержащий ITAM, *например*, оптимизированный и/или усеченный домен первичной внутриклеточной сигнализации, содержащий ITAM. В одном варианте осуществления домен первичной сигнализации содержит один, два, три, четыре или более мотивов ITAM.

**[0170]** Внутриклеточный сигнальный домен TFP может содержать сигнальный домен CD3



дзета отдельно или в комбинации с любыми другими желаемыми внутриклеточными сигнальными доменами(-ом), пригодными в контексте TFP по настоящему изобретению. Например, внутриклеточный сигнальный домен TFP может содержать часть эпсилон цепи CD3 и костимулирующий сигнальный домен. Костимулирующий сигнальный домен относится к части TFP, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности, отличающуюся от рецептора антигена или его лигандов, которая требуется для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. К примерам подобных молекул относятся CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD1, ICOS, связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83, и т. п. Например, было показано, что костимуляция CD27 усиливает размножение, эффекторную функцию и выживаемость человеческих TFP-T-клеток *in vitro* и увеличивает стойкость и противоопухолевую активность человеческих T-клеток *in vivo* (Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706).

**[0171]** Внутриклеточные сигнальные последовательности в цитоплазматической части TFP по настоящему изобретению могут быть связаны между собой в случайном или определенном порядке. Необязательно, короткий олиго- или полипептидный линкер, например, длиной от 2 до 10 аминокислот (*например*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот) может образовать связь между внутриклеточными сигнальными последовательностями.

**[0172]** В одном варианте осуществления глицин-сериновый дублет может использоваться в качестве подходящего линкера. В одном варианте осуществления одна аминокислота, *например*, аланин, глицин, может использоваться в качестве подходящего линкера. **[0173]**

В одном аспекте TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, может дополнительно содержать второй TFP, *например*, второй TFP, который включает в себя другой антигенсвязывающий домен, *например*, для той же мишени (CD19 или BCMA) или для другой мишени (*например*, CD123). В одном варианте осуществления, когда TFP-экспрессирующая клетка содержит два или более различных TFP, антигенсвязывающие домены различных TFP могут быть такими, которые не будут взаимодействовать друг с другом. Например, клетка, экспрессирующая первый и второй TFP, может иметь антигенсвязывающий домен первого TFP, *например*, в качестве фрагмента, *например*, scFv, который не образует связи с антигенсвязывающим доменом второго TFP, *например*, антигенсвязывающий домен второго TFP представляет собой V<sub>HH</sub>-

**[0174]** В другом аспекте TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, может дополнительно экспрессировать другое вещество, *например*, вещество, которое повышает активность модифицированных T-клеток. Например, в одном варианте

осуществления вещество может быть таким, которое ингибирует ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, *например*, PD1, могут в некоторых вариантах осуществления снижать способность модифицированной Т-клетки установить иммунный эффекторный ответ. К примерам ингибирующих молекул относится PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR-бета. В одном варианте осуществления вещество, которое ингибирует ингибирующую молекулу, содержит первый полипептид, *например*, ингибирующую молекулу, связанный со вторым полипептидом, который обеспечивает положительный сигнал для клетки, *например*, внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем документе. В одном варианте осуществления вещество содержит первый полипептид, *например*, ингибирующей молекулы, такой как PD1, LAG3, CTLA4, CD 160, BTLA, LAIR1, TIM3, 2B4 и TIGIT, или фрагмент любого из них (*например*, по меньшей мере часть внеклеточного домена любого из них), и второй полипептид, который представляет собой внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем документе (*например*, содержащий костимулирующий домен (*например*, 4-1BB, CD27 или CD28, *например*, как было описано в настоящем документе) и/или домен первичной сигнализации (*например*, сигнальный домен CD3 дзета, описанный в настоящем документе). В одном варианте осуществления вещество содержит первый полипептид PD1 или его фрагмент (*например*, по меньшей мере часть внеклеточного домена PD1) и второй полипептид внутриклеточного сигнального домена, описанного в настоящем документе (*например*, сигнальный домен CD28, описанный в настоящем документе, и/или сигнальный домен CD3 дзета, описанный в настоящем документе). PD1 представляет собой ингибирующий член семейства CD28 рецепторов, которое также включает в себя CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. PD-1 экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и миелоидных клетках (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75). Было продемонстрировано, что два лиганда для PD1, PD-L1 и PD-L2 снижают активацию Т-клеток при связывании с PD1 (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43). PD-L1 является распространенным в раковых заболеваниях человека (Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094). Иммуносупрессия может быть обратима путем ингибирования локального взаимодействия PD1 с PD-L1.

**[0175]** В одном варианте осуществления вещество содержит внеклеточный домен (**ECD**) ингибирующей молекулы, *например*, белок запрограммированной гибели клеток 1 (PD1) могут сливаться с трансмембранным доменом и необязательно внутриклеточным сигнальным доменом, таким как 41BB и CD3 дзета (также называемый в настоящем документе как PD1

TFP). В одном варианте осуществления PD1 TFP при использовании в комбинации с TFP против CD19, описанным в настоящем документе, улучшает стойкость Т-клетки. В одном варианте осуществления TFP представляет собой PD1 TFP, содержащий внеклеточный домен PD 1. Альтернативно, предлагаются TFP, содержащие антитело или фрагмент антитела, такой как scFv, который специфически связывается с лигандом запрограммированной гибели клеток 1 (PD-L1) или лигандом запрограммированной гибели клеток 2 (PD-L2).

[0176] В другом аспекте настоящее изобретение предлагает популяцию TFP-экспрессирующих Т-клеток, *например*, TFP-Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция TFP-экспрессирующих Т-клеток содержит смесь клеток, экспрессирующих различные TFP. Например, в одном варианте осуществления популяция TFP-Т-клеток может включать в себя первую клетку, экспрессирующую TFP, имеющий связывающий домен против CD19 или против ВСМА, описанный в настоящем документе, и вторую клетку, экспрессирующую TFP, имеющий другой связывающий домен против CD19 или против ВСМА, *например*, связывающий домен против CD19 или против ВСМА, описанный в настоящем документе, который отличается от связывающего домена против CD19 или против ВСМА в TFP, экспрессируемом первой клеткой. В качестве другого примера, популяция TFP-экспрессирующих клеток может включать в себя первую клетку, экспрессирующую TFP, который включает в себя связывающий домен против CD19 или против ВСМА, *например*, как описано в настоящем документе, и вторую клетку, экспрессирующую TFP, который включает в себя антигенсвязывающий домен для мишени, отличной от CD19 или ВСМА (*например*, другой ассоциированный с опухолью антиген).

[0177] В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается популяция клеток, причем по меньшей мере одна клетка в популяции экспрессирует TFP, имеющий домен против CD19 или против ВСМА, описанный в настоящем документе, а вторая клетка экспрессирует другое вещество, *например*, вещество, которое повышает активность модифицированной Т-клетки. Например, в одном варианте осуществления вещество может быть таким, которое ингибирует ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, *например*, могут в некоторых вариантах осуществления снижать способность модифицированной Т-клетки установить иммунный эффекторный ответ. К примерам ингибирующих молекул относятся PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD 160, 2B4 и TGFR бета. В одном варианте осуществления вещество, ингибирующее ингибирующую молекулу, содержит первый полипептид, *например*, ингибирующую молекулу, связанный со вторым полипептидом, который обеспечивает положительный сигнал для клетки, *например*, внутриклеточный сигнальный

домен, описанный в настоящем документе.

**[0178]** В настоящем документе описаны способы получения транскрибированной *in vitro* РНК, кодирующей TFP. Настоящее изобретение также включает в себя кодирующую TFP конструкцию РНК, которую можно непосредственно трансфицировать в клетку. Способ получения мРНК для применения при трансфекции может включать в себя *in vitro* транскрипцию (IVT) матрицы с помощью специально разработанных праймеров с последующим добавлением поли(А) для получения конструкции, содержащей 3' и 5' нетранслированную последовательность («UTR»), 5'-кэп и/или участок внутренней посадки рибосомы (IRES), нуклеиновую кислоту, подлежащую экспрессии, и полиА-хвост, как правило, длиной 50–2000 оснований. Полученная таким образом РНК может эффективно трансфицировать различные типы клеток. В одном аспекте матрица включает в себя последовательности для TFP.

**[0179]** В одном аспекте TFP против CD 19 или против ВСМА кодируется матричной РНК (мРНК). В одном аспекте мРНК, кодирующая TFP против CD19 или против ВСМА, вводится в Т-клетку для получения TFP-Т-клетки. В одном варианте осуществления транскрибированная *in vitro* РНК TFP может вводиться в клетку как форма временной трансфекции. РНК получают путем транскрипции *in vitro*, используя матрицу, созданную в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Представляющую интерес ДНК из любого источника можно непосредственно преобразовать методом ПЦР в матрицу для *in vitro* синтеза мРНК с помощью соответствующих праймеров и РНК-полимеразы. Источником ДНК может быть, например, геномная ДНК, плазмидная ДНК, фаговая ДНК, кДНК, последовательность синтетической ДНК или любой другой подходящий источник ДНК. Желательной матрицей для транскрипции *in vitro* является TFP по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления ДНК для использования в ПЦР содержит открытую рамку считывания. ДНК может быть получена из встречающейся в природе последовательности ДНК из генома организма. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота может включать в себя некоторые или все из 5' и/или 3' нетранслированных областей (UTR). Нуклеиновая кислота может включать в себя экзоны и интроны. В одном варианте осуществления ДНК для использования в ПЦР представляет собой человеческую последовательность нуклеиновой кислоты. В другом варианте осуществления ДНК для использования в ПЦР представляет собой человеческую последовательность нуклеиновой кислоты, включая 5' и 3' UTR. ДНК может альтернативно представлять собой последовательность искусственной ДНК, которая обычно не экспрессируется у встречающихся в природе организмов. Примером последовательности искусственной ДНК является последовательность, которая содержит часть генов, которые лигируются вместе

для образования открытой рамки считывания, которая кодирует слитый белок. Части ДНК, которые лигируются вместе, могут быть получены от одного организма или от более чем одного организма.

**[0180]** ПЦР применяется для создания матрицы для *in vitro* транскрипции мРНК, которая используется для трансфекции. Способы проведения ПЦР хорошо известны в данной области техники. Праймеры для использования в ПЦР разработаны таким образом, чтобы они содержали области, по существу комплементарные областям ДНК, которые будут использоваться в качестве матрицы для ПЦР. Как используется в настоящем документе, «по существу комплементарный» относится к последовательностям нуклеотидов, в которых большинство или все основания в последовательности праймеров являются комплементарными, или одно или более оснований не являются комплементарными или не совпадают. По существу комплементарные последовательности способны к ренатурации или гибридизации с предполагаемой ДНК-мишенью в условиях ренатурации, используемых для ПЦР. Праймеры могут быть разработаны таким образом, чтобы быть по существу комплементарными любой части матрицы ДНК. Например, праймеры могут быть разработаны таким образом, чтобы амплифицировать часть нуклеиновой кислоты, которая обычно транскрибируется в клетках (открытая рамка считывания), включая 5' и 3' UTR. Праймеры также могут быть разработаны таким образом, чтобы амплифицировать часть нуклеиновой кислоты, которая кодирует конкретный домен, представляющий интерес. В одном варианте осуществления праймеры разработаны таким образом, чтобы амплифицировать кодирующий участок человеческой кДНК, включая все или часть 5' и 3' UTR. Праймеры, применяемые в ПЦР, могут быть получены способами синтеза, которые хорошо известны в данной области техники. «Прямые праймеры» — это праймеры, которые содержат участок нуклеотидов, которые по существу комплементарны нуклеотидам на матрице ДНК, которые расположены выше в последовательности ДНК, которая должна быть амплифицирована. «Расположенный выше» используется в настоящем документе для обозначения места 5, в последовательности ДНК, которая должна быть амплифицирована, по отношению к кодирующей цепи. «Обратные праймеры» — это праймеры, которые содержат участок нуклеотидов, которые по существу комплементарны матрице двухцепочечной ДНК, которые расположены ниже в последовательности ДНК, которая должна быть амплифицирована. «Расположенный ниже» используется в настоящем документе для обозначения места 3' в последовательности ДНК, которая должна быть амплифицирована, по отношению к кодирующей цепи.

**[0181]** Любая ДНК-полимераза, используемая в ПЦР, может применяться в способах, описанных в настоящем документе. Реагенты и полимераза коммерчески доступны из

различных источников.

**[0182]** Также могут использоваться химические структуры, способные обеспечивать стабильность и/или эффективность трансляции. РНК предпочтительно имеет 5' и 3' UTR. В одном варианте осуществления 5' UTR имеет длину от одного до 3000 нуклеотидов. Длину последовательностей 5' и 3' UTR, которые будут добавлены к кодирующему участку, можно изменить различными способами, включая, помимо прочего, разработку праймеров для ПЦР, которые ренатурируются с различными участками UTR. Используя такой подход, специалист в данной области техники сможет модифицировать длину 5' и 3' UTR, необходимую для достижения оптимальной эффективности трансляции после трансфекции транскрибированной РНК.

**[0183]** 5' и 3' UTR могут быть природными, эндогенными 5' и 3' UTR для представляющей интерес нуклеиновой кислоты. Альтернативно, последовательности UTR, которые не являются эндогенными по отношению к представляющей интерес нуклеиновой кислоте, могут быть добавлены путем введения последовательностей UTR в прямые и обратные праймеры либо с помощью любых других модификаций матрицы. Использование последовательностей UTR, которые не являются эндогенными по отношению к представляющей интерес нуклеиновой кислоте, может быть полезным при модификации стабильности и/или эффективности трансляции РНК. Например, известно, что богатые AU элементы в последовательностях 3'UTR могут снижать стабильность мРНК. Таким образом, 3' UTR могут выбираться или разрабатываться таким образом, чтобы повышать стабильность транскрибированной РНК, исходя из свойств UTR, которые хорошо известны в данной области техники.

**[0184]** В одном варианте осуществления 5' UTR может содержать последовательность Козак эндогенной нуклеиновой кислоты. Альтернативно, при добавлении 5' UTR, которая не является эндогенной по отношению к представляющей интерес нуклеиновой кислоте, путем ПЦР, как было описано выше, консенсусная последовательность Козак может быть переделана путем добавления последовательности 5' UTR. Последовательность Козак может повышать эффективность трансляции некоторых транскриптов РНК, однако похоже, что она не требуется для всех РНК, чтобы обеспечить эффективную трансляцию. Необходимость последовательностей Козак для многих мРНК известна в данной области техники. В других вариантах осуществления 5' UTR может представлять собой 5' UTR РНК-вируса, чей геном РНК является стабильным в клетках. В других вариантах осуществления различные нуклеотидные аналоги могут использоваться в 3' или 5' UTR, чтобы воспрепятствовать деградации мРНК экзонуклеазами.

**[0185]** Чтобы обеспечить синтез РНК из матрицы ДНК без необходимости использовать

клонирование генов, промотор транскрипции следует присоединить к матрице ДНК выше транскрибируемой последовательности. Когда последовательность, которая действует в качестве промотора для РНК-полимеразы, добавляют к 5'-концу прямого праймера, промотор РНК-полимеразы становится включенным в продукт ПЦР выше транскрибируемой открытой рамки считывания. В одном предпочтительном варианте осуществления промотор представляет собой промотор полимеразы T7, как описано в любом другом месте настоящего документа. К другим пригодным для использования промоторам относятся, помимо прочего, промоторы РНК-полимеразы T3 и SP6. Консенсусные нуклеотидные последовательности для промоторов T7, T3 и SP6 известны в данной области техники.

**[0186]** В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит кэп на 5'-конце и 3'-поли(А)-хвост, которые определяют связывание рибосомы, инициацию трансляции и стабильность мРНК в клетке. На матрице кольцевой ДНК, например, плазмидной ДНК, РНК-полимераза вырабатывает длинный конкатемерный продукт, не пригодный для экспрессии в эукариотических клетках. Транскрипция плазмидной ДНК, линейаризованной на конце 3' UTR, приводит к получению мРНК нормального размера, которая не является эффективной при эукариотической трансфекции, даже если после транскрипции она будет полиаденилирована.

**[0187]** На матрице линейной ДНК РНК-полимераза фага T7 может расширять 3'-конец транскрипта за пределы последнего основания матрицы (Schenborn and Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003).

**[0188]** Традиционным способом интеграции поли(А/Т) участков в матрицу ДНК является молекулярное клонирование. Однако, поли(А/Т) последовательность, интегрированная в плазмидную ДНК, может привести к нестабильности плазмиды, что является причиной того, почему матрицы плазмидной ДНК, полученные из бактериальных клеток, часто в значительной степени загрязнены делециями и другими абберациями. Это делает процедуры клонирования не только трудоемкими и занимающими много времени, но часто и ненадежными. Поэтому крайне желательным является способ, который позволяет конструировать матрицы ДНК с поли(А/Т) 3'-участком без применения клонирования.

**[0189]** Поли(А/Т)-сегмент транскрипционной матрицы ДНК может быть получен в процессе ПЦР, используя обратный праймер, содержащий поли(Т)-хвост, такой как хвост 100 Т (размер может составлять 50-5000 Т), или после ПЦР с помощью любого другого способа, включая, помимо прочего, лигирование ДНК или рекомбинацию *in vitro*. Поли(А)-хвосты также обеспечивают стабильность РНК и снижают их деградацию. В целом, длина

поли(А)-хвоста положительно коррелирует со стабильностью транскрибированной РНК. В одном варианте осуществления поли(А)-хвост составляет от 100 до 5000 аденозинов.

**[0190]** Поли(А)-хвосты РНК могут быть дополнительно удлинены после транскрипции *in vitro*, используя поли(А)-полимеразу, такую как поли(А)-полимераза *E. coli* (E-PAP). В одном варианте осуществления увеличение длины поли(А)-хвоста со 100 нуклеотидов до от 300 до 400 нуклеотидов приводит приблизительно к двукратному повышению эффективности трансляции РНК. Кроме того, присоединение различных химических групп к 3'-концу может увеличить стабильность мРНК. Такое присоединение может содержать модифицированные/искусственные нуклеотиды, аптамеры и другие соединения. Например, аналоги АТР могут быть включены в поли(А)-хвост с помощью поли(А)-полимеразы. Аналоги АТР могут дополнительно увеличивать стабильность РНК.

**[0191]** 5'-кэпы также может обеспечивать стабильность молекул РНК. В некоторых вариантах осуществления РНК, полученные с помощью способов, описанных в настоящем документе, включают в себя 5'-кэп. 5'-кэп получают с помощью методик, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе (Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

**[0192]** РНК, полученные с помощью способов, описанных в настоящем документе, могут также содержать последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES). Последовательность IRES может представлять собой любую вирусную, хромосомную или искусственно созданную последовательность, которая инициирует кэп-независимое связывание рибосомы с мРНК и способствует инициации трансляции. Могут быть добавлены любые растворенные вещества для клеточной электропорации, которые могут содержать факторы, способствующие клеточной проницаемости и жизнеспособности, такие как сахара, пептиды, липиды, белки, антиоксиданты и поверхностно-активные вещества.

**[0193]** РНК могут вводить в клетки-мишени, используя любой из целого ряда различных способов, например, коммерчески доступные способы, которые включают в себя, помимо прочего, электропорацию (Амаха Nucleofector®-II (Амаха Biosystems, Кельн, Германия)), ECM 830 (ВТХ) (Harvard Instruments, Бостон, штат Массачусетс) или электропоратор Gene Pulser® II (BioRad, Денвер, штат Колорадо), Multiporator® (Eppendorf, Гамбург, Германия), опосредованную катионными липосомами трансфекцию с использованием липофекции, инкапсуляцию полимерами, опосредованную пептидами трансфекцию или биолистические системы доставки частиц, такие как «генные пушки» (см., например, Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)).



**Рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая TFP и константный домен TCR**

**[0194]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыта рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержащая (а) последовательность, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий (i) субъединицу TCR, содержащую (1) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, (2) трансмембранный домен, и (3) внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, TCR альфа или TCR бета, и (ii) человеческое или гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающий домен; и (b) последовательность, кодирующую константный домен TCR, где константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа, константный домен TCR бета, или константный домен TCR альфа и константный домен TCR бета; причем субъединица TCR и антитело функционально связаны, и при этом TFP функционально внедряется в комплекс TCR при экспрессии в Т-клетке.

**[0195]** В некоторых случаях константный домен TCR внедряется в функциональный комплекс TCR при экспрессии в Т-клетке. В некоторых случаях константный домен TCR внедряется в тот же функциональный комплекс TCR, что и функциональный комплекс TCR, в который внедряется TFP при экспрессии в Т-клетке. В некоторых случаях последовательность, кодирующая TFP, и последовательность, кодирующая константный домен TCR, содержатся в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях последовательность, кодирующая TFP, и последовательность, кодирующая константный домен TCR, содержатся в разных молекулах нуклеиновых кислот. **[0196]** В некоторых случаях субъединица TCR и домен антитела, домен антигена или связывающий лиганд или его фрагмент функционально связаны линкерной последовательностью. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит  $(G4S)_n$ , где  $n =$  от 1 до 4.

**[0197]** В некоторых случаях трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен TCR из CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, TCR альфа или TCR бета. В некоторых случаях внутриклеточный домен получен только из CD3 эпсилон, только из CD3 гамма, только из CD3 дельта, только из TCR альфа или только из TCR бета.

**[0198]** В некоторых случаях субъединица TCR включает (i) по крайней мере часть внеклеточного домена TCR, (ii) трансмембранный домен TCR и (iii) внутриклеточный домен TCR, причем по крайней мере два из (i), (ii) и (iii) относятся к одной и той же субъединице TCR.

**[0199]** В некоторых случаях внеклеточный домен TCR включает внеклеточный домен белка или его часть, выбранного из группы, состоящей из альфа цепи TCR, бета цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3

дельта, его функциональные фрагменты и его аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

**[0200]** В некоторых случаях субъединица TCR содержит трансмембранный домен, содержащий трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа цепи TCR, бета цепи TCR, дзета цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. **[0201]** В некоторых случаях субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен белка, выбранный из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, или аминокислотную последовательность, имеющую по крайней мере одну модификацию.

**[0202]** В некоторых случаях субъединица TCR содержит внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен белка, выбранный из функционального сигнального домена 4-1BB и/или функционального сигнального домена CD3 дзета, или аминокислотную последовательность, имеющую к тому же по меньшей мере одну модификацию.

**[0203]** В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую костимулирующий домен. В некоторых случаях костимулирующий домен содержит функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a / CD18), ICOS (CD278), и 4-1BB (CD137), и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

**[0204]** В некоторых случаях субъединица TCR включает иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (IT AM) субъединицы TCR, который содержит IT AM белка или его часть, выбранного из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, дзета цепи TCR, цепи Fc-эпсилон-рецептора 1, цепи Fc-эпсилон-рецептора 2, цепи Fc-гамма-рецептора 1, цепи Fc-гамма-рецептора 2a, цепи Fc-гамма-рецептора 2b 1, цепи Fc-гамма-рецептора 2b2, цепи Fc-гамма-рецептора 3a, цепи Fc-гамма-рецептора 3b, цепи Fc-бета-рецептора 1, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих к тому же по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях IT AM замещает IT AM CD3 гамма, CD3 дельта или CD3 эпсилон. В некоторых случаях ITAM выбран из группы, состоящей из субъединицы

TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта, и замещает другой ИТАМ, выбранный из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта.

**[0205]** В некоторых случаях TFP, константный домен TCR альфа, константный домен TCR бета и любая их комбинация способны функционально взаимодействовать с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR. В некоторых случаях (а) константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа, и TFP функционально интегрируется в комплекс TCR, содержащий эндогенную субъединицу TCR бета, CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта или их комбинацию; (b) константный домен TCR представляет собой константный домен TCR бета, и TFP функционально интегрируется в комплекс TCR, содержащий эндогенную субъединицу TCR альфа, CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта или их комбинацию; или (с) константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа и константный домен TCR бета, и TFP функционально интегрируется в комплекс TCR, содержащий эндогенную субъединицу CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта или их комбинацию.

**[0206]** В некоторых случаях по меньшей мере одна, но не более 20 модификаций содержат модификацию аминокислоты, которая опосредует клеточную сигнализацию, или модификацию аминокислоты, которая фосфорилируется в ответ на связывание лиганда с TFP.

**[0207]** В некоторых случаях человеческое или гуманизированное антитело представляет собой фрагмент антитела. В некоторых случаях фрагмент антитела представляет собой scFv, домен однодоменного антитела, домен VH или домен VL. В некоторых случаях человеческое или гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, выбранное из группы, состоящей из связывающего домена против CD19, связывающего домена против антигена созревания В-клеток (BCMA), связывающего домена против мезотелина (MSLN), связывающего домена против CD22, связывающего домена против PD-1, связывающего домена против рецептора BAFF или BAFF, и связывающего домена против ROR-1.

**[0208]** В некоторых случаях нуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из ДНК и РНК. В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой мРНК. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота включает аналог нуклеиновой кислоты, где аналог нуклеиновой кислоты не входит в кодирующую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях нуклеиновый аналог выбран из группы, состоящей из 2'-О-метила, 2'-О-метоксиэтила (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропила,

2'-дезоксидезокси-2'-фтор, 2'-О-аминопропила (2'-О-AP), 2'-О-диметиламиноэтила (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропила (2'-О-DMAP), Т-О-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-О-DMAEOE), модифицированного 2'-О-N-метилацетила (2'-О-NMA), закрытой нуклеиновой кислоты (ЗНК), этиленнуклеиновой кислоты (ЭНК), пептидо-нуклеиновой кислоты (ПНК), 1',5'-ангидрогекситаоловой нуклеиновой кислоты (АНК), морфолино, метилфосфонатного нуклеотида, тиолфосфонатного нуклеотида и 2'-фтор N3-P5'-фосфорамидита.

**[0209]** В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит лидерную последовательность. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит промоторную последовательность. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую поли(А)-хвост. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность 3'UTR. В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту или не встречающуюся в природе нуклеиновую кислоту. В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, транскрибируемую *in vitro*.

**[0210]** В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую трансмембранный домен TCR альфа. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую трансмембранный домен TCR бета. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую трансмембранный домен TCR альфа, и последовательность, кодирующую трансмембранный домен TCR бета.

