(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202190188 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.02

(22) Дата подачи заявки
2019.07.26

(51) Int. Cl. ***C07K 14/435*** (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ TCR С ПРИМЕНЕНИЕМ СПЕЦИФИЧЕСКИХ К МИШЕНЯМ ГИБРИДНЫХ БЕЛКОВ

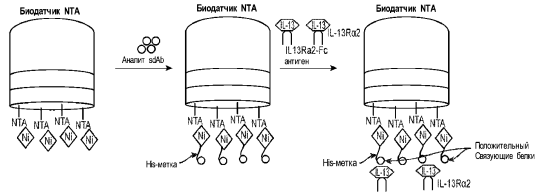
(31) **62/703,824; 62/703,834; 62/725,066; 62/727,459; 62/727,469**
(32) **2018.07.26; 2018.07.26; 2018.08.30; 2018.09.05; 2018.09.05**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/043690**
(87) **WO 2020/023888 2020.01.30**
(88) **2020.07.30**

(71) Заявитель:
TCP2 ТЕРАПЬЮТИКС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Баеуерле Патрик Александр, Хофмайстер Роберт, Геттс Дэниэл, Ашминова Ваниа, Дин Цзянь (US)

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

(57) В изобретении предложены гибридные белки (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), Т-клетки, сконструированные с возможностью экспрессировать один или более TFP MUC16, или IL13Rα2, или MSLN, а также способы их применения для лечения заболеваний, включая рак.



202190188 A1

202190188 A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ TCR С ПРИМЕНЕНИЕМ СПЕЦИФИЧЕСКИХ К МИШЕНЯМ ГИБРИДНЫХ БЕЛКОВ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/703 824, поданной 26 июля 2018 г., предварительной заявке на патент США № 62/725 066, поданной 30 августа 2018 г., предварительной заявке на патент США № 62/703 834, поданной 26 июля 2018 г., предварительной заявке на патент США № 62/727 469, поданной 5 сентября 2018 г. и предварительной заявке на патент США № 62/727 459, поданной 5 сентября 2018 г., каждая из которых включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Большинство пациентов с 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 обобщенно 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 на подходящую молекулу клеточной поверхности на раковых клетках, демонстрируют многообещающие 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 CD-19 (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. Обнадеживающие 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 требует, 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 BCMA- и CD-19-положительными В-клеточными злокачественными опухолями и пациентами, экспрессирующими HLA-A2, с экспрессирующими NY-ESO-1-пептид синовиальными саркомами. Существует очевидная потребность в улучшении генетически сконструированных Т-клеток для более широкого действия против различных злокачественных опухолей у человека.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В настоящем документе предложены гибридные белки (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), Т-клетки, сконструированные с возможностью экспрессировать один или более TFP, а также способы их применения для лечения заболеваний.

[0006] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается фармацевтическая композиция, содержащая (I) Т-клетку субъекта-человека, причем Т-клетка содержит рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий (a) субъединицу TCR, содержащую (i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, (ii) трансмембранный домен TCR и (iii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена; и (b) антигенсвязывающий домен, содержащий связывающий домен против MUC16, связывающий домен против IL13Rα2 или связывающий домен против мезотелина (MSLN); и (II) фармацевтически приемлемый носитель, причем субъединица TCR и антигенсвязывающий домен функционально связаны; при этом TFP функционально взаимодействует с TCR при экспрессии в Т-клетке.

[0007] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка проявляет повышенную цитотоксичность к клетке, экспрессирующей антиген, который специфически

взаимодействует с антигенсвязывающим доменом, по сравнению с Т-клеткой, не содержащей TFP.

[0008] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR субъединицы TCR получены из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта.

[0009] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR субъединицы TCR получены из одной субъединицы комплекса TCR, причем одна субъединица является альфа-цепью TCR, бета-цепью TCR, гамма-цепью TCR, дельта-цепью TCR, CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта.