**[0211]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты рекомбинантные нуклеиновые кислоты, содержащие (а) последовательность, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий (i) субъединицу TCR, содержащую (1) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, (2) трансмембранный домен, и (3) внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, TCR альфа или TCR бета, и (ii) связывающий лиганд или его фрагмент, который способен связываться с антителом или его фрагментом; и (b) последовательность, кодирующую константный домен TCR, где константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа, константный домен TCR бета или константный домен TCR альфа и константный домен TCR бета, причем субъединица TCR и связывающий лиганд или его фрагмент функционально связаны, и где TFP функционально внедряется в комплекс TCR при

экспрессии в Т-клетке. В некоторых случаях связывающий лиганд способен связывать Fc-домен антитела. В некоторых случаях связывающий лиганд способен селективно связывать антитело IgG1. В некоторых случаях связывающий лиганд способен специфически связывать антитело IgG1. В некоторых случаях антитело или его фрагмент связывается с антигеном клеточной поверхности. В некоторых случаях антитело или его фрагмент связывается с антигеном клеточной поверхности на поверхности опухолевой клетки. В некоторых случаях связывающий лиганд включает мономер, димер, тример, тетрамер, пентамер, гексамер, гептамер, октомер, нонамер или декамер. В некоторых случаях связывающий лиганд не включает антитело или его фрагмент. В некоторых случаях связывающий лиганд включает полипептид CD 16 или его фрагмент. В некоторых случаях связывающий лиганд содержит CD16-связывающий полипептид. В некоторых случаях связывающий лиганд является человеческим или гуманизированным. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его фрагмент, способные связываться связывающим лигандом. В некоторых случаях антитело или его фрагмент могут секретироваться из клетки.

**[0212]** В некоторых случаях константный домен TCR внедряется в функциональный комплекс TCR при экспрессии в Т-клетке. В некоторых случаях константный домен TCR внедряется в тот же функциональный комплекс TCR, что и функциональный комплекс TCR, в который внедряется TFP при экспрессии в Т-клетке. В некоторых случаях последовательность, кодирующая TFP, и последовательность, кодирующая константный домен TCR, содержатся в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях последовательность, кодирующая TFP, и последовательность, кодирующая константный домен TCR, содержатся в разных молекулах нуклеиновых кислот.

**[0213]** В некоторых случаях субъединица TCR и домен антитела, домен антигена или связывающий лиганд или его фрагмент функционально связаны линкерной последовательностью. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит  $(G_4S)_n$ , где  $n =$  от 1 до 4.

**[0214]** В некоторых случаях трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен TCR из CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, TCR альфа или TCR бета. В некоторых случаях внутриклеточный домен получен только из CD3 эпсилон, только из CD3 гамма, только из CD3 дельта, только из TCR альфа или только из TCR бета.

**[0215]** В некоторых случаях субъединица TCR включает (i) по крайней мере часть внеклеточного домена TCR, (ii) трансмембранный домен TCR и (iii) внутриклеточный домен TCR, причем по крайней мере два из (i), (ii) и (iii) относятся к одной и той же

субъединице TCR.

[0216] В некоторых случаях внеклеточный домен TCR включает внеклеточный домен белка или его часть, выбранного из группы, состоящей из альфа цепи TCR, бета цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, его функциональные фрагменты и его аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

[0217] В некоторых случаях субъединица TCR содержит трансмембранный домен, содержащий трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа цепи TCR, бета цепи TCR, дзета цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

[0218] В некоторых случаях субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен белка, выбранный из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, или аминокислотную последовательность, имеющую по крайней мере одну модификацию.

[0219] В некоторых случаях субъединица TCR содержит внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен белка, выбранный из функционального сигнального домена 4-1BB и/или функционального сигнального домена CD3 дзета, или аминокислотную последовательность, имеющую к тому же по меньшей мере одну модификацию.

[0220] В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую костимулирующий домен. В некоторых случаях костимулирующий домен содержит функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a / CD18), ICOS (CD278), и 4-1BB (CD137), и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

[0221] В некоторых случаях субъединица TCR включает иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ИТ АМ) субъединицы TCR, который содержит АМ белка или его часть, выбранного из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, дзета-цепи TCR, цепи Fc-эпсилон-рецептора 1, цепи Fc-эпсилон-рецептора 2, цепи Fc-гамма-рецептора 1, цепи Fc-гамма-рецептора 2a, цепи Fc-гамма-рецептора 2b 1, цепи Fc-гамма-рецептора 2b2, цепи Fc-гамма-рецептора 3a, цепи Fc-гамма-рецептора 3b, цепи Fc-бета-

рецептора 1, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих к тому же по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях ITAM замещает ITAM CD3 гамма, CD3 дельта или CD3 эпсилон. В некоторых случаях ITAM выбран из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта, и замещает другой ITAM, выбранный из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта.

**[0222]** В некоторых случаях TFP, константный домен TCR альфа, константный домен TCR бета и любая их комбинация способны функционально взаимодействовать с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR. В некоторых случаях (а) константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа, и TFP функционально интегрируется в комплекс TCR, содержащий эндогенную субъединицу TCR бета, CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта или их комбинацию; (b) константный домен TCR представляет собой константный домен TCR бета, и TFP функционально интегрируется в комплекс TCR, содержащий эндогенную субъединицу TCR альфа, CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта или их комбинацию; или (с) константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа и константный домен TCR бета, и TFP функционально интегрируется в комплекс TCR, содержащий эндогенную субъединицу CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта или их комбинацию.

**[0223]** В некоторых случаях по меньшей мере одна, но не более 20 модификаций содержат модификацию аминокислоты, которая опосредует клеточную сигнализацию, или модификацию аминокислоты, которая фосфорилируется в ответ на связывание лиганда с TFP.

**[0224]** В некоторых случаях человеческое или гуманизованное антитело представляет собой фрагмент антитела. В некоторых случаях фрагмент антитела представляет собой scFv, домен однодоменного антитела, домен VH или домен VL. В некоторых случаях человеческое или гуманизованное антитело, содержащее антигенсвязывающий домен, выбранное из группы, состоящей из связывающего домена против CD19, связывающего домена против антигена созревания В-клеток (BCMA), связывающего домена против мезотелина (MSLN), связывающего домена против CD22, связывающего домена против PD-1, связывающего домена против BAFF, и связывающего домена против ROR-1.

**[0225]** В некоторых случаях нуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из ДНК и РНК. В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой мРНК. В некоторых

случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота включает аналог нуклеиновой кислоты, где аналог нуклеиновой кислоты не входит в кодирующую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях нуклеиновый аналог выбран из группы, состоящей из 2'-О-метила, 2'-О-метоксиэтила (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропила, 2'-дезоксидезокси-2'-фтор, 2'-О-аминопропила (2'-О-АР), 2'-О-диметиламиноэтила (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропила (2'-О-DMAP), Т-О-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-О-DMAEOE), модифицированного 2'-О-N-метилацетида (2'-О-NMA), закрытой нуклеиновой кислоты (ЗНК), этиленнуклеиновой кислоты (ЭНК), пептидо-нуклеиновой кислоты (ПНК), 1',5'-ангидрогекситоловой нуклеиновой кислоты (АНК), морфолино, метилфосфонатного нуклеотида, тиолфосфонатного нуклеотида и 2'-фтор N3-P5'-фосфорамидита.

**[0226]** В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит лидерную последовательность. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит промоторную последовательность. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую поли(А)-хвост. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность 3'UTR. В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту или не встречающуюся в природе нуклеиновую кислоту. В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, транскрибируемую *in vitro*.

**[0227]** В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую трансмембранный домен TCR альфа. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую трансмембранный домен TCR бета. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую трансмембранный домен TCR альфа, и последовательность, кодирующую трансмембранный домен TCR бета. Альтернативно рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую домен TCR гамма или TCR дельта, например, трансмембранный домен.

**[0228]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты рекомбинантные нуклеиновые кислоты, содержащие, содержащая (а) последовательность, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий (i) субъединицу TCR, содержащую (1) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, (2) трансмембранный домен, и (3) внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, TCR



альфа или TCR бета, и (ii) домен антигена, содержащий лиганд или его фрагмент, который связывается с рецептором или полипептидом, экспрессируемым на поверхности клетки; и (b) последовательность, кодирующую константный домен TCR, где константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа, константный домен TCR бета или константный домен TCR альфа и константный домен TCR бета, причем субъединица TCR и домен антигена функционально связаны, и при этом TFP функционально внедряется в комплекс TCR при экспрессии в Т-клетке. В некоторых случаях домен антигена включает лиганд. В некоторых случаях лиганд связывается с рецептором клетки. В некоторых случаях лиганд связывается с полипептидом, экспрессируемым на поверхности клетки. В некоторых случаях рецептор или полипептид, экспрессируемый на поверхности клетки, включает рецептор или полипептид стрессовой реакции. В некоторых случаях рецептор или полипептид, экспрессируемый на поверхности клетки, представляет собой гликопротеин, родственник МНС класса I. В некоторых случаях гликопротеин, родственник МНС класса I, выбран из группы, состоящей из MICA, MICB, RAET1E, RAET1G, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4 и их комбинаций. В некоторых случаях домен антигена включает мономер, димер, тример, тетрамер, пентамер, гексамер, гептамер, октомер, нонамер или декамер. В некоторых случаях домен антигена включает мономер или димер лиганда или его фрагмент. В некоторых случаях лиганд или его фрагмент представляет собой мономер, димер, тример, тетрамер, пентамер, гексамер, гептамер, октомер, нонамер или декамер. В некоторых случаях лиганд или его фрагмент представляет собой мономер или димер. В некоторых случаях домен антигена не включает антитело или его фрагмент. В некоторых случаях домен антигена не содержит вариабельную область. В некоторых случаях домен антигена не содержит CDR. В некоторых случаях лиганд или его фрагмент представляет собой лиганд группы 2D натуральных киллеров (NKG2D) или его фрагмент.

**[0229]** В некоторых случаях константный домен TCR внедряется в функциональный комплекс TCR при экспрессии в Т-клетке. В некоторых случаях константный домен TCR внедряется в тот же функциональный комплекс TCR, что и функциональный комплекс TCR, в который внедряется TFP при экспрессии в Т-клетке. В некоторых случаях последовательность, кодирующая TFP, и последовательность, кодирующая константный домен TCR, содержатся в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях последовательность, кодирующая TFP, и последовательность, кодирующая константный домен TCR, содержатся в разных молекулах нуклеиновых кислот. **[0230]** В некоторых случаях субъединица TCR и домен антитела, домен антигена или связывающий лиганд или его фрагмент функционально связаны линкерной последовательностью. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит (G4S)<sub>n</sub>, где n= от 1 до 4.

**[0231]** В некоторых случаях трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен TCR из CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, TCR альфа или TCR бета. В некоторых случаях внутриклеточный домен получен только из CD3 эпсилон, только из CD3 гамма, только из CD3 дельта, только из TCR альфа или только из TCR бета.

**[0232]** В некоторых случаях субъединица TCR включает (i) по крайней мере часть внеклеточного домена TCR, (ii) трансмембранный домен TCR и (iii) внутриклеточный домен TCR, причем по крайней мере два из (i), (ii) и (iii) относятся к одной и той же субъединице TCR.

**[0233]** В некоторых случаях внеклеточный домен TCR включает внеклеточный домен белка или его часть, выбранного из группы, состоящей из альфа цепи TCR, бета цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, его функциональные фрагменты и его аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

**[0234]** В некоторых случаях субъединица TCR содержит трансмембранный домен, содержащий трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа цепи TCR, бета цепи TCR, дзета цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

**[0235]** В некоторых случаях субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен белка, выбранный из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, или аминокислотную последовательность, имеющую по крайней мере одну модификацию.

**[0236]** В некоторых случаях субъединица TCR содержит внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен белка, выбранный из функционального сигнального домена 4-1BB и/или функционального сигнального домена CD3 дзета, или аминокислотную последовательность, имеющую к тому же по меньшей мере одну модификацию.

**[0237]** В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую костимулирующий домен. В некоторых случаях костимулирующий домен содержит функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CD28, CD30, ICAM-1, LFA-1 (CD11a / CD18), ICOS (CD278), и 4-1BB (CD137), и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

**[0238]** В некоторых случаях субъединица TCR включает иммунорецепторный тирозиновый

активирующий мотив (IT AM) субъединицы TCR, который содержит IT AM белка или его часть, выбранного из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, дзета цепи TCR, цепи Fc-эпсилон-рецептора 1, цепи Fc-эпсилон-рецептора 2, цепи Fc-гамма-рецептора 1, цепи Fc-гамма-рецептора 2a, цепи Fc-гамма-рецептора 2b 1, цепи Fc-гамма-рецептора 2b2, цепи Fc-гамма-рецептора 3a, цепи Fc-гамма-рецептора 3b, цепи Fc-бета-рецептора 1, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих к тому же по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях ITAM замещает ITAM CD3 гамма, CD3 дельта или CD3 эпсилон. В некоторых случаях ITAM выбран из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта, и замещает другой ITAM, выбранный из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта.

[0239] В некоторых случаях TFP, константный домен TCR альфа, константный домен TCR бета и любая их комбинация способны функционально взаимодействовать с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR. В некоторых случаях (a) константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа, и TFP функционально интегрируется в комплекс TCR, содержащий эндогенную субъединицу TCR бета, CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта или их комбинацию; (b) константный домен TCR представляет собой константный домен TCR бета, и TFP функционально интегрируется в комплекс TCR, содержащий эндогенную субъединицу TCR альфа, CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта или их комбинацию; или (c) константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа и константный домен TCR бета, и TFP функционально интегрируется в комплекс TCR, содержащий эндогенную субъединицу CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта или их комбинацию.

[0240] В некоторых случаях по меньшей мере одна, но не более 20 модификаций содержат модификацию аминокислоты, которая опосредует клеточную сигнализацию, или модификацию аминокислоты, которая фосфорилируется в ответ на связывание лиганда с TFP.

[0241] В некоторых случаях человеческое или гуманизованное антитело представляет собой фрагмент антитела. В некоторых случаях фрагмент антитела представляет собой scFv, домен однодоменного антитела, домен VH или домен VL. В некоторых случаях человеческое или гуманизованное антитело, содержащее антигенсвязывающий домен,

выбранное из группы, состоящей из связывающего домена против CD19, связывающего домена против антигена созревания В-клеток (BCMA), связывающего домена против мезотелина (MSLN), связывающего домена против CD22, связывающего домена против BAFF, связывающего домена против PD-1 и связывающего домена против ROR-1.

**[0242]** В некоторых случаях нуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из ДНК и РНК. В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой мРНК. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота включает аналог нуклеиновой кислоты, где аналог нуклеиновой кислоты не входит в кодирующую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях нуклеиновый аналог выбран из группы, состоящей из 2'-О-метила, 2'-О-метоксиэтила (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропила, 2'-дезоксидезокси-2'-фтор, 2'-О-аминопропила (2'-О-АП), 2'-О-диметиламиноэтила (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропила (2'-О-DMAP), Т-О-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-О-DMAEOE), модифицированного 2'-О-N-метилацетида (2'-О-NMA), закрытой нуклеиновой кислоты (ЗНК), этиленнуклеиновой кислоты (ЭНК), пептидо-нуклеиновой кислоты (ПНК), 1',5'-ангидрогекситоловой нуклеиновой кислоты (АНК), морфолино, метилфосфонатного нуклеотида, тиолфосфонатного нуклеотида и 2'-фтор N3-P5'-фосфорамидита.

**[0243]** В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит лидерную последовательность. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит промоторную последовательность. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую поли(А)-хвост. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность 3'UTR. В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту или не встречающуюся в природе нуклеиновую кислоту. В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, транскрибируемую *in vitro*.

**[0244]** В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую трансмембранный домен TCR альфа. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую трансмембранный домен TCR бета. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую трансмембранный домен TCR альфа, и последовательность, кодирующую трансмембранный домен TCR бета.

**[0245]** Кроме того, в некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыты векторы, содержащие рекомбинантную нуклеиновую кислоту, раскрытую в данном

документе. В некоторых случаях вектор выбран из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, аденоассоциированного вирусного вектора (AAV), вектора на основе вируса саркомы Рауса (BCP) или ретровирусного вектора. В некоторых случаях вектор является вектором AAV6. В некоторых случаях вектор дополнительно содержит промотор. В некоторых случаях вектор представляет собой транскрибированный *in vitro* вектор.

**[0246]** Последовательности нуклеиновой кислоты, ориентированные на желаемые молекулы, могут быть получены с помощью рекомбинантных способов, известных в данной области техники, как, например, путем скрининга библиотек из клеток, экспрессирующих ген, путем получения гена из вектора, известного как содержащий этот ген, или путем

непосредственного выделения из клеток и тканей, содержащих его, используя стандартные методики. Альтернативно, представляющий интерес ген может быть получен синтетическим путем, а не клонированием.

**[0247]** В настоящем изобретении также предложены векторы, в которые встраивается ДНК по настоящему изобретению. Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, являются пригодными инструментами для достижения длительного переноса генов, поскольку они обеспечивают длительную стабильную интеграцию трансгена и его распространение в дочерних клетках. Лентивирусные векторы обладают дополнительным преимуществом перед векторами, полученными из онкоретровирусов, таких как вирусы лейкоза мышей, в том отношении, что они могут трансдуцировать неразмножающиеся клетки, такие как гепатоциты. Они также обладают дополнительным преимуществом низкой иммуногенности.

**[0248]** В другом варианте осуществления вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую желаемый TFP по настоящему изобретению, представляет собой аденовирусный вектор (A5/35). В другом варианте осуществления экспрессия нуклеиновых кислот, кодирующих TFP, может быть осуществлена с помощью транспозонов, таких как «спящая красавица», «крипер», CAS9 и нуклеаза с цинковыми пальцами. См. ниже June et al. 2009 Nature Reviews Immunology 9.10: 704-716, включенную в настоящее описание посредством ссылки.

**[0249]** Экспрессирующие конструкции по настоящему изобретению также могут использоваться для иммунизации нуклеиновой кислоты и генной терапии, используя стандартные протоколы доставки генов. Способы доставки генов известны в данной области техники (см., например, патенты США 5399346, 5580859, 5589466, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки). В другом

варианте осуществления в настоящем изобретении предложен вектор для генной терапии.

**[0250]** Нуклеиновая кислота может быть клонирована в целый ряд типов векторов. Например, нуклеиновая кислота может быть клонирована в вектор, включая, помимо прочего, плазмиду, фагмид, производное фага, вирус животного и космиду. Векторы, представляющие особый интерес, включают в себя векторы экспрессии, векторы репликации, векторы получения зондов и векторы секвенирования.

**[0251]** Более того, вектор экспрессии можно доставлять в клетку в форме вирусного вектора. Технологии вирусных векторов хорошо известны в данной области техники и описаны, например, у Sambrook et al., 2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY), и в других справочниках по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, используемые в качестве векторов, включают, но не ограничиваются этим, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. В основном, подходящий вектор содержит сайт начала репликации, функциональный по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, подходящие участки узнавания рестрикционных эндонуклеаз и один или более селективируемых маркеров, (*например*, WO 01/96584; WO 01/29058 и патент США 6326193).

**[0252]** Был разработан целый ряд систем на основе вирусов для переноса генов в клетки млекопитающих. Например, ретровирусы обеспечивают удобную платформу для систем доставки генов. Выбранный ген может быть встроен в вектор и упакован в ретровирусные частицы, используя методики, известные в данной области техники. Рекомбинантный вирус затем может быть выделен и доставлен в клетки субъекта *in vivo* или *ex vivo*. Ряд ретровирусных систем известен в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления используются аденовирусные векторы. Ряд аденовирусных векторов известен в данной области техники. В одном варианте осуществления используются лентивирусные векторы.

**[0253]** Дополнительные элементы промотора, *например*, энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они расположены в области на 30–110 п. о. выше сайта начала, хотя было продемонстрировано, что ряд промоторов также содержит функциональные элементы ниже сайта начала. Часто интервал между элементами промотора является гибким, таким образом, промоторная функция сохраняется, когда элементы инвертируются или перемещаются относительно друг друга. В промоторе тимидинкиназы (ТК) интервал между элементами промотора можно увеличить до 50 п. о., прежде чем активность начнет снижаться. В зависимости от промотора оказывается, что отдельные элементы могут функционировать либо совместно, либо независимо для активации транскрипции.

**[0254]** Примером промотора, способного к экспрессии трансгена TFP в Т-клетке млекопитающего, является промотор EF1 $\alpha$ . Нативный промотор EF1 $\alpha$  стимулирует экспрессию альфа-субъединицы комплекса фактора элонгации-1, который отвечает за ферментную доставку аминоксил-тРНК в рибосому. Промотор EF1 $\alpha$  широко используется в экспрессионных плаزمидках млекопитающих и продемонстрировал эффективность при стимуляции экспрессии TFP из трансгенов, клонированных в лентивирусный вектор (см., *например*, Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453–1464 (2009)). Другим примером промотора является последовательность немедленно раннего промотора цитомегаловируса (ЦМВ). Эта последовательность промотора является последовательностью сильного конститутивного промотора, способной стимулировать высокие уровни экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально с ней связанной. Однако могут также использоваться и другие последовательности конститутивного промотора, включая, помимо прочего, ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор длинных концевых повторов (ДКП) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, немедленно ранний промотор вируса Эпштейна-Барр, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы человеческого гена, такие как, помимо прочего, промотор актина, промотор миозина, промотор фактора элонгации-1 $\alpha$ , промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Более того, настоящее изобретение не должно ограничиваться использованием конститутивных промоторов. Индуцибельные промоторы также рассматриваются как часть настоящего изобретения. Использование индуцибельных промоторов обеспечивает молекулярный переключатель, способный запускать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, когда подобная экспрессия является желаемой, или останавливать экспрессию, когда она не является желаемой. К примерам индуцибельных промоторов относится, помимо прочего, промотор металлотионина, промотор глюкокортикоидов, промотор прогестерона и регулируемый тетрациклином промотор.

**[0255]** Чтобы оценить экспрессию полипептида TFP или его частей, вектор экспрессии, вводимый в клетку, может также содержать выбираемый маркерный ген, репортерный ген или и тот, и другой, чтобы способствовать идентификации и выбору экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые необходимо подвергнуть трансфекции или инфицировать вирусными векторами. В других аспектах селективный маркер может переноситься отдельным участком ДНК и использоваться в процедуре совместной трансфекции. Как селективные маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями, чтобы обеспечить экспрессию

в клетке-хозяине. К пригодным для использования селективным маркерам относятся, например, устойчивые к антибиотикам гены, такие как *neo* и т. п.

**[0256]** Репортерные гены используются для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. В целом, репортерный ген представляет собой ген, который не присутствует или не экспрессируется в реципиентном организме или ткани и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется каким-либо легко определяемым свойством, *например*, ферментной активностью. Экспрессию репортерного гена анализируют в подходящее время после введения ДНК в реципиентные клетки. Подходящие репортерные гены могут включать в себя гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфеникол-ацетилтрансферазу, секретируемую щелочную фосфатазу или ген зеленого флуоресцентного белка (*например*, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79–82). Подходящие системы экспрессии хорошо известны и могут быть получены, используя известные методики, или приобретены на коммерческой основе. В целом, конструкция с минимальным 5' фланкирующим участком, демонстрирующая самый высокий уровень экспрессии репортерного гена, идентифицируется как промотор. Такие промоторные участки могут быть связаны с репортерным геном и использоваться для оценки способности веществ модулировать активированную промотором транскрипцию.

**[0257]** Способы введения и экспрессии генов в клетку известны в данной области техники. В контексте вектора экспрессии, вектор может быть легко введен в клетку-хозяина, например, клетку млекопитающего, клетку бактерии, дрожжевую клетку или клетку насекомого с помощью любого способа в данной области техники. Например, вектор экспрессии может быть перенесен в клетку-хозяина физическим, химическим или биологическим путем.

**[0258]** К физическим способам введения полинуклеотида в клетку-хозяина относятся осаждение фосфатом кальция, липофекция, бомбардировка частицами, микроинъекция, электропорация и т. п. Способы получения клеток содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты хорошо известны в данной области техники. См., например, Sambrook et al., 2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY). Предпочтительным способом введения полинуклеотида в клетку-хозяина является трансфекция фосфатом кальция

**[0259]** К биологическим способам введения представляющего интерес полинуклеотида в клетку-хозяина относится использование векторов ДНК и РНК. Вирусные векторы и особенно ретровирусные векторы стали наиболее широко используемым способом внедрения генов в клетки млекопитающих, *например*, клетки человека. Другие вирусные



векторы могут быть получены из лентивируса, поксвирусов, вируса простого герпеса I типа, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т. п. (см., *например*, патенты США 5350674 и 5585362).

**[0260]** К химическим способам введения полинуклеотида в клетку-хозяина относятся системы коллоидной дисперсии, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, гранулы, и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Примером коллоидной системы, используемой в качестве средства доставки *in vitro* и *in vivo*, является липосома (*например*, искусственная мембранная везикула). Доступны другие способы направленной доставки нуклеиновых кислот существующего уровня техники, такие как доставка полинуклеотидов с нацеленными наночастицами или другая подходящая система доставки субмикронных элементов.

**[0261]** В случае использования невирусной системы доставки примером средства доставки является липосома. Предусмотрено использование липидных составов для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*). В другом аспекте изобретения нуклеиновая кислота может быть связана с липидом. Нуклеиновая кислота, связанная с липидом, может быть инкапсулирована в водном внутреннем пространстве липосомы, рассеяна по липидному бислою липосомы, присоединена к липосоме посредством линкерной молекулы, которая связана как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, заключена в липосоме, связана в комплекс с липосомой, диспергирована в растворе, содержащем липид, смешана с липидом, объединена с липидом, может содержаться в виде суспензии в липиде, содержатся или быть связана в комплекс с мицеллой или любым другим образом связана с липидом. Композиции, связанные с липидом, липидом/ДНК или липидом/вектором экспрессии, не ограничиваются какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут присутствовать в бислоевой структуре, такой как мицеллы, или иметь «разрушенную» структуру. Также они могут быть просто рассеяны в растворе, предположительно образуя агрегаты, не имеющие одинаковых размера или формы. Липиды представляют собой жиры, которые могут быть природными или синтетическими липидами. Например, липиды включают в себя жировые капли, которые встречаются естественным образом в цитоплазме, и также класс соединений, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминспирты и альдегиды.

**[0262]** Подходящие для использования липиды можно получить из коммерческих источников. Например, димиристилфосфатидилхолин («DMPC») можно получить от компании Sigma, Сент-Луис, штат Миссури; дицетилфосфат («DCP») можно получить от

компании K & K Laboratories (Плейнвью, штат Нью-Йорк); холестерин («Choi») можно получить от компании Calbiochem-Behring; димиристилфосфатидилглицерин («DMPG») и другие липиды можно получить от компании Avanti Polar Lipids, Inc. (Бирмингем, штат Алабама). Исходные растворы липидов в хлороформе или хлороформе/метаноле можно хранить приблизительно при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Хлороформ используют в качестве единственного растворителя, поскольку он легче испаряется, чем метанол. «Липосома» представляет собой общий термин, охватывающий различные однослойные и многослойные липидные носители, получаемые посредством образования заключенных липидных бислоев или агрегатов. Липосомы можно охарактеризовать, как содержащие везикулярные структуры с фосфолипидной бислоевой мембраной и внутренней водной средой. Многослойные липосомы содержат много липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются спонтанно, когда фосфолипиды суспендируют в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются самоперестройке до образования замкнутых структур и захватывают воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh et al., 1991, *Glycobiology* 5: 505–10). Однако также охватываются композиции, которые имеют структуры в растворе, отличные от нормальной везикулярной структуры. Например, липиды могут принимать мицеллярную структуру или существовать только в виде неоднородных агрегатов липидных молекул. Также предусмотрены комплексы липофектамин-нуклеиновая кислота.

**[0263]** Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина или иным образом подвергания клетки воздействию ингибитора по настоящему изобретению, с целью подтверждения наличия последовательности рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине можно проводить ряд анализов. Такие анализы включают в себя, например, «молекулярно-биологические» анализы, хорошо известные специалистам в данной области техники, такие как саузерн- и нозерн-блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; «биохимические» анализы, такие как выявление наличия или отсутствия конкретного пептида, *например*, иммунологическими способами (ИФА и вестерн-блоттинги) или путем анализов, описываемых в настоящем документе, для идентификации веществ, входящих в объем настоящего изобретения.

**[0264]** В настоящем изобретении дополнительно предлагается вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP. В одном аспекте вектор TFP может быть непосредственно трансдуцирован в клетку, *например*, Т-клетка. В одном аспекте вектор представляет собой вектор клонирования или экспрессии, *например*, вектор, включающий в себя, помимо прочего, одну или более плазмид (*например*, экспрессионные плазмиды, векторы клонирования, миникольца, минивекторы, двойные микрохромосомы),

конструкции ретровирусных и лентивирусных векторов. В одном аспекте вектор способен экспрессировать конструкцию TFP в Т-клетках млекопитающих. В другом аспекте Т-клетка млекопитающего представляет собой Т-клетку человека.

### **Модифицированные Т-клетки**

**[0265]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыты модифицированные Т-клетки, содержащие рекомбинантную нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе, или вектор, описанный в данном документе; причем модифицированная Т-клетка содержит функциональное нарушение эндогенного TCR. В некоторых вариантах осуществления в данном документе также раскрыты модифицированные Т-клетки, содержащие последовательность, кодирующую TFP в виде нуклеиновой кислоты, раскрытой в данном документе, или TFP, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, раскрытой в данном документе, причем модифицированная Т-клетка содержит функциональное нарушение эндогенного TCR. Далее в некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыты модифицированные аллогенные Т-клетки, содержащие последовательность, кодирующую TFP, раскрытый в данном документе, или TFP, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, раскрытой в данном документе.

**[0266]** В некоторых случаях Т-клетка дополнительно содержит гетерологичную последовательность, кодирующую константный домен TCR, где константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа, константный домен TCR бета или константный домен TCR альфа и константный домен TCR бета. В некоторых случаях эндогенный TCR, который функционально нарушен, представляет собой эндогенную альфа цепь TCR, эндогенную бета цепь TCR или эндогенную альфа цепь TCR и эндогенную бета цепь TCR. В некоторых случаях эндогенный TCR, который функционально нарушен, имеет пониженное связывание с комплексом MHC-пептид по сравнению с немодифицированной контрольной Т-клеткой. В некоторых случаях функциональное нарушение представляет собой нарушение работы гена, кодирующего эндогенный TCR. В некоторых случаях нарушение гена, кодирующего эндогенный TCR, представляет собой удаление последовательности гена, кодирующего эндогенный TCR, из генома Т-клетки. В некоторых случаях Т-клетка является Т-клеткой человека. В некоторых случаях Т-клетка является CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> Т-клеткой. В некоторых случаях Т-клетка является аллогенной Т-клеткой. В некоторых случаях модифицированные Т-клетки дополнительно содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанной со вторым полипептидом, содержащим положительный сигнал от внутриклеточного сигнального

домена. В некоторых случаях ингибирующая молекула содержит первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть PD1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и первичный сигнальный домен.

### **Источники Т-клеток**

[0267] Перед размножением и генетической модификацией у субъекта получают источник Т-клеток. Термин «субъект» предназначен для включения в себя живых организмов, у которых может быть вызван иммунный ответ (*например*, млекопитающие). К примерам субъектов относятся люди, собаки, кошки, мыши, крысы и их трансгенные виды. Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань вилочковой железы, ткань области инфекции, асциты, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В определенных аспектах настоящего изобретения можно использовать любое количество линий Т-клеток, доступных в данной области техники. В некоторых аспектах настоящего изобретения Т-клетки могут быть получены из единицы крови, собранной у субъекта с использованием ряда методик, известных специалисту в данной области техники, таких как отделение Ficoll™. В одном предпочтительном аспекте клетки из циркулирующей крови индивида получают посредством афереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, в том числе Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие образованные ядром белые клетки крови, эритроциты и тромбоциты. В одном аспекте клетки, собранные посредством афереза, могут быть промыты для удаления фракции плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для дальнейших этапов обработки. В одном аспекте настоящего изобретения клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В альтернативном аспекте раствор для промывания не содержит кальций и может не содержать магний или может не содержать многие, если не все, двухвалентные катионы. Начальные этапы активации при отсутствии кальция могут привести к усиленной активации. Как будет понятно специалистам в данной области техники, этап промывания можно осуществить способами, известными специалистам в данной области техники, такими как с использованием полуавтоматической «проточной» центрифуги (*например*, клеточного процессора Cobe® 2991, Baxter OncologyCytoMate или Haemonetics® Cell Saver® 5) в соответствии с инструкциями производителя. После промывания клетки могут быть повторно суспендированы в различных биосовместимых буферах, таких как, *например*, не содержащий Ca, не содержащий Mg PBS, PlasmaLyte A, или другом солевом растворе с буфером или без него. Альтернативно, можно удалять нежелательные компоненты образца для афереза, и непосредственно ресуспендировать клетки в культуральной среде.

**[0268]** В одном аспекте Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови посредством лизиса эритроцитов и истощения моноцитов, например, посредством центрифугирования в градиенте PERCOLL<sup>®</sup> или противоточной центрифужной элютриации. Конкретная субпопуляция Т-клеток, таких как CD3<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> Т-клетки, может быть дополнительно выделена посредством методик положительной или отрицательной селекции. Например, в одном аспекте Т-клетки выделяют посредством инкубации с гранулами, конъюгированными с антителами к CD3/CD28 (*например*, 3x28), такими как DYNABEADS<sup>®</sup> M-450 CD3/CD28 Т, в течение периода времени, достаточного для позитивной селекции желаемых Т-клеток. В одном аспекте период времени составляет около 30 минут. В дополнительном аспекте период времени находится в диапазоне от 30 минут до 36 часов или более для всех целых значений в этом диапазоне. В дополнительном аспекте период времени составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 часов. В еще одном предпочтительном аспекте период времени составляет от 10 до 24 часов. В одном аспекте время инкубации составляет 24 часа. Большее время инкубации можно использовать для выделения Т-клеток в любой ситуации, когда Т-клеток меньше по сравнению с другими типами клеток, как при выделении проникающих в опухоль лимфоцитов (TIL) из опухолевой ткани или у иммунокомпрометированных индивидов. Более того, использование большего времени инкубации может повышать эффективность захвата CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Таким образом, простым уменьшением или увеличением времени связывания Т-клеток с гранулами CD3/CD28 и/или увеличением или уменьшением соотношения гранул к Т-клеткам (как описано ниже в настоящем документе) можно предпочтительно проводить положительный или отрицательный отбор субпопуляций Т-клеток в начале культивирования или в другие моменты времени в течение процесса. Кроме того, повышая или понижая соотношение антител к CD3 и/или к CD28 на гранулах или другой поверхности, можно предпочтительно проводить положительный или отрицательный отбор субпопуляций Т-клетки в начале культивирования или в другие желаемые моменты времени. Специалисту в данной области техники будет понятно, что в контексте настоящего изобретения также можно использовать многочисленные этапы селекции. В определенных аспектах может быть желательным проведение процедуры селекции и использование «неотобранных» клеток в процессе активации и размножения. «Неотобранные» клетки также можно подвергать дополнительным этапам селекции.

**[0269]** Обогащение популяции Т-клеток посредством отрицательной селекции может быть достигнуто с комбинацией антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для отрицательно выбранных клеток. Один способ представляет собой сортировку и/или селекцию клеток посредством отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной

цитометрии, в которых применяют смесь моноклональных антител, направленных на маркеры поверхности клетки, присутствующие на отрицательно отобранных клетках. Например, для обогащения клеток CD4<sup>+</sup> посредством отрицательной селекции, смесь моноклональных антител обычно включает антитела к CD14, CD20, CD1 lb, CD16, HLA-DR и CD8. В определенных аспектах может быть желательным обогащение или положительная селекция регуляторных Т-клеток, которые обычно экспрессируют CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD62Lhi, GITR<sup>+</sup> и FoxP3<sup>+</sup>. Альтернативно, в определенных аспектах регуляторные Т-клетки истощают посредством гранул, конъюгированных с антителом к C25, или другим аналогичным способом селекции.

**[0270]** В одном варианте осуществления можно выбрать такую популяцию Т-клеток, которая экспрессирует один или более из IFN- $\gamma$ , TNF-альфа, IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, гранзима В и перфорины, или другие соответствующие молекулы, *например*, другие цитокины. Способы скрининга на экспрессию клеток можно определить, *например*, с помощью способов, описанных в публикации согласно РСТ №: WO 2013/126712.

**[0271]** Для выделения желаемой популяции клеток посредством положительной или негативной селекции можно изменять концентрацию клеток и поверхность (*например*, частиц, таких как гранулы). В определенных аспектах может быть желательным существенное уменьшение объема, в котором гранулы и клетки смешивают друг с другом (*например*, увеличение концентрации клеток) для обеспечения максимального контактирования клеток и гранул. Например, в одном аспекте используют концентрацию 2 миллиарда клеток/мл. В одном аспекте используют концентрацию 1 миллиард клеток/мл. В дополнительном аспекте используют концентрацию более чем 100 миллионов клеток/мл. В дополнительном аспекте используют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В еще одном аспекте используют концентрацию клеток от 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В дополнительных аспектах могут использовать концентрацию 125 или 150 миллионов клеток/мл. Использование высоких концентраций может приводить к увеличенному выходу клеток, активации клеток и размножению клеток. Более того, использование высоких концентраций клеток обеспечивает более эффективный захват клеток, которые могут слабо экспрессировать представляющие интерес антигены-мишени, таких как CD28-отрицательные Т-клетки, или из образцов, где содержится много опухолевых клеток (*например*, кровь больного лейкозом, опухолевая ткань и т. д.). Такие популяции клеток могут иметь терапевтическое значение, и их получение является желательным. Например, использование высокой концентрации клеток обеспечивает более эффективную селекцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые обычно слабо экспрессируют CD28.

[0272] В родственном аспекте может быть желательным использование более низких концентраций клеток. Значительным разведением смеси Т-клеток и поверхности (например, частиц, таких как гранулы) сводят к минимуму взаимодействия между частицами и клетками. Это позволяет отбирать клетки, которые экспрессируют высокие количества желаемых антигенов, которые должны связываться с частицами. Например, CD4<sup>+</sup> Т-клеток экспрессируют высокие уровни CD28, и их можно более эффективно захватывать по сравнению с CD8<sup>+</sup> Т-клеток в разведенных концентрациях. В одном аспекте используемая концентрация клеток составляет  $5 \times 10^6$ /мл. В других аспектах используемая концентрация может составлять от около  $1 \times 10^5$ /мл до  $1 \times 10^6$ /мл и любое целое значение в этом диапазоне. В других аспектах клетки можно инкубировать на ротационном шейкере в течение периодов времени различной продолжительности при различных скоростях при температуре 2–10°C или при комнатной температуре.

[0273] Т-клетки для стимуляции также можно замораживать после этапа промывания. Не желая быть связанными теорией, этап замораживания и последующего размораживания обеспечивает более однородный продукт в результате удаления гранулоцитов и до некоторой степени моноцитов в популяции клеток. После этапа промывания, на котором удаляют плазму и тромбоциты, клетки можно суспендировать в замораживающем растворе. Несмотря на то, что многие замораживающие растворы и параметры известны в данной области техники и будут являться пригодными в этом контексте, один из способов включает в себя использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% сывороточного альбумина человека, или культуральной среды, содержащей 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% сывороточного альбумина человека и 7,5% DMSO, или 31,25% Plasmalyte-A, 31,25% декстрозы 5%, 0,45% NaCl, 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% сывороточного альбумина человека и 7,5% DMSO, или других подходящих для замораживания клеток сред, содержащих, например, Hespán и PlasmaLyte A, затем клетки замораживают до –80°C при скорости 1 в минуту и хранят в газовой фазе в резервуаре для хранения жидкого азота. Можно использовать другие способы контролируемого замораживания, а также неконтролируемого замораживания непосредственно при температуре –20°C или в жидком азоте. В определенных аспектах криоконсервированные клетки размораживают и промывают, как описано в настоящем документе, и оставляют отстаиваться в течение одного часа при комнатной температуре перед активацией способами по настоящему изобретению.

[0274] В контексте настоящего изобретения также предусмотрен сбор образцов крови или продукта афереза у субъекта в течение периода времени перед тем, когда могут потребоваться размноженные клетки, как описано в настоящем документе. В связи с этим,

источник клеток, подлежащих размножению, можно собирать в любой необходимый момент времени, и желаемые клетки, такие как Т-клетки, можно выделять и замораживать для дальнейшего использования в Т-клеточной терапии для любого количества заболеваний или патологических состояний, для которых Т-клеточная терапия будет эффективной, таких как заболевания, описанные в настоящем документе. В одном аспекте образец крови или продукт афереза получают, как правило, у здорового субъекта. В определенных аспектах образец крови или продукт афереза получают, как правило, у здорового субъекта, который подвержен риску развития заболевания, но у которого еще не развилось заболевание, и представляющие интерес клетки выделяют и замораживают для дальнейшего использования. В определенных аспектах Т-клетки можно подвергать размножению, замораживать и использовать позже. В определенных аспектах образцы собирают у пациента сразу же после диагностики конкретного заболевания, как описано в настоящем документе, но до начала какого-либо лечения. В дополнительном аспекте клетки выделяют из образца крови или продукта афереза у субъекта до начала проведения любого количества подходящих способов лечения, включая, помимо прочего, лечение средствами, такими как натализумаб, эфализумаб, противовирусные средства, химиотерапию, облучение, иммунодепрессивные средства, такие как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат и микофенолат, антитела или другие иммунодеструктивные средства, такие как алемтузумаб, антитела к CD3, цитоксан, флударабин, циклоспорин, такролимус, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, ромидепсин и облучение.

**[0275]** В дополнительном аспекте настоящего изобретения Т-клетки получают у пациента непосредственно после лечения, в результате которого у субъекта остаются функциональные Т-клетки. В связи с этим наблюдали, что после определенных видов лечения раковых заболеваний, в частности, видов лечения с использованием лекарственных средств, которые повреждают иммунную систему, вскоре после лечения в течение периода, когда пациенты обычно восстанавливаются после лечения, качество получаемых Т-клеток может являться оптимальным или улучшенным в отношении их способности к размножению *ex vivo*. Аналогичным образом, после манипуляций *ex vivo* с использованием способов, описываемых в настоящем документе, эти клетки могут находиться в предпочтительном состоянии для повышенного прививания и размножения *in vivo*. Таким образом, в контексте настоящего изобретения предусмотрен сбор клеток крови, включая Т-клетки, дендритные клетки или другие клетки гемопоэтической линии, во время этой фазы восстановления. Более того, в определенных аспектах можно использовать мобилизацию (например, мобилизацию с GM-CSF) и схемы симптоматического лечения для создания состояния у субъекта, при котором благоприятной является репопуляция, рециркуляция,



регенерация и/или размножение конкретных типов клеток, особенно в течение определенного временного окна после терапии. Иллюстративные типы клеток включают в себя Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки и другие клетки иммунной системы.

### Активация и размножение Т-клеток

[0276] Т-клетки можно активировать и подвергать размножению, как правило, используя способы, как описано, например, в патентах США 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041; и 7572631.

[0277] Как правило, Т-клетки по настоящему изобретению можно подвергать размножению путем приведения в контакт с поверхностью, содержащей прикрепленное к ней вещество, которое стимулирует ассоциированный с комплексом CD3/TCR сигнал, и лиганд, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В частности, популяции Т-клеток могут быть стимулированы, как описано в настоящем документе, таким образом, как приведение в контакт с антителом к CD3, или его антигенсвязывающим фрагментом, или антителом к CD2, иммобилизированным на поверхности, или приведение в контакт с активатором протеинкиназы С (*например*, бриостатином) в сочетании с кальциевым ионофором. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток используют лиганд, который связывается со вспомогательной молекулой. Например, популяцию Т-клеток можно приводить в контакт с антителом к CD3 и антителом к CD28 в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации Т-клеток. Для стимуляции пролиферации CD4<sup>+</sup> Т-клеток или CD8<sup>+</sup> Т-клеток можно использовать антитело к CD3 и антитело к CD28. Можно использовать примеры антитела к CD28, включающие в себя 9.3, BT3, XR-CD28 (Diaclone, Besangon, Франция), как и другие способы, общеизвестные в данной области техники (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9): 13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol. Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

[0278] Т-клетки, которые подвергали стимуляции в течение различных периодов времени, могут обладать различными характеристиками. Например, типичные продукты мононуклеарных клеток крови или продукты мононуклеарных клеток периферической крови после афереза содержат популяцию хелперных Т-клеток (ТН, CD4<sup>+</sup>), которая больше, чем популяция цитотоксических или супрессорных Т-клеток (ТС, CD8<sup>+</sup>). Размножение Т-клеток *ex vivo* посредством стимуляции рецепторов CD3 и CD28 приводит к получению популяции Т-клеток, которая до приблизительно 8–9 суток состоит преимущественно из ТН-клеток, тогда как приблизительно через 8–9 суток популяция Т-клеток содержит возрастающую популяцию ТС-клеток. Соответственно, в зависимости от цели лечения, может быть полезным введение субъекту популяции Т-клеток, состоящей

преимущественно из Т-клеток. Аналогично, если была выделена антигенспецифическая субпопуляция ТС-клеток, может быть полезно размножение этой субпопуляции до большего количества.

**[0279]** Более того, в дополнение к маркерам CD4 и CD8 во время процесса размножения клеток значительно изменяются другие фенотипические маркеры, но в значительной степени воспроизводимо. Таким образом, такая воспроизводимость обеспечивает возможность адаптации продукта активированных Т-клеток к конкретным целям.

**[0280]** После создания TFP против CD19, против BCMA, против CD22, против ROR1, против PD-1 или против BAFF можно использовать различные анализы для оценки активности молекулы, такой как, помимо прочего, способность к размножению Т-клеток после стимуляции антигеном, сохранению размножения Т-клеток в отсутствие рестимуляции, а также противораковой активности в соответствующих моделях *in vitro* и животных моделях. Анализы для оценки эффектов TFP против CD 19, против BCMA, против CD22, против ROR1, против PD-1 или против BAFF более подробно описаны ниже.

**[0281]** Анализ вестерн-блоттинга экспрессии TFP в первичных Т-клетках может быть использован для выявления присутствия мономеров и димеров (см., *например*, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453- 1464 (2009)). Если описывать очень кратко, Т-клетки (смесь 1:1 CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток), экспрессирующие TFP, размножаются *in vitro* в течение более чем 10 дней с последующим лизисом и ДСН-ПААГ-электрофорезом в восстанавливающих условиях. TFP выявляют с помощью вестерн-блоттинга, используя антитело к цепи TCR. Аналогичные субпопуляции Т-клеток используют для анализа ДСН-ПААГ-электрофореза в невосстанавливающих условиях, чтобы обеспечить оценку формирования ковалентного димера.

**[0282]** Размножение TFP<sup>+</sup> Т-клеток *in vitro* после стимуляции антигеном может быть измерено с помощью проточной цитометрии. Например, смесь CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток стимулируют с помощью альфа-CD3/альфа-CD28 и APC с последующей трансдукцией лентивирусными векторами, экспрессирующими GFP, под контролем промоторов, подлежащих анализу. К примерам промоторов относятся промоторы гена IE ЦМВ, EF-1 альфа, убиквитина С или фосфоглицерокиназы (PGK). Флуоресценцию ЗФБ оценивают на 6 день культивирования в субпопуляциях CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клеток с помощью проточной цитометрии (см., *например*, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453–1464 (2009)). Альтернативно, смесь CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток стимулируют с помощью магнитных гранул, покрытых альфа-CD3/альфа-CD28 на 0 сутки и трансдуцируют с помощью TFP на 1 сутки, используя бидирекционный лентивирусный вектор, экспрессирующий TFP, вместе с eGFP с помощью последовательности ухода с рибосомы 2А. Культуры повторно

стимулируют CD 19+ клетками K562 (K562-CD19), клетками K562 дикого типа (K562 дикого типа) или клетками K562, экспрессирующими hCD32 и 4-1BBL, в присутствии антитела к CD3 и CD28 (K562-BBL-3/28) после промывания. Экзогенный IL-2 добавляют к культурам через день в концентрации 100 МЕ/мл. GFP+ Т-клетки подсчитывают с помощью проточной цитометрии, используя подсчет на основе гранул (см., *например*, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453–1464 (2009)).

**[0283]** Устойчивое размножение TFP+ Т-клеток в отсутствие повторной стимуляции также может быть измерено (см., *например*, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453–1464 (2009)). Вкратце, средний объем Т-клеток (fl) измеряют на 8 день культивирования, используя счетчик частиц Coulter Multisizer III, после стимуляции с помощью магнитных гранул, покрытых альфаCD3/альфаCD28, на день 0 и трансдукции с помощью указанного TFP на день 1.

**[0284]** Для измерения активности TFP-Т также можно использовать животные модели. Например, ксенотрансплантатная модель с использованием человеческих TFP+ Т-клеток, специфических к CD19, для лечения первичного человеческого пре-В-ОЛЛ у мышей с иммунодефицитом (см., *например*, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453- 1464 (2009)). Если описывать очень кратко, после установления ОЛЛ мышей рандомизируют в группы лечения. Различное количество сконструированных Т-клетки совместно инъецируют в соотношении 1:1 мышам NOD/SCID/ Y/- с B-ALL. Количество копий каждого вектора в ДНК селезенки, полученное у мышей, оценивают в различные моменты времени после инъекции Т-клеток. Животных оценивают на наличие лейкоза с еженедельными интервалами. Подсчет CD 19+ В-ОЛЛ бластных клеток периферической крови измеряют у мышей, которым вводили альфа CD 19-зета TFP + Т-клетки или ложнотрансдуцированные Т-клетки. Кривые выживаемости в группах сравнивают посредством логарифмического рангового теста. Кроме того, также можно проанализировать абсолютные значения CD4+ и CD8+ Т-клеток периферической крови через 4 недели после инъекции Т-клеток мышам NOD/SCID/ $\gamma$ -/-. Мышам инъецируют лейкозные клетки, а через 3 недели инъецируют Т-клетки, сконструированные с возможностью экспрессии TFP с помощью бицистронного линтивирального вектора, который кодирует TFP, связанный с УЗФБ. Т-клетки нормализуют к 45–50% введенных GFP+ Т-клеток путем смешивания с ложнотрансдуцированными клетками перед инъекцией и подтверждают с помощью проточной цитометрии. Животных оценивают на наличие лейкоза с еженедельными интервалами. Кривые выживаемости в группах TFP+ Т-клеток сравнивают посредством логарифмического рангового теста.

**[0285]** Можно оценить дозозависимый ответ на лечение TFP (см., *например*, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453–1464 (2009)). Например, периферическую кровь получают

через 35-70 дней после установления лейкоза у мышей, инъецированных на 21 день TFP-T-клетками, эквивалентным количеством ложнотрансдуцированных T-клеток или неинъецированных T-клетками. У мышей из каждой группы случайным образом берут кровь для определения количества CD 19+ ОЛЛ бластных клеток в периферической крови, а затем животных умерщвляют на 35 и 49 день. Оставшихся животных оценивают на 57 и 70 день.

**[0286]** Оценка пролиферации клеток и выработки цитокинов была описана ранее, *например*, у Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). Вкратце, оценка TFP-опосредованной пролиферации осуществляется на планшетах для микротитрования путем смешивания промытых T-клеток с клетками K562, экспрессирующими CD19 (K19) или CD32 и CD137 (KT32-BBL) для получения конечного соотношения T-клетки:K562, равного 2:1. Клетки K562 перед использованием облучают гамма-излучением. Моноклональные антитела к CD3 (клон ОКТ3) и CD28 (клон 9.3) добавляют к культурам с клетками KT32-BBL в качестве положительного контроля для стимуляции пролиферации T-клеток, поскольку эти сигналы поддерживают длительное размножение CD8+ T-клеток *ex vivo*. T-клетки в культурах подсчитывают с помощью флуоресцирующих гранул CountBright™ (Invitrogen) и проточной цитометрии, как описано у производителя. TFP+ T-клетки идентифицируют путем экспрессии GFP, используя T-клетки, которые были сконструированы с помощью экспрессирующих TFP лентивирусных векторов, связанных с eGFP-2A. В случае TFP+ T-клеток, которые не экспрессируют GFP, TFP+ T-клетки определяют с помощью биотинилированного рекомбинантного белка CD 19 и вторичного конъюгата авидин-PE. Экспрессию CD4+ и CD8+ на T-клетках также одновременно определяют с помощью специфических моноклональных антител (BD Biosciences). Измерения цитокинов выполняют на супернатантах, собранных через 24 часа после повторной стимуляции, используя набор для количественного определения растворимых форм цитокинов human TH1/TH2 cytokine cytometric bead array kit (BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя. Флуоресценцию оценивают с помощью проточного цитометра FACScalibur™ (BD Biosciences), а данные анализируют в соответствии с инструкциями производителя.

**[0287]** Цитотоксичность могут оценивать с помощью стандартного анализа высвобождения <sup>51</sup>Cr (см., *например*, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453–1464 (2009)). Клетки-мишени (линии K562 и первичные pro-B-ОЛЛ клетки) загружают <sup>51</sup>Cr (в качестве NaCrO<sub>4</sub>, New England Nuclear) при температуре 37 °C в течение 2 часов с частым перемешиванием, дважды промывают в полной RPMI и высевают на планшеты для микротитрования. Эффекторные T-клетки смешивают с целевыми клетками в лунках в полной среде RPMI в различных соотношениях эффекторных клеток с целевыми клетками (E:T). Готовят также

дополнительные лунки, содержащие только среду (спонтанное высвобождение, СВ) или 1% раствор детергента Тритон-Х 100 (полное высвобождение, ПВ). Через 4 часа инкубации при температуре 37 °С собирают супернатант из каждой лунки. Затем измеряют высвобожденный  $^{51}\text{Cr}$  с помощью счетчика гамма-частиц (Packard Instrument Co., Уолтем, штат Массачусетс). Каждое условие выполняют по меньшей мере в трех повторностях, а процентное содержание лизиса подсчитывают, используя следующую формулу: % лизиса =  $(\text{ЭВ}-\text{СВ})/(\text{ПВ}-\text{СВ})$ , где ЭВ представляет среднее значение высвобожденного  $^{51}\text{Cr}$  для каждого экспериментального условия.

**[0288]** Технологии визуализации могут использоваться для оценки специфической миграции и пролиферации TFP в животных моделях опухоленосителей. Такие анализы были описаны, *например*, у Barrett et al., Human Gene Therapy 22:1575-1586 (2011). Мышам NOD/SQD/ $\gamma\text{c}/-$  (NSG) в/в инъецируют клетки Nalm-6 (ATCC® CRL-3273™), затем через 7 дней — Т-клетки через 4 часа после электропорации конструкциями TFP. Т-клетки стабильно трансфицируют лентивирусной конструкцией, чтобы экспрессировать люциферазу светлячка, и мышей визуализируют на предмет биолюминесценции. Альтернативно, терапевтическую эффективность и специфичность одной инъекции TFP+ Т-клеток в раковой ксенотрансплантатной модели Nalm-6 можно измерить следующим образом: Мышам NSG инъецируют клетки Nalm-6, трансдуцированные с возможностью стабильно экспрессировать люциферазу светлячка, с последующей одной инъекцией в хвостовую вену Т-клеток, электропорированных TFP CD 19 через 7 дней. Животных визуализируют в различные моменты времени после инъекции. Например, можно получить тепловые карты плотности фотонов лейкоза, положительного на люциферазу светлячка, у репрезентативных мышей на 5 день (за 2 дня до лечения) и на 8 день (через 24 часа после TFP+ лейкоцитов периферической крови).

**[0289]** Другие анализы, в том числе те, которые описаны в разделе «Примеры» в данном документе, а также те, которые известны в данной области техники, также могут быть использованы для оценки полученных TFP конструкторов против CD19, против BCMA, против CD22, против ROR1, против PD-1 или против BAFF по данному документу.

#### **Фармацевтические композиции**

**[0290]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты фармацевтические композиции, содержащие: (а) модифицированные Т-клетки согласно данному документу; и (b) фармацевтически приемлемый носитель. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер и т. п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин;

антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК или глутатион; адъюванты (*например*, гидроксид алюминия) и консерванты. Композиции по настоящему изобретению в одном аспекте составлены для внутривенного введения.

**[0291]** Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут вводиться таким способом, который соответствует заболеванию, подлежащему лечению (или предотвращению). Количество и частота введения будут определяться такими факторами, как состояние пациента, а также тип и степень тяжести заболевания пациента, хотя соответствующие дозы могут быть установлены в клинических исследованиях.

**[0292]** В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по существу не содержит, *например*, отсутствуют определяемые уровни загрязняющего вещества, *например*, выбранного из группы, состоящей из эндотоксина, микоплазмы, компетентного по репликации лентивируса (RCL), р24, нуклеиновой кислоты VSV-G, ВИЧ gag, остаточных гранул, покрытых антителами к CD3/CD28, мышинных антител, смешанной сыворотки человека, бычьего сывороточного альбумина, бычьей сыворотки, компонентов культуральной среды, упаковывающей вектор клетки или плазмидных компонентов, а также бактерии и грибка. В одном варианте осуществления бактерия представляет собой по меньшей мере одну, выбранную из группы, состоящей из *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia* и *Streptococcus pyogenes* группы А.

**[0293]** Когда указывается «иммунологически эффективное количество», «противоопухолевое эффективное количество», «ингибирующее опухоль эффективное количество» или «терапевтическое количество», точное количество композиции по настоящему изобретению, подлежащее введению, может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий по возрасту, весу, размеру опухоли, степени инфекции или метастазирования, а также состояния пациента (субъекта). В целом, можно отметить, что фармацевтическая композиция, содержащая Т-клетки, описанные в настоящем документе, может вводиться в дозах от  $10^4$  до  $10^9$  клеток/кг массы тела, в некоторых случаях — от  $10^5$  до  $10^6$  клеток/кг массы тела, включая все целые значения в этих диапазонах. Композиции Т-клеток также могут вводиться несколько раз в этих дозах. Клетки могут вводиться с помощью методов инфузии, которые широко известны в области иммунотерапии (см., *например*, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988).

**[0294]** В некоторых аспектах может быть необходимым введение активированных Т-клеток субъекту, затем повторное взятие крови впоследствии (или осуществление афереза), активация полученных Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением и повторная

инфузия пациенту этих активированных и размноженных Т-клеток. Этот процесс может выполняться несколько раз каждые несколько недель. В некоторых аспектах Т-клетки могут быть активированы во взятой крови объемом от 10 куб. см до 400 куб. см. В некоторых аспектах Т-клетки активируют во взятой крови объемом 20 куб. см, 30 куб. см, 40 куб. см, 50 куб. см, 60 куб. см, 70 куб. см, 80 куб. см, 90 куб. см или 100 куб. см.

**[0295]** Ведение субъекту композиций может осуществляться любым удобным способом, включая ингаляцию аэрозолем, инъекцию, пероральное поступление, трансфузию, имплантацию или трансплантацию. Композиции, описанные в настоящем документе, могут вводиться пациенту трансартериально, подкожно, внутрикочно, внутриопухолево, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной (в/в) инъекции или внутрибрюшинно. В одном аспекте композиции Т-клетки по настоящему изобретению вводят пациенту путем внутрикочной или подкожной инъекции. В одном аспекте композиции Т-клеток по настоящему изобретению вводят путем в/в инъекции. Композиции Т-клеток могут инъектировать непосредственно в опухоль, лимфатический узел или в область инфекции.

**[0296]** В конкретном иллюстративном аспекте субъект может подвергаться лейкоферезу, при этом лейкоциты собирают, обогащают или истощают *ex vivo*, чтобы отобрать и/или выделить представляющие интерес клетки, *например*, Т-клетки. Такие Т-клеточные изоляты могут быть размножены известными в данной области техники способами и обработаны таким образом, что может быть введена одна или более конструкций TFP по настоящему изобретению, таким образом, создавая модифицированные Т-Т-клетку по настоящему изобретению. Нуждающиеся в этом субъекты могут впоследствии подвергаться стандартному лечению высокодозной химиотерапией с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В некоторых аспектах после трансплантации или одновременно с ней субъектам выполняют инфузию размноженных модифицированных Т-клеток по настоящему изобретению. В дополнительном аспекте размноженные клетки вводят до операции или после нее.

**[0297]** Дозировка вышеприведенных требующих введения пациенту видов лечения будет варьироваться в зависимости от точной природы патологического состояния, подлежащего лечению, и реципиента лечения. Масштабирование доз для введения человеку можно выполнять в соответствии с принятыми в данной области практиками. Доза алемтузумаба, например, обычно будет варьироваться в диапазоне от 1 до около 100 мг для взрослых пациентов, как правило, ее вводят ежедневно в течение периода времени от 1 до 30 дней. Предпочтительная дневная доза составляет от 1 до 10 мг в день, хотя в некоторых случаях могут использоваться большие дозы до 40 мг в день (описано в патенте США 6120766).

**[0298]** В одном варианте осуществления TFP вводят в Т-клетки, *например*, с использованием транскрипции *in vitro*, и субъект (*например*, человек) получает начальное введение TFP-Т-клеток по настоящему изобретению и одно или более последующих введений TFP-Т-клеток по настоящему изобретению, причем одно или более последующих введений выполняют менее чем через 15 дней, *например*, через 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения. В одном варианте осуществления субъекту (*например*, человеку) выполняют более одного введения TFP-Т-клеток по настоящему изобретению в неделю, *например*, выполняют 2, 3 или 4 введения TFP-Т-клеток по настоящему изобретению в неделю. В одном варианте осуществления субъекту (*например*, человеку) выполняют более одного введения TFP-Т-клеток в неделю (*например*, 2, 3 или 4 введения в неделю) (также называется в настоящем документе как цикл) с последующим перерывом введения TFP-Т-клеток на одну неделю, а затем субъекту выполняют одно или более дополнительных введений TFP-Т-клеток (*например*, более одного введения TFP-Т-клеток в неделю). В другом варианте осуществления субъекту (*например*, человеку) выполняют введение более одного цикла TFP-Т-клеток, а период времени между каждым циклом составляет менее чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 дня. В одном варианте осуществления TFP-Т-клетки вводят через день за 3 введения в неделю. В одном варианте осуществления TFP-Т-клетки по настоящему изобретению вводят в течение по меньшей мере двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или более недель.

**[0299]** В одном аспекте TFP-Т-клетки против **CD 19** получают с помощью лентивирусных вирусных векторов, таких как лентивирус. Полученные таким образом TFP-Т-клетки будут иметь устойчивую экспрессию TFP.

**[0300]** В одном аспекте TFP-Т-клетки временно экспрессируют векторы TFP в течение 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 дней после трансдукции. Временная экспрессия TFP может быть осуществлена путем доставки вектора TFP РНК. В одном аспекте РНК TFP трансдуцируют в Т-клетку путем электропорации.

**[0301]** Потенциальной проблемой, которая может возникнуть у пациентов, получающих лечение с помощью Т-клеток, временно экспрессирующих TFP (в частности с помощью мышинных TFP-Т-клеток, несущих scFv), является анафилаксия после нескольких лечений.

**[0302]** Не ограничиваясь данной теорией, считается, что подобный анафилактический ответ может быть вызван развивающимся гуморальным ответом против TFP у пациента, т. е. антителами к TFP, имеющими изотип против IgE. Полагают, что клетки пациента, вырабатывающие антитела, подвергаются переключению класса с изотипа IgG (который не вызывает анафилаксию) на изотип IgE, когда существует перерыв в воздействии антигеном, составляющий от десяти до четырнадцати дней.



**[0303]** Если пациент подвержен высокому риску развития ответа на антитела к TFP в ходе лечения временной терапией TFP (например, полученные путем трансдукции РНК), перерывы в инфузии TFP-T-клеток не должны длиться более, чем от десяти до четырнадцати дней.

#### **Способы получения модифицированных T-клеток**

**[0304]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты способы получения модифицированной T-клетки согласно раскрытию, включающие (a) нарушение эндогенного гена TCR, кодирующего альфа цепь TCR, бета цепь TCR, гамма цепь TCR, дельта TCR или любая их комбинация; тем самым продуцируя T-клетку, содержащую функциональное нарушение эндогенного гена TCR; и (b) трансдукцию T-клетки, содержащей функциональное нарушение эндогенного гена TCR, рекомбинантной нуклеиновой кислотой по изобретению или вектором, раскрытым в данном документе. В некоторых случаях нарушение включает трансдукцию T-клетки белком нуклеазы или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок нуклеазы, нацеленной на эндогенный ген, кодирующий альфа цепь TCR, бета цепь TCR или альфа цепь TCR и бета цепь TCR.

**[0305]** Далее в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты способы получения модифицированной T-клетки по изобретению, включающие трансдукцию T-клетки, содержащей функциональное нарушение эндогенного гена TCR, рекомбинантной нуклеиновой кислотой, раскрытой в настоящем документе, или векторами, раскрытыми в настоящем документе. В некоторых случаях T-клетка, содержащая функциональное нарушение эндогенного гена TCR, представляет собой T-клетку, содержащую функциональное нарушение эндогенного гена TCR, кодирующего альфа цепь TCR, бета цепь TCR или альфа цепь TCR и бета цепь TCR.

**[0306]** В некоторых случаях T-клетка является T-клеткой человека. В некоторых случаях T-клетка, содержащая функциональное нарушение эндогенного гена TCR, имеет пониженное связывание с комплексом МНС-пептид по сравнению с немодифицированной контрольной T-клеткой.

**[0307]** В некоторых случаях нуклеаза представляет собой мегануклеазу, нуклеазу «цинковые пальцы» (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активатору транскрипции (TALEN), нуклеазу CRISPR/Cas, никазу CRISPR/Cas или нуклеазу megaTAL. В некоторых случаях последовательность, содержащаяся в рекомбинантной нуклеиновой кислоте или векторе, вставляется в ген эндогенной субъединицы TCR в сайте рестрикции, и при этом вставка последовательности в ген эндогенной субъединицы TCR функционально нарушает эндогенную субъединицу TCR. В некоторых случаях нуклеаза представляет собой

мегануклеазу. В некоторых случаях мегануклеаза содержит первую субъединицу и вторую субъединицу, причем первая субъединица связывается с первым полусайтом распознавания последовательности распознавания, а вторая субъединица связывается со вторым полусайтом распознавания последовательности распознавания. В некоторых случаях мегануклеаза представляет собой одноцепочечную мегануклеазу, содержащую линкер, при этом линкер ковалентно соединяет первую субъединицу и вторую субъединицу.

### Технологии редактирования генов

**[0308]** В некоторых вариантах реализации модифицированные Т-клетки, раскрытые в настоящем документе, сконструированы с использованием методики редактирования генов, такой как методы: короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (CRISPR®, см., например, патент США 8697359), эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALE) (TALEN, см., например, патент США 9393257), мегануклеазы (эндодезоксирибонуклеазы, имеющие большие сайты распознавания, содержащие последовательности двухцепочечной ДНК из 12-40 пар оснований), нуклеаза с цинковыми пальцами (ZFN, см., например, Urnov et al., Nat Rev. Genetics (2010) v11, 636-646), или нуклеазами megaTAL (слитый белок мегануклеазы с повторами TAL). Таким образом, химерная конструкция может быть сконструирована для объединения желаемых характеристик каждой субъединицы, таких как конформация или возможности передачи сигналов. Смотрите также Sander & Joung, Nat. Biotech. (2014) v32, 347-55; и June et al., 2009 Nature Reviews Immunol. 9.10: 704-716, каждая включена в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации один или более из внеклеточного домена, трансмембранного домена или цитоплазматического домена субъединицы TFP сконструированы так, чтобы иметь признаки более чем одного домена природной субъединицы TCR (т.е. являются химерными).

**[0309]** Недавние разработки технологий для постоянного изменения генома человека и внесения сайт-специфических модификаций генома в гены, связанные с заболеванием, закладывают основу для терапевтических применений. Эти технологии сейчас широко известны как «редактирование генома».

**[0310]** В некоторых вариантах осуществления изобретения методики редактирования генов используются для разрушения эндогенного гена TCR. В некоторых вариантах осуществления упомянутый эндогенный ген TCR кодирует альфа цепь TCR, бета цепь TCR или альфа цепь TCR и бета цепь TCR. В некоторых вариантах реализации методики редактирования генов открывают путь для множественного редактирования генома, которое позволяет одновременно разрушать несколько геномных локусов в эндогенном гене TCR. В некоторых вариантах осуществления методики мультиплексного геномного

редактирования применяются для создания Т-клеток с нарушенным геном, которые имеют дефицит в экспрессии эндогенного TCR, и/или лейкоцитарных антигенов человека (HLA), и/или белка программируемой гибели клеток 1 (PD1), и/или других генов.

**[0311]** Современные методики редактирования генов включают мегануклеазы, нуклеазы «цинковые пальцы» (ZFN), эффекторные нуклеазы TAL (TALEN) и короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (CRISPR)/CRISPR-связанные (Cas) системы. Эти четыре основных класса методик редактирования генов имеют общий способ действия при связывании заданной пользователем последовательности ДНК и опосредовании разрыва двухцепочечной ДНК (DSB). Затем DSB может быть репарирован либо негомولوجичным соединением концов (NHEJ), либо, при наличии донорной ДНК, гомологичной рекомбинацией (HR), событием, которое вводит гомологичную последовательность из фрагмента донорной ДНК. Кроме того, нуклеазы никазы генерируют разрывы одноцепочечной ДНК (SSB). DSB можно репарировать путем включения одноцепочечной ДНК (ssDI) или репарации одноцепочечной матрицы (ssTR), события, при котором вводится гомологичная последовательность из донорной ДНК.

**[0312]** Генетическая модификация геномной ДНК может быть выполнена с использованием сайт-специфичных, редкощепящих эндонуклеаз, которые сконструированы для распознавания последовательностей ДНК в интересующем локусе. Способы получения сконструированных сайт-специфических эндонуклеаз известны в данной области техники. Например, нуклеазы «цинковые пальцы» (ZFN) могут быть сконструированы для распознавания и разрезания заранее определенных участков в геноме. ZFN представляют собой химерные белки, содержащие ДНК-связывающий домен цинкового пальца, слитый с нуклеазным доменом рестрикционного фермента FokI. Домен цинкового пальца может быть изменен с помощью рациональных или экспериментальных средств для получения белка, который связывается с заранее определенной последовательностью ДНК длиной 18 пар оснований. Путем слияния этого сконструированного белкового домена с нуклеазой FokI можно воздействовать на разрывы ДНК со специфичностью на уровне генома. ZFN широко используются для нацеливания для добавления, удаления и замены генов в широком спектре эукариотических организмов (рассмотрено в Durai et al. (2005), *Nucleic Acids Res* 33, 5978). Аналогичным образом, TAL-эффекторные нуклеазы (TALEN) могут быть созданы для расщепления определенных сайтов в геномной ДНК. Подобно ZFN, TALEN содержит сконструированный сайт-специфический ДНК-связывающий домен, слитый с доменом нуклеазы FokI (рассмотрено в Mak et al. (2013), *Curr Opin Struct Biol.* 23:93-9). Однако в этом случае ДНК-связывающий домен включает тандемный массив TAL-эффекторных доменов, каждый из которых специфически распознает одну пару

оснований ДНК. Компактные TALEN имеют альтернативную архитектуру эндонуклеаз, которая позволяет избежать димеризации (Beurdeley et al. (2013), *Nat Commun.* 4: 1762). Компактный TALEN содержит сконструированный сайт-специфический TAL-эффекторный ДНК-связывающий домен, слитый с нуклеазным доменом хоуминг-эндонуклеазы I-TevI. В отличие от FokI, I-TevI не нуждается в димеризации для образования двухцепочечного разрыва ДНК, поэтому компактный TALEN функционирует как мономер.

**[0313]** Сконструированные эндонуклеазы на основе системы CRISPR/Cas9 также известны в данной области техники (Ran et al. (2013), *Nat Protoc.* 8:2281-2308; Mali et al. (2013), *Nat Methods* 10:957-63). Технология редактирования генов CRISPR состоит из белка эндонуклеазы, специфичность ДНК-нацеливания и режущая активность которой могут быть запрограммированы с помощью короткой направляющей РНК или дуплекса crРНК/tracrРНК. Эндонуклеаза CRISPR состоит из двух компонентов: (1) эффекторной нуклеазы каспазы, обычно микробной Cas9; и (2) короткой «направляющей РНК» или дуплекса РНК, включающего целевую последовательность из 18-20 нуклеотидов, которая направляет нуклеазу в интересующее место в геноме. Экспрессируя несколько направляющих РНК в одной и той же клетке, каждая из которых имеет различную целевую последовательность, можно нацеливать разрывы ДНК одновременно на несколько участков генома (мультиплексное редактирование генома).

**[0314]** Существует два класса систем CRISPR, известных в данной области техники (Adli (2018) *Nat. Commun.* 9:1911), каждый из которых содержит несколько типов CRISPR. Класс I содержит системы CRISPR типа I и типа III, которые обычно встречаются у архей. А класс II содержит системы CRISPR типов II, IV, V и VI. Хотя наиболее широко используемой системой CRISPR/Cas является система CRISPR-Cas9 типа II, исследователи перепрофилировали системы CRISPR/Cas для редактирования генома. За последние несколько лет было реконструировано более 10 различных белков CRISPR/Cas (Adli (2018) *Nat. Commun.* 9:1911). Среди них особенно интересны такие белки как Cas12a (Cpf1) из *Acidaminococcus* sp. (AsCpf1) и бактерии *Lachnospiraceae* (LbCpf1).

**[0315]** Хоуминг-эндонуклеазы представляют собой группу встречающихся в природе нуклеаз, которые распознают сайты расщепления на 15-40 пар оснований, обычно встречающиеся в геномах растений и грибов. Они часто связаны с паразитическими элементами ДНК, такими как самосплайсинговые интроны и интеины группы 1. Они естественным образом способствуют гомологичной рекомбинации или встраиванию гена в определенные места в геноме хозяина, производя двухцепочечный разрыв в хромосоме, который задействует механизм репарации клеточной ДНК (Stoddard (2006), *Q. Rev. Biophys.* 38: 49- 95). Определенные аминокислотные замены могут перепрограммировать

специфичность расщепления ДНК хоуминг-нуклеаз (Niyonzima (2017), *Protein Eng Des Sei.* 30(7): 503–522). Мегануклеазы (MN) - это мономерные белки с врожденной нуклеазной активностью, которые получены из бактериальных хоуминг-эндонуклеаз и сконструированы для уникального целевого сайта (Gersbach (2016), *Molecular Therapy.* 24: 430–446). В некоторых вариантах осуществления мегануклеаза представляет собой сконструированную хоуминг-эндонуклеазу I-Crel. В других вариантах осуществления мегануклеаза представляет собой сконструированную хоуминг-эндонуклеазу I-Scel.

**[0316]** В дополнение к упомянутым четырем основным методикам редактирования генов, были сконструированы химерные белки, содержащие слитые мегануклеазы, ZFN и TALEN, для создания новых мономерных ферментов, которые используют аффинность связывания ZFN и TALEN и специфичность расщепления мегануклеаз (Gersbach (2016), *Molecular Therapy.* 24: 430–446). Например, megaTAL представляет собой отдельный химерный белок, который представляет собой комбинацию легко адаптируемых ДНК-связывающих доменов из TALEN с высокой эффективностью расщепления мегануклеаз.

**[0317]** Чтобы выполнить методику редактирования генов, нуклеазы, а в случае системы CRISPR/Cas9 - гРНК, должны быть эффективно доставлены в интересующие клетки. Способы доставки, такие как физические, химические и вирусные методы, также известны в данной области техники (Mali (2013). *Indian J. Hum. Genet.* 19: 3-8.). В некоторых случаях способы физической доставки могут быть выбраны из способов электропорации, микроинъекции или использования баллистических частиц, но не ограничиваются ими. С другой стороны, химические способы доставки требуют использования сложных молекул, таких как фосфат кальция, липид или белок. В некоторых вариантах осуществления способы доставки вирусов применяются для методик редактирования генов с использованием вирусов, таких как аденовирус, лентивирус и ретровирус, но не ограничиваясь ими.

#### **Способы лечения**

**[0318]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыты способы лечения рака у субъекта, который в этом нуждается, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций, раскрытых в данном документе. Дополнительно в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления, описаны способы лечения рака у субъекта, который в этом нуждается, причем способ включает введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей (а) модифицированные Т-клетки, полученные в соответствии со способами по изобретению; и (b) фармацевтически приемлемый носитель.

**[0319]** В некоторых случаях модифицированная Т-клетка является аллогенной Т-клеткой.

В некоторых случаях у субъекта высвобождается меньше цитокинов по сравнению с субъектом, которому вводят эффективное количество немодифицированных контрольных Т-клеток. В некоторых случаях у субъекта высвобождается меньше цитокинов по сравнению с субъектом, которому вводят эффективное количество модифицированной Т-клетки, содержащей рекомбинантную нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе, или вектор, описанный в данном документе.

**[0320]** В некоторых случаях способ включает введение фармацевтической композиции в комбинации с агентом, повышающим эффективность фармацевтической композиции. В некоторых случаях способ включает введение фармацевтической композиции в комбинации с агентом, который ослабляет один или несколько побочных эффектов, связанных с фармацевтической композицией.

**[0321]** В некоторых случаях рак представляет собой солидный рак, лимфому или лейкоз. В некоторых случаях рак выбирают из группы, состоящей из почечно-клеточной карциномы, рака груди, рака легкого, рака яичников, рака простаты, рака толстой кишки, рака шейки матки, рака мозга, рака печени, рака поджелудочной железы, рака почки и желудка.

**[0322]** Настоящее изобретение также включает тип клеточной терапии, при которой Т-клетки генетически модифицируют для экспрессии TFP и константного домена TCR альфа и/или бета, и модифицированные Т-клетки вводят нуждающемуся в этом реципиенту. Вводимая клетка способна уничтожить опухолевые клетки у реципиента. В отличие от терапии антителами, модифицированные Т-клетки способны к репликации *in vivo*, что приводит к длительной стойкости, что может привести к устойчивому контролю над опухолью. В различных аспектах вводимые пациенту Т-клетки или их потомство сохраняются у пациента в течение по меньшей мере четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, одиннадцати месяцев, двенадцати месяцев, тринадцати месяцев, четырнадцати месяцев, пятнадцати месяцев, шестнадцати месяцев, семнадцати месяцев, восемнадцати месяцев, девятнадцати месяцев, двадцати месяцев, двадцати одного месяца, двадцати двух месяцев, двадцати трех месяцев, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет после введения Т-клетки пациенту.

**[0323]** Настоящее изобретение также включает тип клеточной терапии, при которой Т-клетки модифицируют, *например*, с помощью *in vitro* транскрибированной РНК, для временной экспрессии TFP и константного домена TCR альфа и/или бета, и модифицированные Т-клетки вводят нуждающемуся в этом реципиенту. Вводимая клетка способна уничтожить опухолевые клетки у реципиента. Таким образом, в различных аспектах вводимые пациенту Т-клетки сохраняются в течение менее чем одного месяца, *например*, в течение трех недель, двух недель или одной недели, после введения Т-клетки

пациенту.

**[0324]** Без привязки к какой-либо конкретной теории противоопухолевый иммунный ответ, вызываемый модифицированными Т-клетками, может представлять собой активный или пассивный иммунный ответ или, альтернативно, может быть обусловлен прямым или непрямым иммунным ответом.

**[0325]** В одном аспекте человеческие модифицированные Т-клетки по настоящему изобретению могут представлять собой вид вакцины для иммунизации *ex vivo* и/или терапии *in vivo* у млекопитающего. В одном аспекте млекопитающее является человеком.

**[0326]** В отношении иммунизации *ex vivo* перед введением клетки млекопитающему происходит *in vitro* по меньшей мере одно из следующего: i) размножение клеток; ii) введение в клетки нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP и константный домен TCR альфа- и/или бета, или iii) криоконсервация клеток.

**[0327]** Процедуры *ex vivo* хорошо известны в данной области техники и более подробно описываются ниже. Вкратце, клетки выделяют у млекопитающего (*например*, у человека) и генетически модифицируют (т. е. трансдуцируют или трансфицируют *in vitro*) с помощью вектора, описанного в настоящем документе. Модифицированную Т-клетку могут вводить млекопитающему-реципиенту для обеспечения терапевтической пользы. Млекопитающее-реципиент может быть человеком, а модифицированная клетка может быть аутологической по отношению к реципиенту. Альтернативно, клетки могут быть аллогенными, сингенными или ксеногенными по отношению к реципиенту.

**[0328]** Процедура размножения *ex vivo* гемопоэтических стволовых клеток и прогениторных клеток описана в патенте США 5199942, включенном в настоящий документ посредством ссылки, и может применяться к клеткам по настоящему изобретению. Другие подходящие способы известны в данной области техники, таким образом, настоящее изобретение не ограничивается каким-либо конкретным способом размножения клеток *ex vivo*. Вкратце, культивирование и размножение Т-клеток *ex vivo* включает в себя: (1) выделение CD34+ гемопоэтических стволовых клеток и прогениторных клеток у млекопитающего из отбора периферической крови или эксплантатов костного мозга; и (2) размножение таких клеток *ex vivo*. Помимо клеточных факторов роста, описанных в патенте США 5199942, для культивирования и размножения клеток можно использовать другие факторы, такие как flt3-L, IL-1, IL-3 и лиганд c-kit.

**[0329]** Помимо использования вакцины на основе клеток с точки зрения иммунизации *ex vivo*, в настоящем изобретении также предлагаются композиции и способы иммунизации *in vivo* с целью вызвать иммунный ответ, направленный против антигена у пациента.

**[0330]** В целом, клетки, активированные и размноженные так, как описано в настоящем

документе, могут использоваться для лечения и предотвращения заболеваний, которые возникают у иммунокомпрометированных индивидов.

**[0331]** Модифицированные Т-клетки по настоящему изобретению можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или другими компонентами, такими как ИЛ-2, или другими цитокинами, или популяциями клеток.

### ***Комбинированные терапии***

**[0332]** Модифицированная Т-клетка, описанная в настоящем документе, может использоваться в комбинации с другими известными веществами и методами лечения. Введение «в комбинации», как используется в настоящем документе, означает, что два (или более) различных средства лечения доставляют субъекту в ходе заболевания, *например*, два или более средств лечения доставляют после того, как у субъекта диагностировали нарушение, и перед тем, как нарушение было вылечено, или устранено, или лечение было прекращено по другим причинам. В некоторых вариантах осуществления доставка одного средства лечения все еще происходит, когда начинается доставка второго средства лечения, таким образом, существует перекрытие с точки зрения введения. Иногда в настоящем документе это называется как «одновременная» или «сопутствующая доставка». В других вариантах осуществления доставка одного средства лечения заканчивается до начала доставки другого средства лечения. В некоторых вариантах осуществления в любом из случаев лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, второе средство лечения является более эффективным, *например*, эквивалентный эффект наблюдается при меньшей дозе второго средства лечения, или же второе средство лечения снижает симптомы в большей степени, чем наблюдалось бы в том случае, если бы второе средство лечения вводили в отсутствие первого средства лечения, или же аналогичная ситуация наблюдается для первого средства лечения. В некоторых вариантах осуществления доставка осуществляется таким образом, что снижение симптома или другого параметра, связанного с заболеванием, является более значительным, чем наблюдалось бы в том случае, если бы одно средство лечения доставляли в отсутствие другого. Эффект двух средств лечения может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или большим чем аддитивный. Доставка может осуществляться таким образом, что эффект первого вводимого средства лечения все еще будет определяться во время доставки второго средства.

**[0333]** В некоторых вариантах осуществления «по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое вещество» включает в себя модифицированные Т-клетки. Также предлагаются Т-клетки, которые экспрессируют множество TFR, которые связываются с



одними и теми же или различными антигенами-мишенями либо с одними и теми же или различными эпитопами на одном и том же антигене-мишени. Также предложены популяции Т-клеток, в которых первая субпопуляция Т-клеток экспрессирует первый TFP и константный домен TCR альфа и/или бета, а вторая субпопуляция Т-клеток экспрессирует второй TFP и константный домен альфа и/или бета TCR.

**[0334]** Модифицированная Т-клетка, описанная в настоящем документе, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое вещество могут вводиться одновременно в одной или в отдельных композициях, либо вводиться последовательно. В случае последовательного введения модифицированная Т-клетка, описанная в настоящем документе, может вводиться первой, а дополнительное вещество может вводиться вторым, либо же порядок введения может быть противоположным.

**[0335]** В дополнительных аспектах модифицированная Т-клетка, описанная в настоящем документе, может использоваться в схеме лечения в комбинации с оперативным вмешательством, химиотерапией, облучением, иммунодепрессивными средствами, такими как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антителами или другими иммунодеструктивными средствами, такими как алемтузумаб, антитела к CD3 или другие виды терапии антителами, цитоксан, флударабин, циклоспорин, такролимус, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, ромидепсин, цитокины, и облучение, пептидная вакцина, такая как описанная у Izumoto et al. 2008 JNeurosurg 108:963-971.

**[0336]** В одном варианте осуществления субъекту могут вводить вещество, которое снижает или облегчает побочный эффект, связанный с введением модифицированной Т-клетки. Побочные эффекты, связанные с введением модифицированной Т-клетки, включают в себя, помимо прочего, синдром высвобождения цитокинов (СВЦ) и гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (ГЛГ), также называемый синдромом активации макрофагов (САМ). К симптомам СВЦ относится высокая температура, тошнота, преходящая гипотензия, гипоксия и т. п. Соответствующим образом, способы, описанные в настоящем документе, могут включать в себя введение модифицированной Т-клетки, описанной в настоящем документе, субъекту и дополнительное введение вещества для сдерживания повышенных уровней растворимого фактора, возникающих вследствие лечения модифицированной Т-клеткой. В одном варианте осуществления растворимый фактор, повышенный у субъекта, представляет собой один или более из IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 и IL-6. Таким образом, вещество, вводимое для лечения этого побочного эффекта, может представлять собой вещество, которое нейтрализует один или более из этих растворимых факторов. К таким веществам относится, помимо прочего, стероид, ингибитор TNF $\alpha$  и ингибитор IL-6. Примером ингибитора TNF $\alpha$  является энтанерсепт. Примером ингибитора

IL-6 является тоцилизумаб (toe).

**[0337]** В одном варианте осуществления субъекту могут вводить вещество, которое повышает активность модифицированной Т-клетки. Например, в одном варианте осуществления вещество может быть таким, которое ингибирует ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, *например*, белок запрограммированной гибели клеток 1 (PD1), могут в некоторых вариантах осуществления снижать способность модифицированной Т-клетки устанавливать иммунный эффекторный ответ. К примерам ингибирующих молекул относятся PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR-бета. Ингибирование ингибирующей молекулы, *например*, путем ингибирования ДНК, РНК или уровня белка, может оптимизировать эффективность модифицированной Т-клетки. В вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота, *например*, ингибирующая нуклеиновая кислота, *например*, дцРНК, *например*, миРНК или мшРНК, может использоваться для ингибирования экспрессии ингибирующей молекулы в TFP-экспрессирующей клетке. В одном варианте осуществления ингибитор представляет собой мшРНК. В одном варианте осуществления ингибирующая молекула ингибируется внутри модифицированной Т-клетки. В этих вариантах осуществления молекула дцРНК, которая ингибирует экспрессию ингибирующей молекулы, соединена с нуклеиновой кислотой, которая кодирует компонент, *например*, все компоненты, TFP. В одном варианте осуществления ингибитор ингибирующего сигнала может представлять собой, *например*, антитело или фрагмент антитела, который связывается с ингибирующей молекулой. Например, вещество может представлять собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с PD1, PD-L1, PD-L2 или CTLA4 (*например*, ипилимумаб (также называемый MDX-010 и MDX-101 и представленный на рынке как Yervoy<sup>®</sup>; Bristol-Myers Squibb; тремелиумаб (моноклональное антитело IgG2, доступное от компании Pfizer, ранее известное как тицилимумаб, CP-675,206)). В одном варианте осуществления вещество представляет собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с TIM3. В одном варианте осуществления вещество представляет собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с LAG3.

**[0338]** В некоторых вариантах осуществления вещество, которое повышает активность модифицированной Т-клетки, может представлять собой, например, слитый белок, содержащий первый домен и второй домен, причем первый домен представляет собой ингибирующую молекулу или ее фрагмент, а второй домен представляет собой полипептид, который связан с положительным сигналом, *например*, полипептид, содержащий внутриклеточный сигнальный домен, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид, который связан с положительным сигналом, может

включать в себя костимулирующий домен CD28, CD27, ICOS, *например*, внутриклеточный сигнальный домен CD28, CD27 и/или ICOS и/или домен первичной сигнализации, *например*, CD3 дзета, *например*, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления слитый белок экспрессируется той же клеткой, которая экспрессирует TFP. В другом варианте осуществления слитый белок экспрессируется клеткой, *например*, Т-клеткой, которая не экспрессирует TFP против CD19.

## **ПРИМЕРЫ**

**[0339]** Далее будет подробно описано изобретение со ссылкой на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры предоставлены только в целях иллюстрации, и их не следует интерпретировать как ограничивающие, если не указано иное. Таким образом, изобретение не должно восприниматься как такое, которое ограничивается следующими примерами, оно должно восприниматься скорее как такое, которое охватывает любые и все варианты, которые станут очевидными в результате идей, представленных в настоящем документе. Без дополнительного описания, полагают, что с использованием предшествующего описания и следующих ниже иллюстративных примеров специалист в данной области техники может получать и использовать соединения по настоящему изобретению и осуществлять на практике заявленные способы. Следующие демонстрационные примеры конкретно указывают различные аспекты данного изобретения, и их не следует интерпретировать как ограничивающие каким-либо образом остальную часть описания.

### *Предпосылки для примеров 1-5*

**[0340]** Т-клеточные рецепторы (TCR) распознают чужеродные антигены, которые были обработаны как небольшие пептиды и связаны с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АРС). Комплекс Т-клеточного рецептора (TCR) состоит из группы димеров, включая: альфа- и бета-субъединицы (TCR $\alpha/\beta$ ) или гамма- и дельта-субъединицы (TCR $\gamma\delta$ ) Т-клеточного рецептора; и димеры CD3 CD3 $\gamma/\epsilon$ , CD3 $\delta/\epsilon$  и CD3 $\zeta/\zeta$ . Гены константного сегмента альфа цепи Т-клеточного рецептора (TRAC) и константного сегмента бета цепи Т-клеточного рецептора (TRBC) кодируют С-конец константной области TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , соответственно.

**[0341]** Нарушение константной области(ей) TCR блокирует перемещение TCR $\alpha$  или TCR $\beta$  на поверхность клетки, тем самым ингибируя сборку рецепторного комплекса TCR. Нарушения перемещения TCR $\alpha$  или TCR $\beta$  достаточно, чтобы ингибировать сборку всего рецептора TCR. Следовательно, инактивация комплекса TCR может быть осуществлена путем нацеливания на гены TRAC или TRBC с помощью методики редактирования генов с

использованием метода коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), эффекторных нуклеаз, подобных активатору транскрипции (TALEN), нуклеаз «цинковый палец» или мегануклеаз. Однако TFP-T-клетки, основанные на слитых белках CD3 $\epsilon$ , CD3 $\gamma$  или CD3 $\delta$ , требуют поверхностной экспрессии TCR  $\alpha/\beta$  для включения в функциональный комплекс TCR.

**[0342]** Активация комплекса TCR на поверхности донорных T-клеток антигенами-реципиентами (т.е. распознавание антигенов, представленных основным комплексом гистосовместимости (МНС) на антиген-презентирующих клетках) может вызвать нежелательные эффекты, такие как реакция «трансплантат против хозяина» (GvHD) и синдром высвобождения цитокинов (CRS). Таким образом, следующие примеры описывают способы введения трансгена в клетки с нокаутом TCR, кодирующие усеченную версию TCR $\alpha$  или TCR $\beta$ , и сам слитый белок, разделенный сигналом саморасщепления (например, T2A). В одном варианте осуществления усеченная версия TCR $\alpha$  или TCR $\beta$  включает трансмембранный домен и связывающий пептидный домен (CP) TCR $\alpha$  или TCR $\beta$ . В другом варианте осуществления антигенсвязывающий домен TFP слит с N-концом усеченного или полноразмерного TCR $\alpha$  и/или TCR $\beta$ .

#### **Пример 1. Создание crPHK (CRISPR PHK)**

**[0343]** crPHK для инактивации TRA были разработаны с использованием алгоритма «Dunne 2017», доступного на веб-сайте библиотеки DeskGen™ CRISPR ([www.deskgen.com](http://www.deskgen.com)). Любые crPHK, связывающие локус TRA, способны эффективно генерировать двухцепочечные разрывы в гене TRA. Чтобы свести к минимуму нецелевую активность эндонуклеазы CRISPR, используемые crRNA имеют оценку нецелевого связывания > 90%, содержащую по меньшей мере 3 несовпадения с ближайшей гомологичной последовательностью в версии генома человека 38 Консорциума референсного генома (GRCh38/hg38). В предпочтительном варианте осуществления одно несовпадение расположено на 8 п.н. выше мотива, примыкающего к протоспейсеру (PAM). В таблицах 1-2 показаны иллюстративные последовательности crPHK, выбранные для инактивации гена TRA (таблица 1) и прогнозируемая нецелевая активность (таблица 2).

**Таблица 1:** crPHK, выбранные для инактивации гена TRA:

ID	crPHK	PAM	Мишень	Геномное расположение	Оценка нецелевого связывания (%)

TRAC1-4894	TCTCTCAGCTGGTACA CGGC	AGG	TRAC1	chr14: 22547526 - 22547545	94
TRAC2-4598	CTCGACCAGCTTGACA TCAC	AGG	TRAC 2	chr14: 22549647 -22549666	98
TRAC3-2998	GATTAAACCCGGCCAC TTTC	AGG	TRAC 3	chr14: 22550612 - 22550631	98

**Таблица 2:** Прогнозируемые нецелевые сайты; несовпадения между целевыми и нецелевыми выделены жирным шрифтом

сrPHK	Нецелевые	PAM	Несовпаден	Экзон	Геномное расположение
TRAC1 4894	<b>TCCCTCAGCTGGTACAAGGA</b>	TGG	3,17,2 0	Да	chr1: 186070730 - 186070753
	TCTGTCAACTGGTACATGGC	AAG	4,8,17	Нет	chrX: 83244396 - 83244419
	TTCATAGCTGGTACATGGC	GGG	5,6,17	Нет	chr15: 100865579 - 100865602
	<b>TTTCTCAGCTGGTACATGGA</b>	GGG	2,17,2 0	Нет	chr1: 247923608 - 247923631
	<b>GCACTCAGCTGGTACCCGGC</b>	AAG	1,3,16	Нет	chr!6: 8713603 - 8713626
	<b>TCACTCAGCTGGTACATGGG</b>	CAG	3,17,20	Нет	chr4: 130310607 - 130310630

	<b>TCTCCCAGCTGGGACACGGT</b>	GAG	5,13,20	Нет	chr1: 55167399 - 55167422
	TCAATCAGCTGGTGCACGGC	TGG	3,4,14	Нет	chr1: 236924538 - 236924561
	TCTCACAGCTGATATACGGC	TGG	5,12,15	Нет	chr12: 49641344 - 49641367
TRAC2 4598	<b>CTCCACCACCTTGACCTCAC</b>	CGG	4,9,16	Да	chr10: 102422239 - 102422262
	<b>CTCAACCAGAATGACATCAC</b>	CAG	4,10,11	Нет	chr2: 55715822 - 55715845
	<b>CTAGACCAGCTTGACCTCCC</b>	CAG	3,16,19	Нет	chr4: 89585943 - 8 9 5 8 5 9 6 6
	<b>CTAGACCAGCTTGGCAACAC</b>	AGG	3,14,17	Нет	Chr5: 82123725 - 82123748

TRAC3 - 2998	GAATAAAACCGGCCACTTTG	GGG	3,8,20	Нет	chr5: 128101267 - 128101290
	GATTATACCTGGCCACATTC	AAG	6, 10, 17	Нет	chr2: 14 5719958 - 145719981

**[0344]** crПНК для инактивации TRB были разработаны с использованием алгоритма Dunne 2017, как описано выше. Поскольку константная область TCR $\beta$  кодируется двумя генами, TRBC1 и TRBC2, crПНК направлены против последовательностей, идентичных как TRBC1, так и TRBC2. Следовательно, оценка нецелевого связывания, полученная по DeskGen™, составляет ниже 94%. Однако, помимо нацеливания на TRBC1 и TRBC2, другие гомологичные последовательности между crПНК и геномом GRCh38/hg38 несут по крайней мере 3 несовпадения. В предпочтительном варианте осуществления одно из этих несовпадений расположено на 8 п.н. выше мотива, примыкающего к протоспейсеру (PAM). В таблицах 3-4 показаны иллюстративные последовательности crПНК, выбранные для инактивации гена TRB (таблица 3) и прогнозируемая нецелевая активность (таблица 4).

**Таблица 3:** crПНК, выбранные для инактивации гена TRB

ID	crПНК	PAM	Мишень	Место нахождения	Оценка нецелевого связывания
TRBC-44345	ACACTGGTGTGCCTGGCCAC	AGG	TRBC1	chr7: 142801121 - 142801140	45
			TRBC2	chr7_KI270803v1_alt: 814747 - 814766	
TRBC-45447a	AGGGCGGGCTGCTCCTTGAG	GGG	TRBC1	chr7: 142791879 - 142791898	47
			TRBC2	chr7: 142801226 - 142801245	
TRBC-45246	CTGCCTGAGCAGCCGCCTGA	GGG	TRBC1	chr7: 142791914 - 142791933	46
			TRBC2	chr7: 142801261 - 142801280	
TRBC-45447b	GCGGGGTTCTGCCAGAAGG	TGG	TRBC1	chr7: 142791946 - 142791965	47
			TRBC2	chr7: 142801293 - 142801312	

**Таблица 4:** Прогнозируемые нецелевые сайты; несовпадения между целевыми и нецелевыми выделены жирным шрифтом

crPHK	Нецелевые	PAM	Несовпа- дения	Экзон	Локус
TRBC-44345	<u>ACTCTGGGCTGCCTGGCCAC</u>	GGG	3,8,9	Да	chr14: 105601630- 105601653
	<u>ACTCTGTTGTGCCTGGACAC</u>	CGG	3,7,17	Да	chr20: 62963310- 62963333
	<u>TCACAGGTGAGCCTGGCCAC</u>	AGG	1,5,10	Нет	chr14:98950719- 98950742
	<u>GCACGGGTGGGCCTGGCCAC</u>	TGG	1,5,10	Нет	chr12: 108839394- 108839417
	<u>GCAGGGGTGTGCCTGGCCAC</u>	TGG	1,4,5	Нет	chr16: 3010877- 3010900
	<u>ATCCTGCTGTGCCTGGCCAC</u>	AGG	2,3,7	Нет	chr6: 37655368- 37655391
	<u>TCTCTGGTGTGCCTGGCCAA</u>	GAG	1,3,20	Нет	chrX: 138046658- 138046681
	<u>ACACATGTGGGCCTGGCCAC</u>	GGG	5,6,10	Нет	chr16: 2438272- 2438295
	<u>AGCCTGGTGTGTCTGGCCAC</u>	TGG	2,3,12	Нет	chr2: 162055950- 162055973

	<u>CCTCTGGTGTGCCTGGCCCC</u>	AGG	1,3,19	Нет	chr2: 239228091- 239228114
	<u>CCACTTGTGTGCATGGCCAC</u>	TAG	1,6,13	Нет	chr1: 101657244- 101657267
	<u>ATAATGGTGTGCCTGGCAAC</u>	TAG	2,4,18	Нет	chr1: 230924183- 230924206
	<u>ACACTGGCCTGCCTGGGCAC</u>	TAG	8,9,17	Нет	chr1: 155926881- 155926904
TRBC-45447a	<u>AGCGCGGGCTCCTCCTTGAC</u>	GGG	3,11,20	Да	chr8:143598506- 143598529
	<u>AGGGCCTGCTGCTCCTCAG</u>	CAG	6,7,18	Да	chr3: 45030894 - 45030917

	<b>AGGGCTGACAGCTCCTTGAG</b>	TGG	6,8,10	Het	chr20: 683139 - 683162
	<b>GGGGTGGGCTGCTCCTGGAG</b>	CAG	1,5,17	Het	chr20: 63440195- 63440218
	<b>AGAGCGGCCTGCTCCTCGAG</b>	GGG	3,8,17	Het	chr17: 50124057- 50124080
	<b>GGGGTGGGCTGCACCTTGAG</b>	GGG	1,5,13	Het	chr12: 3189255- 3189278
	<b>AAGGCAGGCTCCTCCTTGAG</b>	AGG	2,6,11	Het	chr5:176733401- 176733424
	<b>AGGAAGGGCTGCTCTTTGAG</b>	GAG	4,5,15	Het	chr10: 100783415- 100783438
	<b>AGGCTGGGCTGCTCTTTGAG</b>	CAG	4,5,15	Het	chr1:226617392- 226617415
	<b>AGTGCCGGCTGCTCCTGGAG</b>	TGG	3,6,17	Het	chr15:74624787- 74624810
	<b>AGGGTGGGGTGGCTCCTCGAG</b>	GGG	5,9,17	Het	chr7: 99165433- 99165456
	<b>TGGGCTGGCTGCACCTTGAG</b>	TAG	1,6,13	Het	chr12: 92396203- 92396226
	<b>TGGGCGGGCTGTTCCCTGGG</b>	GAG	1,12,19	Het	chr5: 179287136- 179287159
TRBC-45246	<b>CTTCCTGAGCAGCCGTCTGC</b>	AGG	3,16,20	Да	chr5:177525051- 177525074
	<b>CTGCCTGAGCAGCTGCCACA</b>	AGG	14,18,19	Да	chr21: 42085445- 42085468
	<b>CAGCGTTAGCAGCCGCCTGA</b>	GGG	2,5,7	Het	chr6: 24719514 - 24719537
	<b>CACCCAGAGCAGCCGCCTGA</b>	CAG	2,3,6	Het	chr8: 58226030- 58226053
	<b>CTGCCTGGGAAGCCGCCTGC</b>	CAG	8,10,20	Het	chr1: 41873106- 41873129
	<b>CTGCCTCCTCAGCCGCCTGA</b>	GGG	7,8,9	Het	chr15: 89663036- 89663059
	<b>CTGTCTGACCAGCCGCCTGC</b>	CGG	4,9,20	Het	chr1: 9401937- 9401960



	CAGCCTGAGCTGCCGCCTGC	GGG	2,11,20	Het	chr17: 36923765-36923788
	CAACCTGAGCAGCCTCCTGA	GAG	2,3,15	Het	chr8: 127075998-127076021
	CTCCCTGATCAGCCGCATGA	GGG	3,9,17	Het	chr20: 63598726-63598749
	CGGCCGGAGCAGCCGCCTCA	GGG	2,6,19	Het	chr1: 204685196-204685219
	CTGCCTCAACATCCGCCTGA	AAG	7,9,12	Het	chrX: 58268037-58268060
TRBC-44547b	GTTGGGATTCTGCCAGAAGG	CAG	2,3,7	Het	chr17: 52505137-52505160
	GAGGGGGGCCTGCCAGAAGG	AGG	2,8,9	Het	chr8: 1547518-1547541
	GCGGAAGATCTGCCAGAAGG	GGG	5,6,8	Het	chr16:1946717-1946740
	GGTGGGGTTCTGCCAGGAGG	AGG	2,3,17	Het	chr9: 135224974-135224997
	GCGGGGGATGTGC CAGGAGG	AGG	8,10,17	Het	chr11: 62414927-62414950
	GAGGGGATTCTGCCAGCAGG	CGG	2,7,17	Het	chr5:133192714-133192737
	GAGGGGGTCCTGCCAGCAGG	GиG	2,9,17	Het	chr6:13415078-13415101
	GAGGGTGTTCTGCCAGCAGG	CAG	2,6,17	Het	chr8: 23039425-23039448
	GCAGGGGTTCAGCCAGGAGG	CAG	3,11,17	Het	chr11: 60938213-60938236
	GAGGGGGTTCAGACAGAAGG	CAG	2,11,13	Het	chr18:13654430-13654453
	GCAGGGGTTCTCCCAGTAGG	CAG	3,12,17	Het	chr3:18516713-18516736
GTGGGGGTTCTGCCAGCAGC	TGG	2,17,20	Het	chr17: 68030673-68030696	

**Пример 2: Редактирование эндогенного TCR $\alpha$  или  $\rho$  в клетках Jurkat**

[0345] Инактивацию генов TRA или TRB в клетках Jurkat проводили путем электропорации

рибонуклеопротеидов (RNP) SpCas9, направленных против генов TRA или TRB. Клетки поддерживали в концентрации  $0,2 \times 10^6$  клеток на мл в среде RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 300 мг/л L-глутамина до электропорации. Рибонуклеопротеины SpCas9, нацеленные на гены TRA или TRB, получали путем отжига crPНК, нацеленной на TRAC (TRAC2-4598) или TRBC (TRBC-44345), с tracrPНК в молекулярном соотношении 1:1. Отожженные дуплексы смешивали с белком SpCas9 в молекулярном соотношении 1,5:1.  $0,61 \mu\text{M}$  RNP смешивали с Т-клетками в количестве  $2,5 \times 10^6$  и подвергали электропорации в соответствии с протоколом производителя для системы трансфекции Neon (ThermoFisher). Электропорацию проводили при 1600 В, 10 мс, 3 импульса. После импульса клетки немедленно переносили в теплую среду и инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  в течение трех дней.

**[0346]** Эффективность редактирования оценивали, наблюдая потерю поверхностной экспрессии TCR $\alpha\beta$  и CD3 $\epsilon$  с помощью проточной цитометрии. Результаты показаны на **ФИГ. 2** для клеток, отредактированных по TRA (левый график), и клеток, отредактированных по TRB (правый график). Отредактированные клетки Jurkat очищали с помощью системы разделения клеток активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS, Miltenyi Biotec). Отредактированные клетки Jurkat отрицательно отбирали к антителу против TCR $\alpha\beta$  IP27 (eBioscience № 17-9986-42) и к антителу против CD3 $\epsilon$  SK7 (eBioscience № 25-0036-42). Клетки, экспрессирующие на своей поверхности TCR $\alpha\beta$  или CD3 $\epsilon$ , иммобилизовали на колонках MACS MS (кат. № 130-041-301) или LS (кат. № 130-041-306), в то время как отредактированные клетки Jurkat, отрицательные как по TCR $\alpha\beta$ , так и по CD3 $\epsilon$ , собирали в проточной части колонки и поддерживали в культуре в концентрации  $0,4 \times 10^6$  клеток/мл в среде, указанной выше.

### **Пример 3. Редактирование человеческих Т-клеток**

**[0347]** Затем гены TRA или TRB инактивируют в первичных Т-клетках от человека-донора. За два-четыре дня до электропорации Т-клетки активировали гранулами активатора человеческих Т-клеток Dynabeads®, специфическими к CD3/CD28 (Gibco № 11132D) в соотношении 1:1 в среде CTS Optimizer (Gibco № A1022101) с добавлением 10% сыворотки человека (hAB, Valley Biomedical HP 1022) и IL2 в количестве 300 Ед/мл (Petrotech № 200-02). Рибонуклеопротеины SpCas9 (RNP), нацеленные на гены TRA или TRB, получали путем отжига crPНК, нацеленной на TRAC (TRAC2-4598) или TRBC (TRBC-44345), с tracrPНК в молекулярном соотношении 1:1. Отожженные дуплексы смешивали с белком SpCas9 в молекулярном соотношении 1,5:1.  $0,61 \mu\text{M}$  RNP смешивали с Т-клетками в количестве  $2,5 \times 10^6$  и подвергали электропорации в соответствии с протоколом производителя для системы трансфекции Neon, электропорация проводили при 1600 В, 10

мс, 3 импульса. Клетки немедленно переносили в теплую среду (CTS Optimizer (Gibco № A1048501) с 10% hAB (Valley Biomedical № HP1022), 300 мкл/мл IL2 (Petrotech № 200-02), 25 нг/мл IL7 (R & D System № 207-IL-010) и инкубировали при 37 °С, чтобы обеспечить размножение отредактированных Т-клеток с приблизительным временем удвоения от 3 до 5 дней. Эффективность редактирования оценивали, измеряя уменьшение поверхностной экспрессии TCR $\alpha\beta$  и CD3 $\epsilon$  с помощью проточной цитометрии. Отредактированные Т-клетки были очищены с использованием активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS®, Miltenyi Biotec) в соответствии с инструкциями производителя, системы разделения клеток и были отрицательно отобраны к антителу против TCR $\alpha\beta$  IP27 (eBioscience № 14-9986-82) и к антителу против CD3 $\epsilon$  SK7 (eBioscience № 16-0036-81). Клетки, экспрессирующие на своей поверхности TCR $\alpha\beta$  или CD3 $\epsilon$ , иммобилизовали на колонках MACS MS (кат. № 130-041-301) или LS (кат. № 130-041-306), в то время как отредактированные Т-клетки, отрицательные как по TCR $\alpha\beta$ , так и по CD3 $\epsilon$ , собирали в проточной части колонки и поддерживали в культуре в концентрации 10<sup>6</sup> клеток/мл в среде, указанной выше. Результаты показаны на **ФИГ. 3**.

#### **Пример 4: Аллогенность TCR-отрицательных Т-клеток**

**[0348]** Клетки, нокаутированные (КО) по TCR $\alpha\beta$ , оценивали на аллогенность с помощью реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR). Маркирующий краситель на основе сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE) был включен в нокаутированные по TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  Т-клетки, и впоследствии клетки совместно культивировали в соотношении 1:1 с РВМС (Streck, Inc.) с задержкой в пролиферации либо из совпадающих (ауто-реакция), либо из несовпадающих (алло-реакция) по HLA доноров (доноры 1 и 2 соответственно). Форболмиристат ацетат (PMA) в дозе 5 нг/мл и иономицин в дозе 500 нг/мл использовали в качестве положительного контроля для независимой стимуляции TCR. Также использовали связанные с планшетом анти-CD3 в качестве непрямого контроля для подтверждения отсутствия рецептора TCR в нокаутированных по TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  Т-клетках. За пролиферацией донорских Т-клеток следили по истощению CFSE; базальные уровни пролиферации измеряли после 24-часовой инкубации без стимуляции, и после пятидневного инкубационного периода снова измеряли уровни. Краситель CFSE разбавляли наполовину при делении клеток, и, таким образом, степень пролиферации, которая произошла в Т-клетках, оценивалась и сравнивалась с контролями совпадающих и несовпадающих по HLA доноров. Результаты показаны на **ФИГ. 4**.

**[0349]** Поверхностную экспрессию TCR $\alpha$  и CD3 $\epsilon$  анализировали, как описано в примере 2 для Т-клеток Jurkat (**ФИГ. 9А-С**) и донорных Т-клеток (**ФИГ. 10А-В**). На **ФИГ. 9А-С** показана поверхностная экспрессия CD3 по сравнению с TCR $\alpha\beta$  в клетках дикого типа

(ФИГ. 9А), в клетках КО по TRB без трансдукции (ФИГ. 9В), в клетках КО по TRB с трансдукцией полноразмерными (FL) TFP TCR $\beta$  (ФИГ. 9С). Границы на графиках были нарисованы для разграничения CD3-отрицательной и TCR $\alpha\beta$ -отрицательной популяций клеток, а процент клеток, остающихся в каждом квадранте, показан в углах.

**[0350]** На ФИГ. 10А-В показана поверхностная экспрессия CD3 по сравнению с TCR $\alpha\beta$  в клетках с нокаутом по TRB, трансдуцированных усеченным геном TRBC человека (ФИГ. 10А) и мышинным геном TRAC-T2A-TRBC (ФИГ. 10В). Границы на графиках были нарисованы для разграничения CD3-отрицательной и TCR $\alpha\beta$ -отрицательной популяций клеток, а процент клеток, остающихся в каждом квадранте, показан в углах.

**Пример 5: Экспрессия слитого белка Т-клеточного рецептора в TCR-отрицательных клетках**

**[0351]** Инактивация TRA или TRB блокирует перемещение на клеточную поверхность всех субъединиц TCR. Следовательно, экзогенный трансген TRA или TRB экспрессируется в клетках TRA<sup>-/-</sup> или TRB<sup>-/-</sup>, соответственно, чтобы получить функциональную TFP-T-клетку.

*Трансдукция клеток Jurkat*

**[0352]** TFP-трансгены вводили в клетки Jurkat с использованием лентивирусов, как описано, например, в совместно рассматриваемой публикации патентной заявки США № 2017-0166622. Клетки Jurkat инкубировали с вирусом при множественном инфицировании (MOI), равным пяти. Среду заменяли через двадцать четыре часа после инкубации. Эффективность трансдукции и экспрессию TFP оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием лиганда, специфического для связующего агента TFP, представляющего интерес, и/или поверхностной экспрессии TCR $\alpha\beta$  и CD3 $\epsilon$ .

*Трансдукция Т-клеток*

**[0353]** TFP-трансгены вводили в клетки Jurkat с использованием лентивирусов, как описано, например, в совместно рассматриваемой публикации патентной заявки США № 2017-0166622. Т-клетки центрифугировали вместе с вирусами при множественном инфицировании (MOI), равным пяти, с 5 пг/мл полибрена в течение 100 минут при 600 g. Среду заменяли через двадцать четыре часа после центрифугирования. Эффективность трансдукции и экспрессию TFP оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием лиганда, специфического для связующего агента TFP, представляющего интерес, и/или поверхностной экспрессии TCR $\alpha\beta$  и CD3 $\epsilon$ .

*Экспрессия человеческого TCR $\alpha\beta$  TFP*

**[0354]** Поскольку TCR $\alpha$ -отрицательные клетки все еще экспрессируют TCR $\beta$  и, наоборот, TCR $\alpha$  экспрессируется в TCR $\beta$ -отрицательных клетках; следовательно, TFP TCR $\alpha$  экспрессировались в клетках TRA<sup>-/-</sup> и TFP TCR $\beta$  экспрессировались в клетках TRB<sup>-/-</sup>.

Множественный формат TFP TCR $\alpha/\beta$  и TCR $\alpha/\beta$  тестировали на TCR-отрицательных клетках для определения оптимальной конструкции для восстановления транслокации всего комплекса TCR (**ФИГ. 5**). Полноразмерные (FL) TFP TCR $\alpha/\beta$  были созданы путем сборки любого из переменных экзонов (V) с любым из соединительных экзонов (J), за которым следовали все константные экзоны из локусов TCR. В одном варианте осуществления экзон разнообразия D может быть помещен между V и J. Возможно, мутация или вставка могут быть добавлены на стыке каждого экзона для имитации активности ферментов гена активации рекомбинации (RAG). Остатки TRAV пронумерованы в соответствии с международной информационной системой ImMunoGeneTics (IMGT, [imgt.org](http://imgt.org)).

*TFP TCR $\alpha$ (X<sub>(FL)</sub>) FMC63 экспрессируется в TRA<sup>-/-</sup> клетках*

Nt-FMC63-TRA(V13-I<sub>(1-256)</sub>; J13; C)-Ct

Nt-FMC63-TRA(V8-1; J20; C)-Ct

Nt-FMC63-TRA(V29DV5; J44; C)-Ct

*Усеченный TFP TCR $\alpha$  экспрессировал в TRA<sup>-/-</sup> клетках,*

Nt-FMC63-TRA(V13-I<sub>(33-256)</sub>; J13; C)-Ct

Nt-FMC63-TRA(V13-I<sub>(105.256)</sub>; J13; C)-Ct

**[0355]** Усеченный TCR $\alpha$  экспрессируется в клетках TRA<sup>-/-</sup>, остатки TRAC пронумерованы в соответствии с международной информационной системой ImMunoGeneTics. (IMGT, [www.imgt.org](http://www.imgt.org)).

Nt-TRAC<sub>7-174</sub>-Ct

Nt-TRAC<sub>128-174</sub>-Ct

*TFP TCR $\beta$ P(FL) FMC63 экспрессируется в TRB<sup>-/-</sup> клетках*

Nt-FMC63-TRB(V9; J1-1; C1)-Ct

Nt-FMC63-TRB(V7-9; J1-5; C1)-Ct

Nt-FMC63-TRB(V5-1; J2-2; C1)-Ct

**[0356]** Усеченный TFP TCR $\beta$  экспрессируется в клетках TRB<sup>-/-</sup>, остатки TRBC пронумерованы в соответствии с международной информационной системой IMGT, как указано выше.

Nt-FMC63-TRBC 1 (-8)-173-Ct

Nt-FMC63-TRBC1<sub>22-174</sub>-Ct

Nt-FMC63-TRBC1<sub>127-174</sub>-Ct

*Экспрессия усеченного TFP TCR $\alpha/\beta$  человека*

**[0357]** Сверхэкспрессия константных доменов как TCR $\alpha$ , так и TCR $\beta$  может быть достаточной для управления перемещением всего комплекса TCR на поверхность клетки.

Чтобы проверить это, был разработан трансген TRP, который кодирует константные домены TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , разделенные саморасщепляющимся пептидом 2A. В одном варианте осуществления связующий агент TFP слит с N-концом TRAC и/или TRBC. В другом варианте осуществления TFP слит с молекулой CD3 и экспрессируется независимо от трансгена TR[A/B]C.

*Экспрессия усеченного мышинового TFP TCR $\alpha/\beta$*

**[0358]** Константные области человеческого TCR взаимозаменяемы с их мышинными гомологами. Кроме того, константные области мышинового TCR повышают стабильность комплекса CD3 $\zeta$ /TCR при экспрессии в клетках человека. Следовательно, был сконструирован трансген TFP, который кодирует константные домены мышинных TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , разделенные саморасщепляющимся пептидом 2A. В одном варианте осуществления связующий агент TFP слит с N-концом mTRAC и/или mTRBC. В другом варианте осуществления связующий агент TFP переносится молекулами CD3 и экспрессируется независимо от трансгена mTR[A/B]C.

Трансгены mTR[A/B]C экспрессируются в клетках TRA<sup>-/-</sup> или TRB<sup>-/-</sup>

Nt-FMC65-Mtrac<sub>114-169</sub>-T2A-mTRBC<sub>123-173</sub>-Ct

Nt-Mtrac<sub>114-169</sub>-T2 A-mTRBC<sub>123-173</sub>-Ct

*Экспрессия мураинизированного TFP TCR $\alpha/\beta$  человека*

**[0359]** Для увеличения аффинности между константными областями TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  человека была сконструирована серия последовательностей, в которых остатки TCR человека заменены на TCR мыши. Замены были введены в константную область TCR $\alpha$ , включая остатки P90S, E91D, S92V, S93P. Замены, введенные в константную область TCR $\beta$ , представляли собой E1 IK, S15A, F129I, E132A, Q135H. Эти замены сделали TRAC и TRBC достаточными для перемещения всего комплекса TCR на поверхность клетки. Следовательно, TFP экспрессируется через трансген Nt-FMC63-TRAC<sub>(-7)-174</sub> P90S, E91D, S92V, S93P -T2A- TRBC<sub>1(-8)-173</sub> E1 IK, S15A, F129I, E132A, Q135H-Ct в клетках TRA<sup>-/-</sup> или TRB<sup>-/-</sup>.

*Экспрессия усиленного TFP TCR $\alpha$*

**[0360]** Некоторые структуры комплекса TCR $\alpha\beta$  человека доступны в базе данных структур белков (PDB). Эти структуры выделяют остатки, участвующие во взаимодействии TCR $\alpha$ /TCR $\beta$ , и другие остатки TRAC, близкие к TRBC, но не участвующие во взаимодействии TCR $\alpha$ /TCR $\beta$ . Следовательно, можно повысить аффинность TCR $\alpha$  к TCR $\beta$  путем одной или нескольких из следующих замен в TRAC: V22W, F85.5E, T84D, S85.1D, V84.1W,

**[0361]** Экспрессия усиленного TRAC-TFP в клетках TRA<sup>-/-</sup> восстанавливает перемещение

на клеточную поверхность всего TCR. Усиленный TRAC-TFP в клетках ДТ эффективно заменяет эндогенную молекулу TCR $\alpha$  в комплексе TCR. Усиление экспрессии TRAC без связующего агента TFP эффективно восстанавливает перемещение комплекса TCR на поверхность клетки, в этом случае связующий агент TFP сливается с молекулами CD3 и экспрессируется независимо от усиленного трансгена TRAC или на том же трансгене путем размещения саморасщепляющегося пептида 2A между обоими кодирующими последовательностями (CDS).

**[0362]** Точно так же замены в TRBC усиливают взаимодействие между TCR $\alpha$ /TCR $\beta$ . Замены V22W, введенные индивидуально или в комбинации в TRBC, достаточны для восстановления перемещения на клеточную поверхность всего TCR в клетках TRB<sup>71</sup>. Экспрессия усиленного TRBC-TFP в клетках TRB<sup>-/-</sup> восстанавливает перемещение на клеточную поверхность всего TCR. Экспрессия усиленного TRBC-TFP в клетках дикого типа эффективно заменяет эндогенную молекулу TCR $\beta$  в комплексе TCR. В этом случае усиленной экспрессии TRBC без связующего агента TFP связующий агент TFP сливается с молекулами CD3 и экспрессируется независимо от усиленного трансгена TRBC или на том же трансгене путем размещения саморасщепляющегося пептида 2A между обоими CDS.

*Экспрессия гибридного TFP IgG/TCR $\alpha$ / $\beta$*

**[0363]** Взаимодействие между TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  усиливается за счет замены варибельного домена TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  константными доменами IgG. Следовательно, константные домены тяжелой цепи IgG CH1 были слиты с N-концом TRBC, тогда как константные домены легкой цепи IgG CL были слиты с N-концом TRAC. Наконец, TFP был добавлен на N-конец CL. В одном варианте осуществления обе конструкции кодируются одним и тем же трансгеном путем размещения между ними саморасщепляющегося пептида 2A, как указано: Nt-FMC63 - IgG<sub>CL(-7)-1125</sub> - TRAC<sub>(-6)-174</sub> - T2A - IgG<sub>CH1(-7)-122</sub> - TRBC(-8)-173. В другом варианте осуществления положение IgG<sub>CL</sub> и IgG<sub>CH1</sub> меняется. В другом варианте осуществления связывающий агент TFP слит с N-концом IgG<sub>CL</sub> или/и IgG<sub>CH1</sub> или слит с молекулами CD3 и экспрессируется независимо. В другом варианте осуществления замены остатков вводят для усиления взаимодействия CH1/CL с IgG<sub>CLF7A</sub>, IgG<sub>CH1A20L</sub>.

*Экспрессия TCR-TFP с заменой домена*

**[0364]** Молекулы TCR $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ / $\delta$  имеют аналогичную структурную организацию. На N-конце области их V(D)J принимают конформацию, подобную иммуноглобулину (IgV), тогда как их области C состоят из домена, подобного иммуноглобулину (IgC), за которым следует связывающий пептид (CP) трансмембранный домен (TM) и короткий внутриклеточный хвост (IC) на C-конце. Несмотря на высокую структурную гомологию между этими молекулами, TCR $\alpha$  спаривается только с TCR $\beta$ , а TCR $\gamma$  спаривается только с TCR $\delta$ .

Следовательно, замена домена(ов) TCR $\alpha$  на домен(ы) TCR $\gamma$  и домен(ов) TCR $\beta$  на домен(ы) TCR $\gamma$  будет генерировать TFP, которые не образуют пары с эндогенными молекулами TCR. Например, Nt-FMC63 - IgC $\alpha$  - CP $\gamma$  - TM $\gamma$  - IC $\gamma$  - 2A - IgC $\beta$  - CP $\delta$  - IC $\delta$  - Ct продуцирует аллогенный рецептор, в котором IgC $\alpha$ CP $\gamma$ TM $\gamma$ IC $\gamma$  специфически взаимодействует с IgCbCPdICd, а не с эндогенным TCR $\beta$  в клетках TRA<sup>-/-</sup> или эндогенным TCR $\alpha$  в клетках TRB<sup>-/-</sup>. В другом варианте осуществления связывающий агент TFP слит с N-концом IgC $\beta$  или/и IgC $\alpha$  или слит с молекулами CD3 и экспрессируется независимо. Различные комбинации переставленных доменов могут использоваться с раскрытыми в данном документе способами. *Включение (KI) саморасщепляющегося пептида 2A в локусе TCR*

**[0365]** Введение сигнала саморасщепления перед доменом CP в рамке с генами TRAC или TRBC генерирует эндогенную усеченную версию TCR $\alpha$  или TCR $\beta$ . Таким образом, последовательность, расположенная ниже сигнала расщепления, содержащая домены CP и TM, перемещается на поверхность клетки; и напротив, часть перед сигналом расщепления, содержащая области, определяющие комплементарность (CDR), не перемещается на поверхность клетки. В одном варианте осуществления сигнал саморасщепления вставляется в рамку в генах TRAC или TRBC посредством гомологически направленной репарации (HDR) или репарации одноцепочечной матрицы (ssTR). HDR индуцируется одноцепочечным разрывом ДНК (SSB) или двухцепочечным разрывом ДНК (DSB), тогда как ssTR индуцируется только SSB. В одном варианте осуществления специальная эндонуклеаза используется для генерации DSB выше области CP или никаза для генерации SSB в той же области TRAC или TRBC. Гомологичная донорная ДНК, содержащая сигнал самоотщепления, должна иметь гомологию по крайней мере 40 пар оснований (п.н.) с эндогенной мишенью и может быть одноцепочечной или двухцепочечной, линейной или кольцевой. Кроме того, гомологичная донорная ДНК включает множественные замены оснований, которые не должны расщепляться специальной эндонуклеазой или никазой. В одном варианте осуществления трансген CD3-TFP вставляют в клетки до или после редактирования гена. В другом варианте осуществления гомологичная донорная ДНК кодирует последовательность TFP ниже пептида самоотщепления в рамке с TRAC или TRBC. Следовательно, слитая молекула TFP-TCR находится под контролем эндогенного рецептора TCR без риска множественных случайных вставок экзогенного промотора по всему геному. Схема показана на **ФИГ. 6**.

**Пример 6: Цитотоксичность TCR-отрицательных Т-клеток человека, экспрессирующих TFP**

**[0366]** Анализ цитотоксичности на основе люциферазы (анализ «Luc-Cyto») оценивает цитотоксичность TFP-Т-клеток путем косвенного измерения ферментной активности



люциферазы в остаточных живых клетках-мишенях после совместного культивирования.

*Получение опухолевых клеток, экспрессирующих люциферазу светлячка (Luc)*

**[0367]** Клетками-мишенями, используемыми в анализе Luc-Cyto, были Nalm6-Luc (положительный по CD 19) и K562-Luc (отрицательный по CD19, полученный путем стабильной трансдукции клеток Nalm6 (DSMZ кат. № ACC 128) и K562 ((ATCC® кат. &CCL-243™)) для экспрессии люциферазы светлячка. ДНК, кодирующую люциферазу светлячка, синтезировали с помощью Gene Art® (ThermoFisher) и вставляли во множество участков клонирования лентивирусного вектора с одним промотором pCDH527A-1 (System Biosciences). Лентивирус был упакован согласно инструкции производителя. Затем опухолевые клетки трансдуцировали лентивирусом в течение 24 часов и затем отбирали с помощью пуромицина (5 пг/мл). Успешное получение клеток Nalm6-Luc и K562-Luc подтверждали путем измерения ферментной активности люциферазы в клетках с помощью системы для анализа люциферазы Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega).

*Фенотипическая характеристика алло-TFP T-клеток*

**[0368]** Аллогенные TFP T-клетки исследовали на предмет их экспрессии человеческого TCR $\alpha\beta$  (с античеловеческим TCR, Miltenyi Bio, клон BW242/412), мышиноного TCR $\alpha\beta$  (с антимышиным TCR $\beta$ , BioLegend, клон H57-597), человеческих CD3 $\epsilon$  (с античеловеческим CD3 $\epsilon$  BioLegend, клон UCHT1), человеческих CD4 (с античеловеческим CD4, BioLegend, клон RPA-T4), человеческих CD8 (с анти-человеческим CD8, BioLegend, клон SK-1) и TFP (с обнаружением связывающего CD 19 FMC63 биотинилированным CD19 (кат. № CD9-H8259, AcroBio). T-клетки дикого типа (без редактирования) от одного и того же донора исследовали с тем же графиком в качестве сравнения.

**[0369]** Результаты показаны на **ФИГ. 7**. T-клетки дикого типа демонстрируют поверхностную экспрессию TCR $\alpha\beta$  и CD3 $\epsilon$  человека, но не TCR $\beta$  мыши. Напротив, аллогенные TFP-клетки не показали поверхностной экспрессии человеческого TCR $\alpha\beta$ , что указывает на успешное редактирование. Поверхностная экспрессия мышиноного TCR $\beta$  на аллогенных TFP-T-клетках согласуется с обнаружением CD3 $\epsilon$  человека на поверхности, что свидетельствует об успешной повторной сборке полного комплекса TCR. Экспрессия CD4 и CD8 человека существенно не различается между T-клетками дикого типа и TFP. Обнаружение поверхностного агента, связывающего CD19, (FMC63, SEQ ID N0:X) наблюдается только для аллогенных TFP-клеток. *Анализ Luc-Cyto для оценки цитотоксичности T-клеток*

**[0370]** Анализ Luc-Cyto проводили путем смешивания T-клеток с опухолевыми клетками в различных соотношениях эффекторных клеток (T-клеток) и клеток-мишеней (опухолевых клеток) (E к T). Клетки-мишени (Nalm6-Luc или K562-Luc) высевали по 10000 клеток на

лунку в 96-луночные планшеты со средой RPMI-1640 с добавлением 10% инактивированного нагреванием (HI) FBS. Аллогенные TFP Т-клетки добавляли к опухолевым клеткам в количестве 30000, 10000 или 3333 клетки на лунку для достижения соотношений Е к Т на уровне 3 к 1, 1 к 1 или 1 к 3. Смеси клеток инкубировали в течение 24 часов при 37 °С с 5 % CO<sub>2</sub>. Ферментативную активность люциферазы измеряли с использованием системы анализа люциферазы Bright-Glo™ (Promega), которая измеряет активность остаточных живых клеток-мишеней в совместной культуре Т-клеток и опухолевых клеток.

[0371] Результаты показаны на **ФИГ. 8**. Аллогенные TFP-клетки, Алло-CD3ε-TFP и Алло-mTCRαβ-TFP Т-клетки показали устойчивый и специфический лизис CD19-положительных опухолевых клеток Nalm6-Luc, но не CD19-отрицательных опухолевых клеток K562-Luc.

*MLR TCR-отрицательных Т-клеток человека, экспрессирующих TFP*

[0372] TCR-отрицательные Т-клетки человека, экспрессирующие TFP, оценивают на аллогенность с помощью реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR). Клетки PBMC от несовпадающего донора сначала истощают от В-клеток с помощью активируемой магнитным полем сортировки CD19-отрицательных клеток. PBMC метят липофильным клеточным красителем PKH и фиксируют 0,4% параформальдегидом.

Одновременно с этим в Т-клетки-мишени вводят краситель PKH другого цвета. TCR-отрицательные Т-клетки человека, экспрессирующие TFP, и Т-клетки дикого типа от одного и того же донора впоследствии совместно культивируют либо в соотношении 1:1 (PBMC к Т-клеткам), либо Т-клетки культивируют отдельно. За пролиферацией донорных Т-клеток следят путем отслеживания красителя PKH в течение шести-двенадцати дней. Краситель PKH разбавляют наполовину при делении клеток, и, таким образом, степень пролиферации Т-клеток оценивают и сравнивают с контролями дикого типа.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержащая
  - (a) последовательность, кодирующую слитый белок (TFP - англ.: T cell receptor fusion protein) Т-клеточного рецептора (TCR - англ.: T cell receptor), содержащий
    - (i) субъединицу TCR, содержащую
      - (1) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR,
      - (2) трансмембранный домен, и
      - (3) внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, TCR альфа или TCR бета, и
    - (ii) человеческое или гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающий домен; и
  - (b) последовательность, кодирующую константный домен TCR, причем константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа, константный домен TCR бета или константный домен TCR альфа и константный домен TCR бета;при этом субъединица TCR и антитело функционально связаны, и при этом TFP функционально внедряется в комплекс TCR при экспрессии в модифицированной Т-клетке, содержащей функциональное нарушение эндогенного TCR.
2. Рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержащая
  - (a) последовательность, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий
    - (i) субъединицу TCR, содержащую
      - (1) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR,
      - (2) трансмембранный домен, и
      - (3) внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, TCR альфа или TCR бета, и
    - (ii) связывающий лиганд или его фрагмент, который способен связываться с антителом или его фрагментом; и
  - (b) последовательность, кодирующую константный домен TCR, причем константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа, константный домен TCR бета или константный домен TCR альфа и константный домен TCR бета;

причем субъединица TCR и связывающий лиганд или его фрагмент функционально связаны, и

при этом TFP функционально внедряется в комплекс TCR при экспрессии в модифицированной Т-клетке, содержащей функциональное нарушение эндогенного TCR.

3. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 2, отличающаяся тем, что связывающий лиганд способен связывать Fc-домен антитела.
4. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 2, отличающаяся тем, что связывающий лиганд способен селективно связывать антитело IgG1.
5. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 2, отличающаяся тем, что связывающий лиганд способен специфически связывать антитело IgG4.
6. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 2, отличающаяся тем, что антитело или его фрагмент связывается с антигеном клеточной поверхности.
7. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 2, отличающаяся тем, что антитело или его фрагмент связывается с антигеном клеточной поверхности на поверхности опухолевой клетки.
8. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 2, отличающаяся тем, что связывающий лиганд включает мономер, димер, тример, тетрамер, пентамер, гексамер, гептамер, октомер, нонамер или декамер.
9. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 2, отличающаяся тем, что связывающий лиганд не содержит антитело или его фрагмент.
10. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 9, отличающаяся тем, что связывающий лиганд включает полипептид CD 16 или его фрагмент.
11. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 10, отличающаяся тем, что связывающий лиганд включает CD16-связывающий полипептид.
12. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 2, отличающаяся тем, что связывающий лиганд является человеческим или гуманизированным.
13. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 2, дополнительно содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его фрагмент, способные связываться связывающим лигандом.
14. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 13, отличающаяся тем, что антитело или его фрагмент способны секретироваться из клетки.
15. Рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержащая
  - (а) последовательность, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий (i) субъединицу TCR, содержащую

- (1) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR,
  - (2) трансмембранный домен, и
  - (3) внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, TCR альфа или TCR бета, и
- (ii) антигенный домен, содержащий лиганд или его фрагмент, который связывается с рецептором или полипептидом, экспрессируемым на поверхности клетки; и
- (b) последовательность, кодирующую константный домен TCR, причем константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа, константный домен TCR бета или константный домен TCR альфа и константный домен TCR бета;
- причем субъединица TCR и домен антигена функционально связаны, и при этом TFR функционально внедряется в комплекс TCR при экспрессии в модифицированной T-клетке, включающей функциональное нарушение эндогенного TCR.
16. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 15, отличающаяся тем, что домен антигена содержит лиганд.
  17. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 15, отличающаяся тем, что лиганд связывается с рецептором клетки.
  18. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 15, отличающаяся тем, что лиганд связывается с полипептидом, экспрессируемым на поверхности клетки.
  19. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 15, отличающаяся тем, что рецептор или полипептид, экспрессируемый на поверхности клетки, включает рецептор или полипептид стрессовой реакции.
  20. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 15, отличающаяся тем, что рецептор или полипептид, экспрессируемый на поверхности клетки, представляет собой гликопротеин, родственный MHC класса I.
  21. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 20, отличающаяся тем, что гликопротеин, родственный MHC класса I, выбран из группы, состоящей из MICA, MICB, RAET1E, RAET1G, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4 и их комбинаций.
  22. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 15, отличающаяся тем, что домен антигена содержит мономер, димер, тример, тетрамер, пентамер, гексамер, гептамер, октомер, нонамер или декамер.
  23. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 22, отличающаяся тем, что домен антигена включает мономер или димер лиганда, или его фрагмент.

24. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 15, отличающаяся тем, что лиганд или его фрагмент представляет собой мономер, димер, тример, тетрамер, пентамер, гексамер, гептамер, октомер, нонамер или декамер.
25. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 24, отличающаяся тем, что лиганд или его фрагмент представляет собой мономер или димер.
26. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 15, отличающаяся тем, что домен антигена не содержит антитела или его фрагмента.
27. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 15, отличающаяся тем, что домен антигена не содержит вариабельную область.
28. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 15, отличающаяся тем, что домен антигена не содержит CDR.
29. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 15, отличающаяся тем, что лиганд или его фрагмент представляет собой лиганд группы 2D натуральных киллеров (NKG2D) или его фрагмент.
30. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-29, отличающаяся тем, что константный домен TCR внедряется в функциональный комплекс TCR при экспрессии в Т-клетке.
31. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-30, отличающаяся тем, что константный домен TCR внедряется в тот же функциональный комплекс TCR, что и функциональный комплекс TCR, в который внедряется TFP при экспрессии в Т-клетке.
32. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-31, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая TFP, и последовательность, кодирующая константный домен TCR, содержатся в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты.
33. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-31, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая TFP, и последовательность, кодирующая константный домен TCR, содержатся в разных молекулах нуклеиновой кислоты.
34. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по пп. 1-33, отличающаяся тем, что субъединица TCR и домен антитела, домен антигена, или связывающий лиганд или его фрагмент функционально связаны линкерной последовательностью.
35. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 34, отличающаяся тем, что линкерная последовательность содержит  $(G_4S)_n$ , где  $n =$  от 1 до 4.
36. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-35, отличающаяся тем, что трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен TCR из CD3

- эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, TCR альфа или TCR бета.
37. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-36, отличающаяся тем, что внутриклеточный домен получен только из CD3 эпсилон, только из CD3 гамма, только из CD3 дельта, только из TCR альфа или только из TCR бета.
  38. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-37, отличающаяся тем, что субъединица TCR содержит (i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, (ii) трансмембранный домен TCR и (iii) внутриклеточный домен TCR, причем по меньшей мере два из (i), (ii) и (iii) относятся к одной и той же субъединице TCR.
  39. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-38, отличающаяся тем, что внеклеточный домен TCR содержит внеклеточный домен белка или его часть, выбранного из группы, состоящей из альфа цепи TCR, бета цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.
  40. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-39, отличающаяся тем, что субъединица TCR содержит трансмембранный домен, содержащий трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа цепи TCR, бета цепи TCR, дзета цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.
  41. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-40, отличающаяся тем, что субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен белка, выбранный из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, или аминокислотную последовательность, имеющую к тому же хотя бы одну модификацию.
  42. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-41, в которой субъединица TCR содержит внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен белка, выбранный из функционального сигнального домена 4-1BB и/или функционального сигнального домена CD3 дзета, или аминокислотную последовательность, имеющую к тому же по меньшей мере одну модификацию.
  43. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-42, дополнительно содержащая последовательность, кодирующую костимулирующий домен.
  44. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 43, отличающаяся тем, что

костимулирующий домен содержит функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137), и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

45. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-44, отличающаяся тем, что субъединица TCR содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM - англ.: immunoreceptor tyrosine-based activation motif) субъединицы TCR, который содержит белок ITAM или его часть, выбранный из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, дзета цепи TCR, цепи Fc-эпсилон-рецептора 1, цепи Fc-эпсилон-рецептора 2, цепи Fc-гамма-рецептора 1, цепи Fc-гамма-рецептора 2a, цепи Fc-гамма-рецептора 2b1, цепи Fc-гамма-рецептора 2b2, цепи Fc-гамма-рецептора 3a, цепи Fc-гамма-рецептора 3b, цепи Fc-бета-рецептора 1, TYROBP (DAP 12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих к тому же по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.
46. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 45, отличающаяся тем, что ITAM замещает ITAM из CD3 гамма, CD3 дельта или CD3 эпсилон.
47. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 45, отличающаяся тем, что ITAM выбран из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта, и заменяет другой ITAM, выбранный из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта.
48. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-47, отличающаяся тем, что TFP, константный домен TCR альфа, константный домен TCR бета и любая их комбинация способны функционально взаимодействовать с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR.
49. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-48, отличающаяся тем, что (а) константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа, и TFP функционально интегрируется в комплекс TCR, содержащий эндогенную субъединицу TCR бета, CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта или их комбинацию;



- (b) константный домен TCR представляет собой константный домен TCR бета, и TFP функционально интегрируется в комплекс TCR, содержащий эндогенную субъединицу TCR альфа, CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта или их комбинацию; или
- (c) константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа и константный домен TCR бета, и TFP функционально интегрируется в комплекс TCR, содержащий эндогенную субъединицу CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта или их комбинацию.
50. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-49, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна, но не более 20 модификаций содержат модификацию аминокислоты, которая опосредует клеточную сигнализацию, или модификацию аминокислоты, которая фосфорилируется в ответ на связывание лиганда с TFP.
51. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1 и 34-50, отличающаяся тем, что человеческое или гуманизированное антитело представляет собой фрагмент антитела.
52. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 51, отличающаяся тем, что фрагмент антитела представляет собой scFv, домен однодоменного антитела, домен V<sub>H</sub> или домен V<sub>L</sub>.
53. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1 и 34-52, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из связывающего домена против CD 19, связывающего домена против антигена созревания В-клеток (BCMA), связывающего домена против мезотелина (MSLN), связывающего домена против IL13R $\alpha$ 2, связывающего домена против MUC16, связывающего домена против CD22, связывающего домена против PD-1, связывающего домена против BAFF или рецептора BAFF и связывающего домена против ROR-1.
54. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-53, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из ДНК и РНК.
55. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-54, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.
56. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-55, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота включает аналог нуклеиновой кислоты, причем аналог нуклеиновой кислоты не входит в кодирующую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты.
57. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 56, отличающаяся тем, что нуклеиновый аналог выбран из группы, состоящей из 2'-О-метила, 2'-О-метоксиэтила (2'-O-MOE),

2'-О-аминопропила, 2'-дезоксидезокси-2'-фтора, 2'-О-аминопропила (2'-О-AP), 2'-О-диметиламиноэтила (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропила (2'-О-DMAP), Т-О-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-О-DMAEOE), модифицированного 2'-ОН-метилацетамидо (2'-О-NMA), закрытой нуклеиновой кислоты (ЗНК), этиленнуклеиновой кислоты (ЭНК), пептидо-нуклеиновой кислоты (ПНК), 1',5'-ангидрогекситоловой нуклеиновой кислоты (АНК), морфолино, метилфосфонатного нуклеотида, тиолфосфонатного нуклеотида и 2'-фтор N3-P5'-фосфорамидита.

58. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-57, дополнительно содержащая лидерную последовательность.
59. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-58, дополнительно содержащая промоторную последовательность.
60. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-59, дополнительно содержащая последовательность, кодирующую поли(А)-хвост.
61. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-60, дополнительно содержащая последовательность 3'UTR.
62. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-61, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту или не встречающуюся в природе нуклеиновую кислоту.
63. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-62, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота представляет собой транскрибированную *in vitro* нуклеиновую кислоту.
64. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-63, дополнительно содержащая последовательность, кодирующую трансмембранный домен TCR альфа.
65. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-63, дополнительно содержащая последовательность, кодирующую трансмембранный домен TCR бета.
66. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-63, дополнительно содержащая последовательность, кодирующую трансмембранный домен TCR альфа, и последовательность, кодирующую трансмембранный домен TCR бета.
67. Вектор, содержащий рекомбинантную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-66.
68. Вектор по п. 67, отличающийся тем, что вектор выбран из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, аденоассоциированного вирусного вектора (AAV - англ.: adeno-associated virus),

вектора на основе вируса саркомы Рауса (ВСП) или ретровирусного вектора.

69. Вектор по п. 67 или 68, отличающийся тем, что вектор представляет собой вектор AAV6.
70. Вектор по любому из пп. 67-69, дополнительно содержащий промотор.
71. Вектор по любому из пп. 67-70, отличающийся тем, что вектор представляет собой транскрибируемый *in vitro* вектор.
72. Модифицированная Т-клетка, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-66, или вектор по любому из пп. 67-71, отличающаяся тем, что модифицированная Т-клетка включает функциональное нарушение эндогенного TCR.
73. Модифицированная Т-клетка, содержащая последовательность, кодирующую TFP в виде нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-66, или TFP, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-66, кодирующей TFP, отличающаяся тем, что модифицированная Т-клетка содержит функциональное нарушение эндогенного TCR.
74. Модифицированная аллогенная Т-клетка, содержащая последовательность, кодирующую TFP по любому из пп. 1-66, или TFP, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-66, кодирующей TFP.
75. Модифицированная Т-клетка по любому из пп. 72-74, отличающаяся тем, что Т-клетка дополнительно содержит гетерологичную последовательность, кодирующую константный домен TCR, где константный домен TCR представляет собой константный домен TCR альфа, константный домен TCR бета или константный домен TCR альфа и константный домен TCR бета.
76. Модифицированная Т-клетка по любому из пп. 72-75, отличающаяся тем, что эндогенный TCR, который функционально нарушен, представляет собой эндогенную альфа цепь TCR, эндогенную бета цепь TCR или эндогенную альфа цепь TCR и эндогенную бета цепь TCR.
77. Модифицированная Т-клетка по любому из пп. 72-76, отличающаяся тем, что эндогенный TCR, который функционально нарушен, имеет пониженное связывание с комплексом МНС-пептид по сравнению с таковым немодифицированной контрольной Т-клетки.
78. Модифицированная Т-клетка по любому из пп. 72-77, отличающаяся тем, что функциональное нарушение представляет собой нарушение гена, кодирующего эндогенный TCR.

79. Модифицированная Т-клетка по п. 78, отличающаяся тем, что нарушение гена, кодирующего эндогенный TCR, представляет собой удаление последовательности гена, кодирующего эндогенный TCR, из генома Т-клетки.
80. Модифицированная Т-клетка по любому из пп. 72-79, отличающаяся тем, что Т-клетка представляет собой человеческую Т-клетку, выбранную из CD4 клеток, CD8 клеток, наивных Т-клеток, стволовых Т-клеток памяти, центральных Т-клеток памяти, дважды отрицательных Т-клеток, эффекторных Т-клеток памяти, эффекторных Т-клеток, клеток Th0, клеток Tc0, клеток Th1, клеток Tc1, клеток Th2, клеток Tc2, клеток Th 17, клеток Th22, гамма/дельта-Т-клеток, натуральных клеток-киллеров (NK ), Т-натуральных клеток-киллеров (NKT), гемопоэтических стволовых клеток и плюрипотентных стволовых клеток.
81. Модифицированная Т-клетка по любому из пп. 72-80, отличающаяся тем, что Т-клетка представляет собой CD8+ или CD4+ Т-клетку.
82. Модифицированная Т-клетка по любому из пп. 72-81, отличающаяся тем, что Т-клетка представляет собой аллогенную Т-клетку.
83. Модифицированная Т-клетка по любому из пп. 72-82, дополнительно содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, содержащую первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанный со вторым полипептидом, содержащим положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена.
84. Модифицированная Т-клетка по п. 83, отличающаяся тем, что ингибирующая молекула содержит первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть PD1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и первичный сигнальный домен.
85. Фармацевтическая композиция, содержащая:
- (a) модифицированные Т-клетки по любому из пп. 72-84; и
  - (b) фармацевтически приемлемый носитель.
86. Способ получения модифицированных Т-клеток по любому из пп. 72-84, включающий
- (a) нарушение эндогенного гена TCR, кодирующего альфа цепь TCR, бета цепь TCR или альфа цепь TCR и бета цепь TCR; тем самым продуцируя Т-клетку, содержащую функциональное нарушение эндогенного гена TCR; и
  - (b) трансдукцию Т-клетки, содержащей функциональное нарушение эндогенного гена TCR, рекомбинантной нуклеиновой кислотой по любому из пп. 1-63 или вектором по любому из пп. 67-71.

87. Способ по п. 86, отличающийся тем, что нарушение включает трансдукцию Т-клетки белком нуклеазы или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок нуклеазы, нацеленной на эндогенный ген, кодирующий альфа цепь TCR, бета цепь TCR или альфа цепь TCR и бета цепь TCR.
88. Способ получения модифицированной Т-клетки по любому из пп. 72-84, включающий трансдукцию Т-клетки, содержащей функциональное нарушение эндогенного гена TCR, рекомбинантной нуклеиновой кислотой по любому из пп. 1-63 или вектором по любому из пп. 67-71.
89. Способ по п. 88, отличающийся тем, что Т-клетка, содержащая функциональное нарушение эндогенного гена TCR, представляет собой Т-клетку, содержащую функциональное нарушение эндогенного гена TCR, кодирующего альфа цепь TCR, бета цепь TCR или альфа цепь TCR и бета цепь TCR.
90. Способ по любому из пп. 86-89, отличающийся тем, что Т-клетка представляет собой Т-клетку человека.
91. Способ по любому из пп. 86-90, отличающийся тем, что Т-клетка, содержащая функциональное нарушение эндогенного гена TCR, имеет пониженное связывание с комплексом МНС-пептид по сравнению со связыванием немодифицированной контрольной Т-клетки.
92. Способ по любому из пп. 86-91, отличающийся тем, что нуклеаза представляет собой мегануклеазу, нуклеазу «цинковые пальцы» (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активатору транскрипции (TALEN), нуклеазу CRISPR/Cas или нуклеазу megaTAL.
93. Способ по любому из пп. 86-92, отличающийся тем, что последовательность, содержащаяся в рекомбинантной нуклеиновой кислоте или векторе, вставляется в ген эндогенной субъединицы TCR в сайте рестрикции, и при этом вставка последовательности в ген эндогенной субъединицы TCR функционально нарушает эндогенную субъединицу TCR.
94. Способ по любому из пп. 86-93, отличающийся тем, что нуклеаза представляет собой мегануклеазу.
95. Способ по п. 94, отличающийся тем, что мегануклеаза содержит первую субъединицу и вторую субъединицу, причем первая субъединица связывается с первым полусайтом распознавания последовательности распознавания, а вторая субъединица связывается со вторым полусайтом распознавания последовательности распознавания.
96. Способ по п. 95, отличающийся тем, что мегануклеаза представляет собой

одноцепочечную мегануклеазу, содержащую линкер, при этом линкер ковалентно соединяет первую субъединицу и вторую субъединицу.

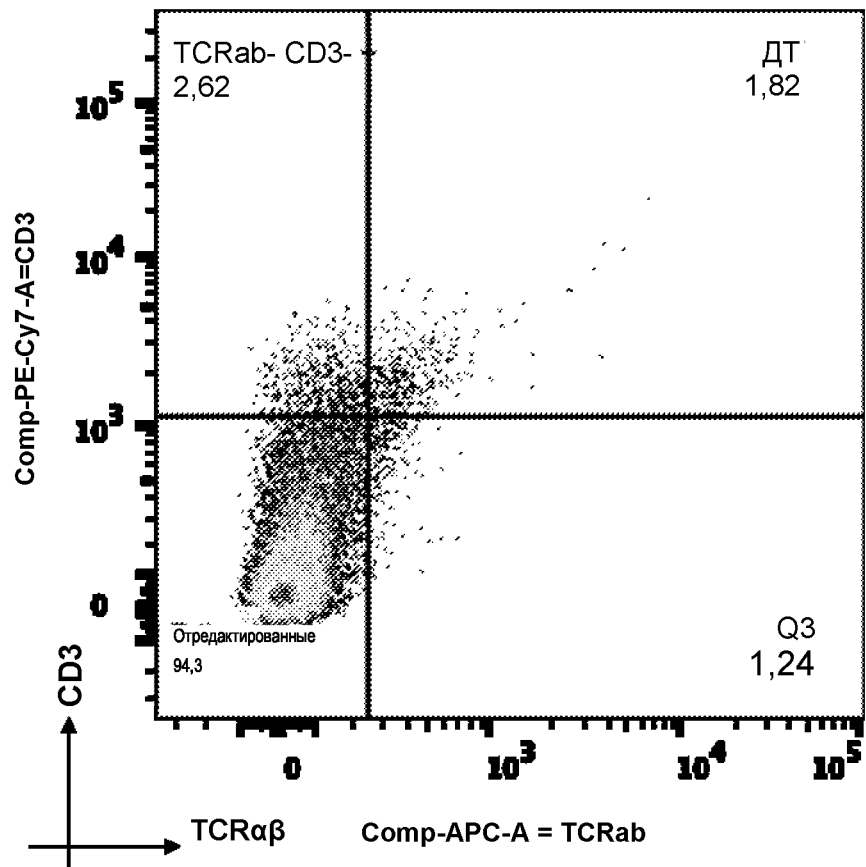
97. Способ лечения рака у субъекта, который в этом нуждается, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 85.
98. Способ лечения рака у субъекта, который в этом нуждается, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей (а) модифицированные Т-клетки, полученные в соответствии со способом по любому из пп. 86-96; и (b) фармацевтически приемлемый носитель.
99. Способ лечения рака у субъекта, который в этом нуждается, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей (а) модифицированные Т-клетки, полученные в соответствии со способом по любому из пп. 88-96; и (b) фармацевтически приемлемый носитель.
100. Способ по любому из пп. 97-99, отличающийся тем, что модифицированная Т-клетка представляет собой аллогенную Т-клетку.
101. Способ по любому из пп. 97-100, отличающийся тем, что у субъекта высвобождается меньше цитокинов по сравнению с субъектом, которому вводят эффективное количество немодифицированных контрольных Т-клеток.
102. Способ по любому из пп. 97-101, отличающийся тем, что у субъекта высвобождается меньше цитокинов по сравнению с субъектом, которому вводят эффективное количество модифицированной Т-клетки, содержащей рекомбинантную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-66 или вектор по любому из пп. 67-71.
103. Способ по любому из пп. 97-102, отличающийся тем, что включает введение фармацевтической композиции в комбинации с агентом, повышающим эффективность фармацевтической композиции.
104. Способ по любому из пп. 97-103, отличающийся тем, что включает введение фармацевтической композиции в комбинации с агентом, который ослабляет один или несколько побочных эффектов, связанных с фармацевтической композицией.
105. Способ по любому из пп. 97-104, отличающийся тем, что рак представляет собой солидный рак, лимфому или лейкоз.
106. Способ по любому из пп. 97-105, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из почечно-клеточной карциномы, рака груди, рака легкого, рака яичников, рака простаты, рака толстой кишки, рака шейки матки, рака мозга, рака печени, рака поджелудочной железы, рака почки и желудка.
107. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-66, вектор по любому из

пп. 67-71, модифицированная Т-клетка по любому из пп. 72-84 или фармацевтическая композиция по п. 85 для применения в качестве лекарственного средства или для приготовления лекарственного средства.



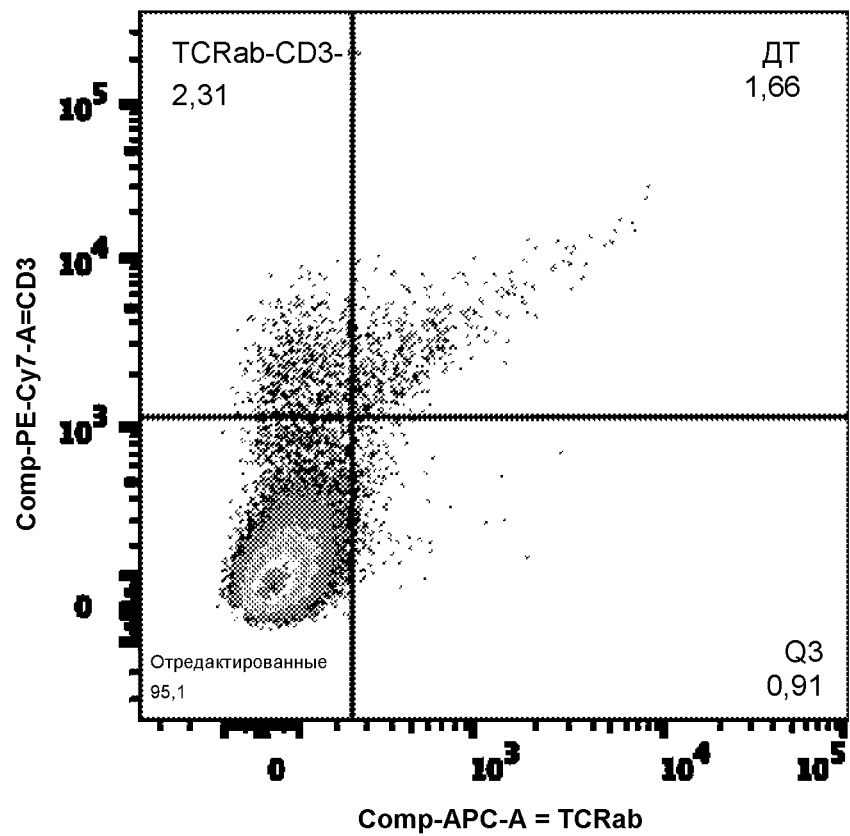


Отредактированные клетки по TRA



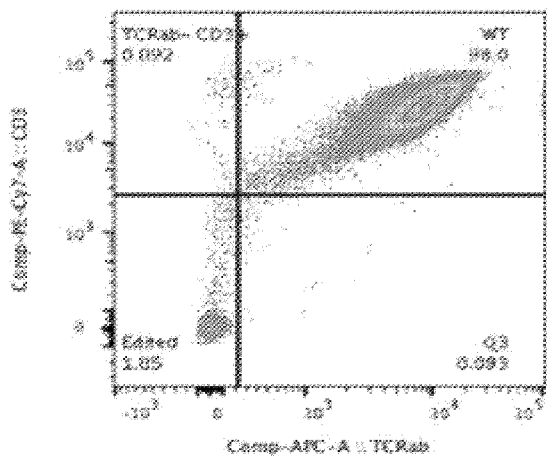
ФИГ. 2А

Отредактированные клетки по TRB

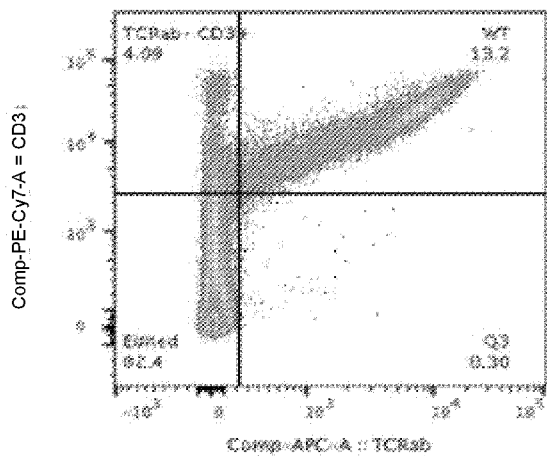
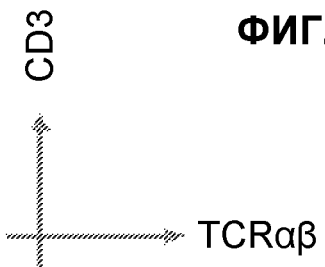


ФИГ. 2В

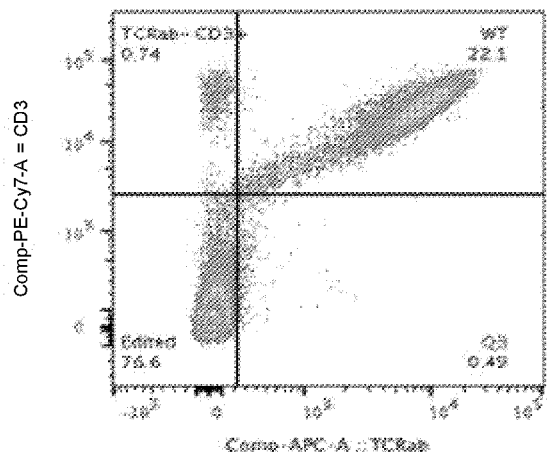
Донор 1 дикого типа



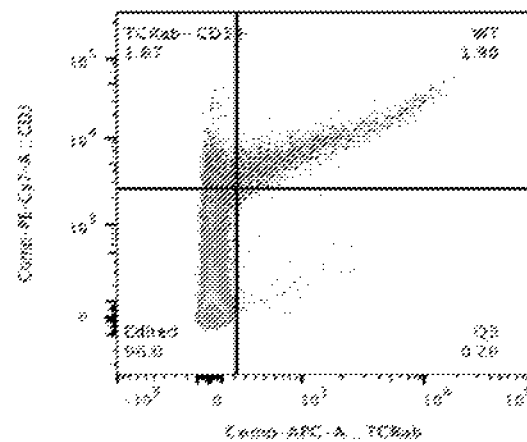
ФИГ. 3А



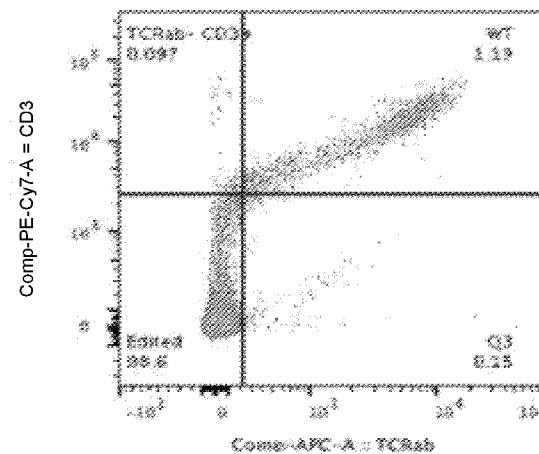
ФИГ. 3В



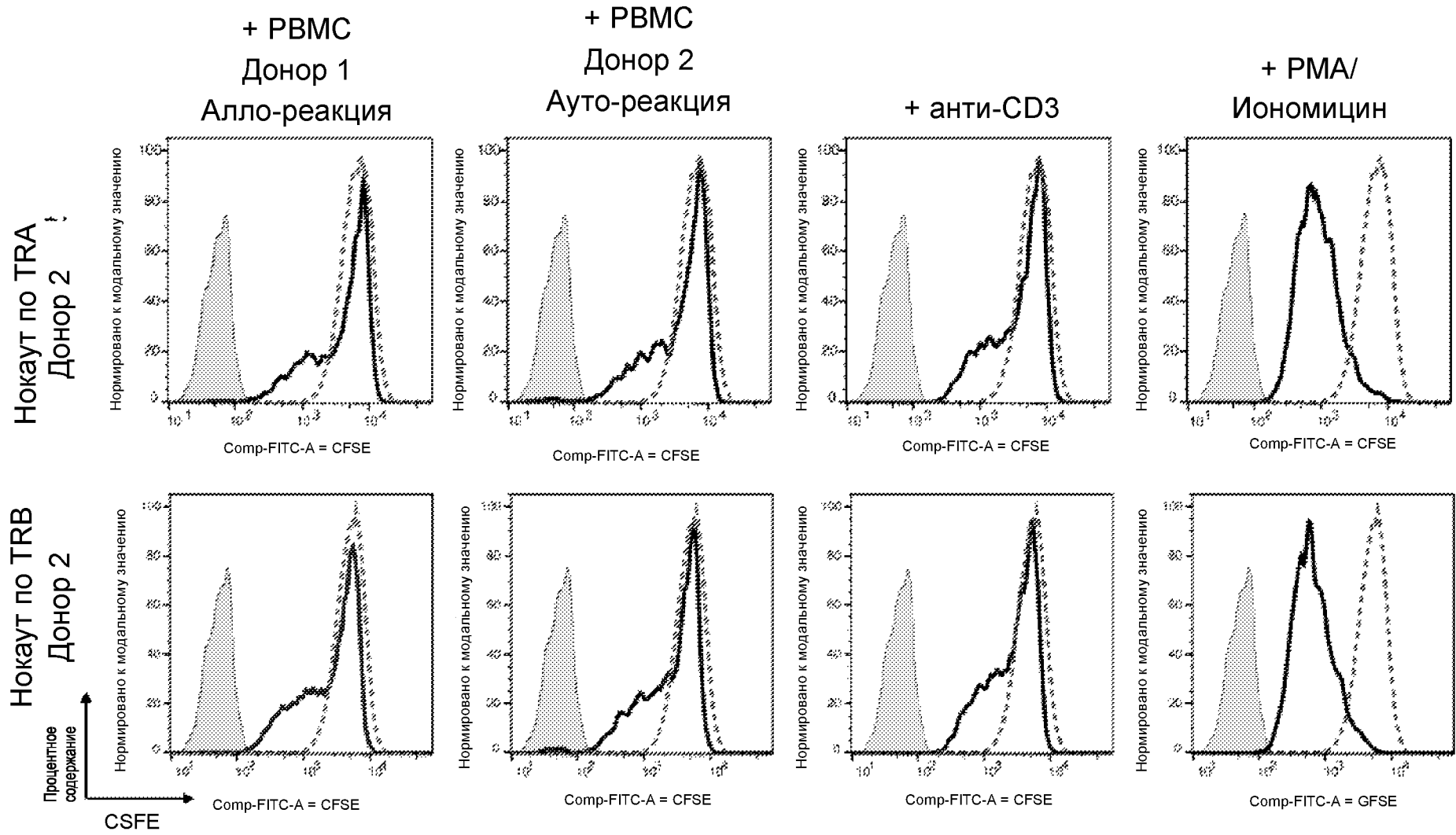
ФИГ. 3С



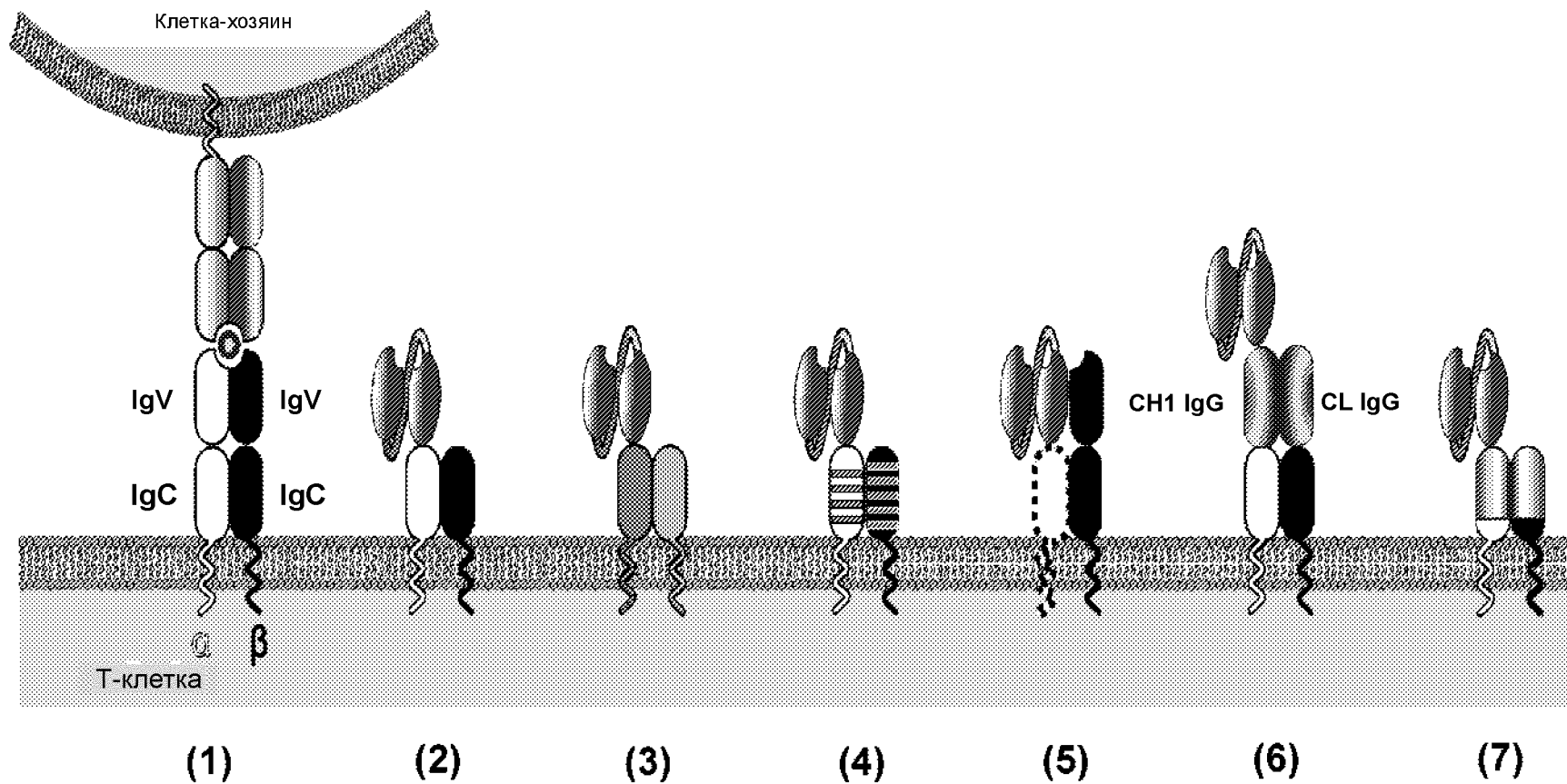
ФИГ. 3D



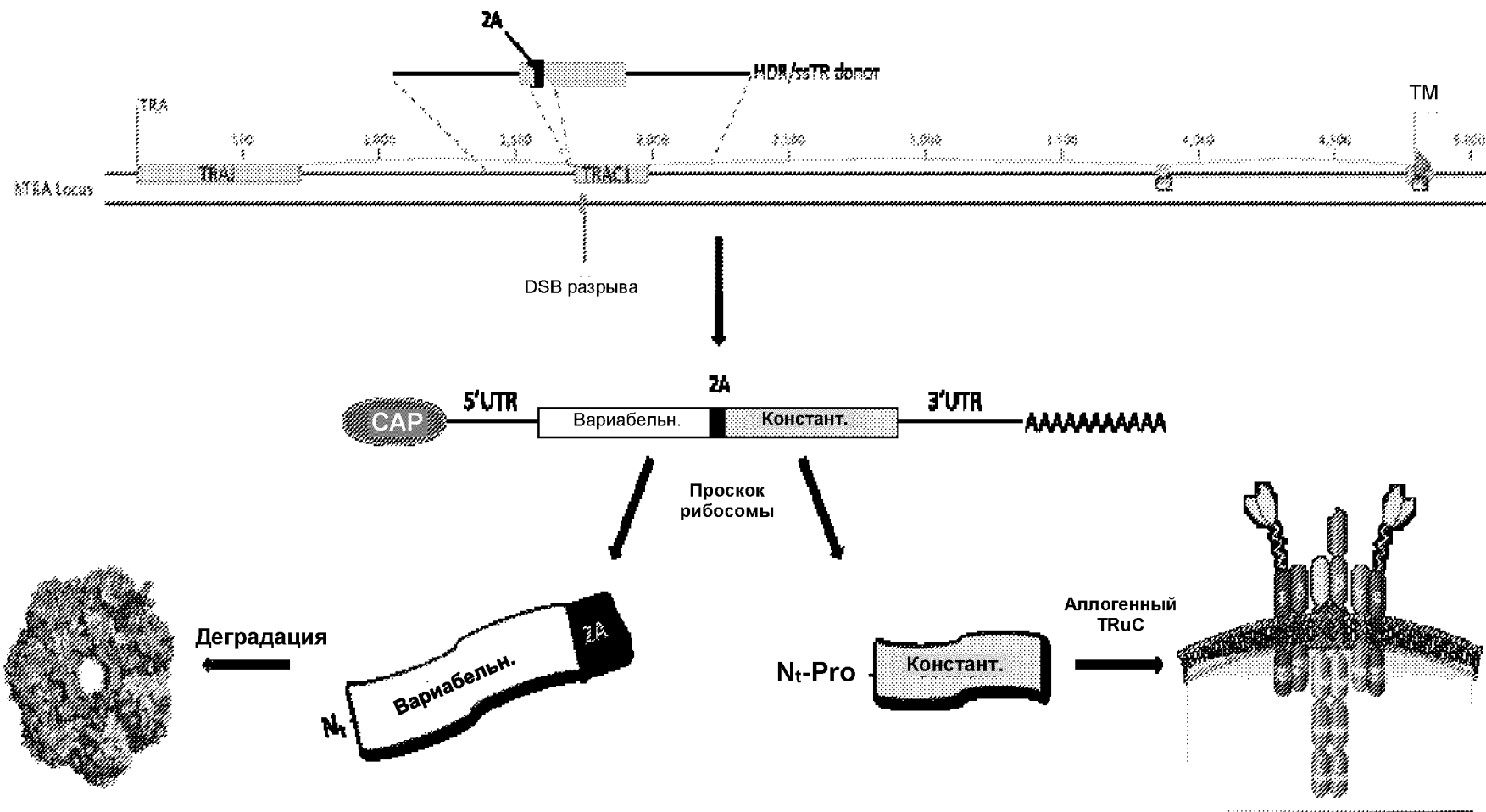
ФИГ. 3Е



**ФИГ. 4**



ФИГ. 5

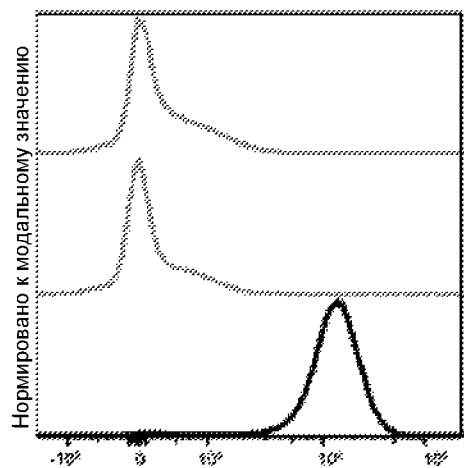


ФИГ. 6

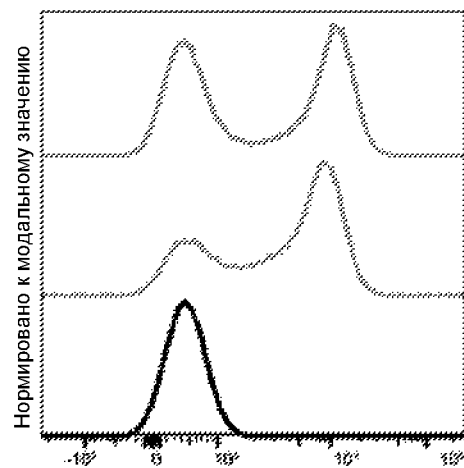
Алло E-TFP T

Алло ab-TFP T

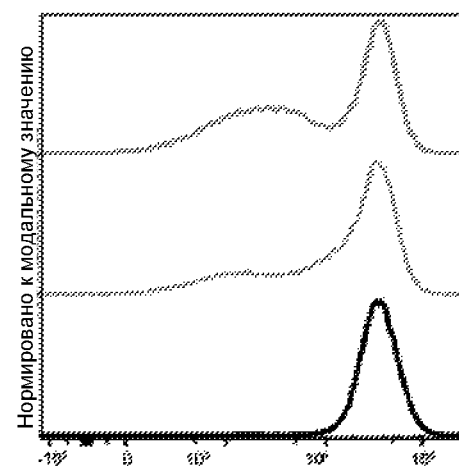
ДТ



человеческий TCR



TCR мыши

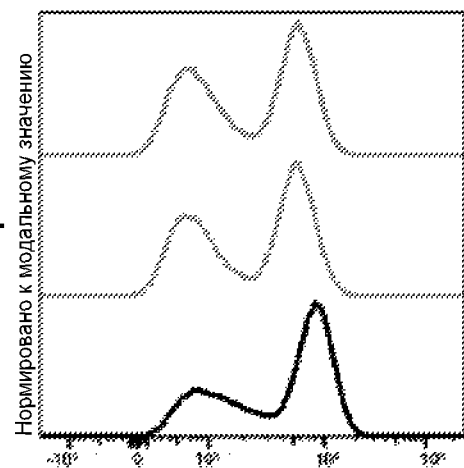


человеческий CDS

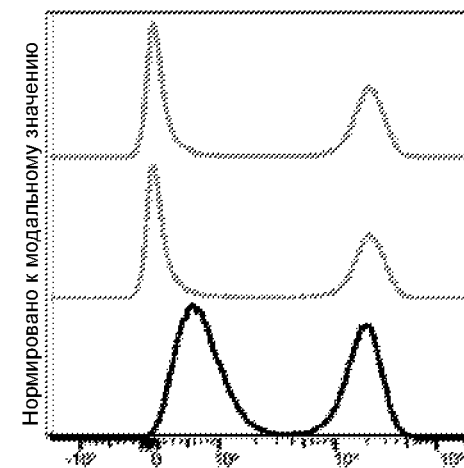
Алло E-TFP T

Алло ab-TFP T

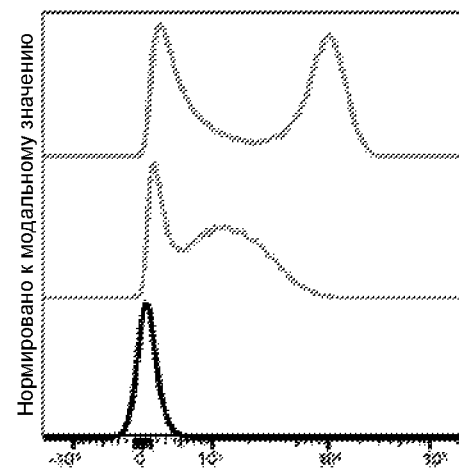
ДТ



CD4 человека

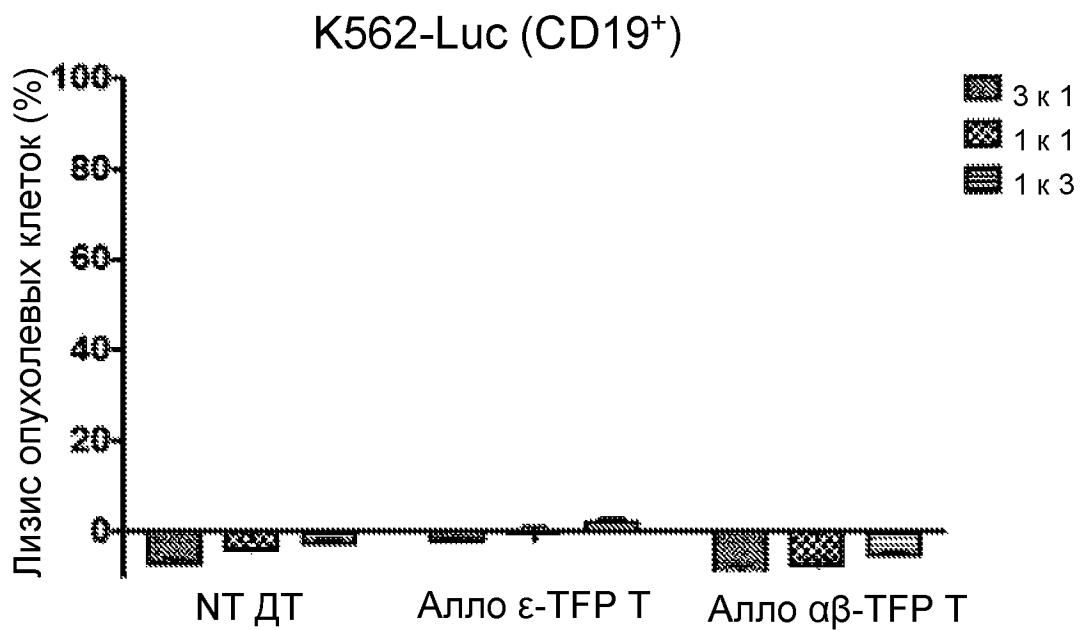
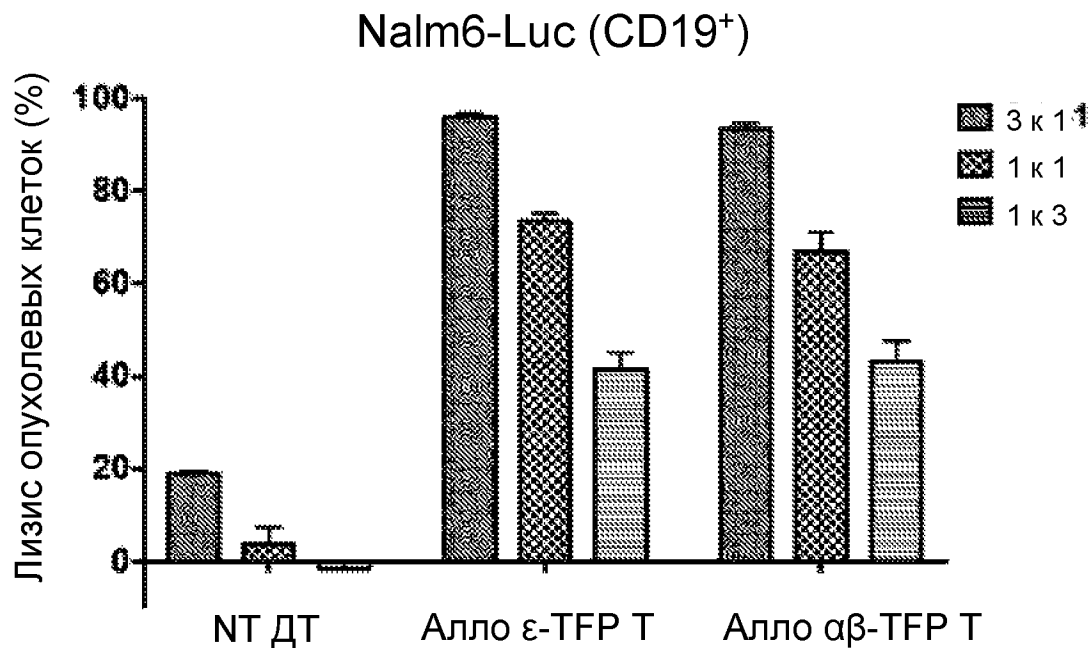


CD8 человека



FMC63

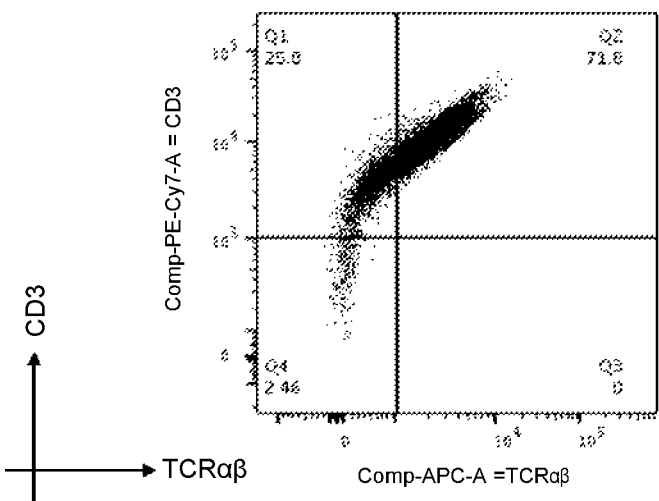
ФИГ. 7



ФИГ. 8

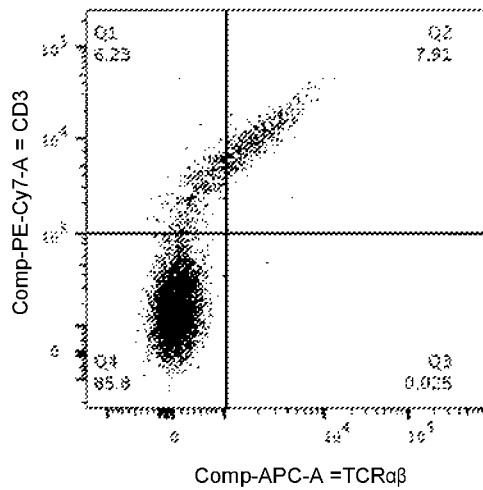
Поверхностное  
окрашивание

Дикий тип



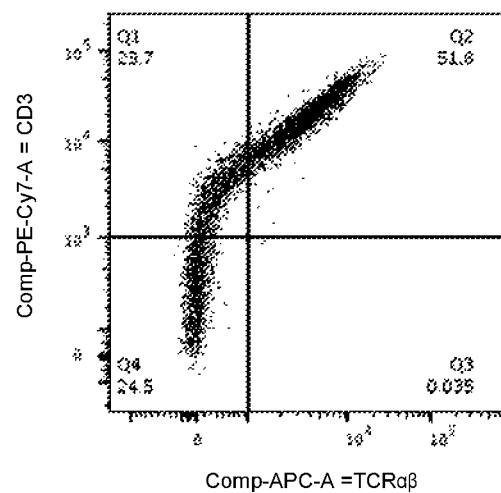
ФИГ. 9А

Нокаут по TRB  
Без трансдукции



ФИГ. 9В

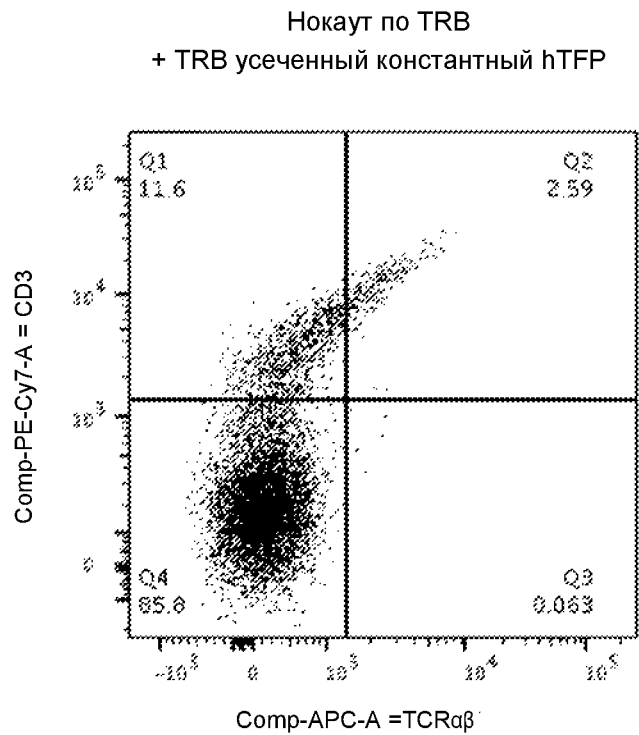
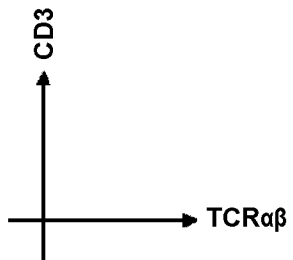
Нокаут по TRB  
+ TRB FL TFP



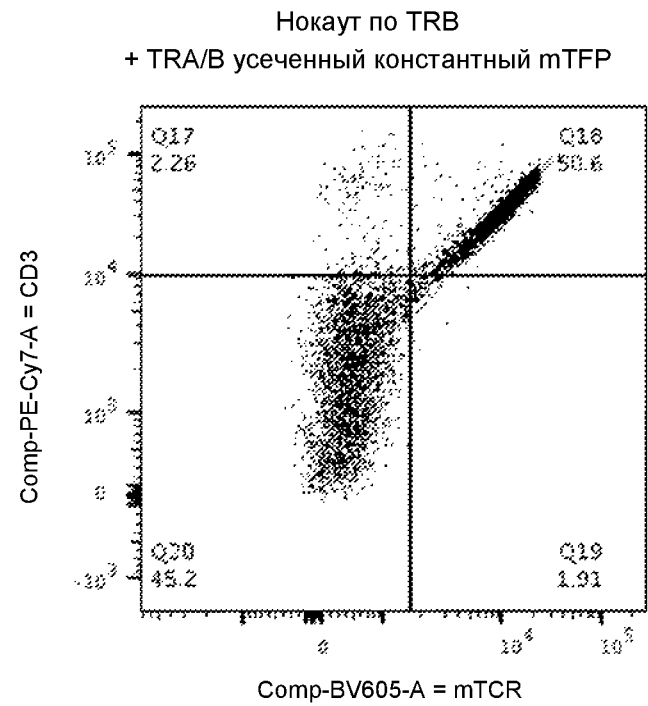
ФИГ. 9С



Поверхностное  
окрашивание



ФИГ. 10А



ФИГ. 10В