[0010] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается фармацевтическая композиция, содержащая (I) Т-клетку субъекта-человека, причем Т-клетка содержит рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий (a) субъединицу TCR, содержащую (i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена; и (b) scFv или однодоменное антитело, содержащие связывающий домен против MUC16, связывающий домен против IL13Rα2 или связывающий домен против мезотелина (MSLN); и (II) фармацевтически приемлемый носитель, причем субъединица TCR и связывающий домен против MUC16, связывающий домен против IL13Rα2 или связывающий домен против мезотелина (MSLN) функционально связаны; при этом внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальные домены субъединицы TCR получены только из субъединицы TCR, отличающейся от альфа-цепи TCR или бета-цепи TCR; причем TFP функционально взаимодействует с TCR при экспрессии в Т-клетке; и при этом Т-клетка проявляет пониженную цитотоксичность к клетке, экспрессирующей антиген, который специфически взаимодействует с связывающим доменом против MUC16 или против IL13Rα2 по сравнению с Т-клеткой, не содержащей TFP.

[0011] В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая связывающий домен против MUC16, против IL13Rα2 или против MSLN, соединена с последовательностью, кодирующей внеклеточный домен TCR через кодирующую линкер последовательность. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит $(G_4S)_n$, где G представляет собой глицин, S представляет собой серин и n является целым числом от 1 до 4.

[0012] В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против MUC16 содержит (a) последовательность CDR1 тяжелой цепи (HC) GRTVSSLF, GRAVSSLF или GDSLDGYV, (b) последовательность CDR2 HC ISRYSLYT или ISGDGSMR, и (c) последовательность CDR3 HC ASKLEYTSNDYDS или AADPPTWDY. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против MUC16 содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:40.

[0013] В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против IL13Rα2 содержит (a) последовательность тяжелой цепи (HC) CDR1 GFTSDYYI или GFASDDYI, (b) последовательность CDR2 HC ISSKYANT или ISSRYANT, и (c) последовательность CDR3 HC AADTRRYTCPDIATMHRNFDS или AMDSRRVTCPEISTMHRNFDS. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против IL13Rα2 содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:71 или SEQ ID NO:76. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательности определяется с применением алгоритма BLAST с размером слова 6, матрицей BLOSUM62, штрафом за открытие 11 и штрафом за продление 1.

[0014] В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против MSLN содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO:97 или SEQ ID NO:98. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по существу не содержит сыворотки. В некоторых вариантах осуществления scFv или однодоменное антитело представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv или однодоменное антитело представляет собой однодоменное антитело. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело представляет собой домен V_H. В некоторых вариантах осуществления кодируемый связывающий домен против TAA содержит связывающий домен против TAA, и при этом Т-клетки обладают большей или более эффективной цитотоксической активностью, чем CD8+ или CD4+ Т-клетки, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий (a) связывающий домен против TAA, функционально связанный с (b) по

меньшей мере частью внеклеточного домена CD28, (c) трансмембранным доменом CD28, (d) по меньшей мере частью внутриклеточного домена CD28 и (e) внутриклеточным доменом CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления кодируемая молекула TFP функционально взаимодействует с эндогенным комплексом TCR, по меньшей мере с одним эндогенным полипептидом TCR или с их комбинацией при экспрессии в Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой первичную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой CD4+ Т-клетку человека. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой CD8+ Т-клетку человека. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки дополнительно содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1 и BTLA, причем по меньшей мере часть ингибирующей молекулы связана со вторым полипептидом, содержащим положительный сигнал из внутриклеточного сигнального домена. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид содержит костимулирующий домен и первичный сигнальный домен из белка, выбранного из группы, состоящей из CD28, CD27, ICOS, CD3ζ, 41-BB, OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160 и B7-H3. В некоторых вариантах осуществления выработка IL-2 или IFNγ Т-клетками является повышенной в присутствии клетки, экспрессирующей антиген, который специфически взаимодействует со связывающим доменом против TAA, по сравнению с Т-клеткой, не содержащей TFP. В некоторых вариантах осуществления клетка является популяцией человеческих CD8+ или CD4+ Т-клеток, причем в отдельной Т-клетке популяции содержится по меньшей мере две молекулы TFP, или по меньшей мере две Т-клетки популяции вместе содержат по меньшей мере две молекулы TFP; причем по меньшей мере две молекулы TFP содержат связывающий домен против TAA, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; и при этом по меньшей мере одна из по меньшей мере двух молекул TFP функционально взаимодействует с эндогенным комплексом TCR, по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления субъединица TCR получена только из CD3 эпсилон. В некоторых вариантах осуществления субъединица TCR получена только из CD3 гамма. В некоторых вариантах осуществления субъединица TCR получена только из CD3 дельта.

[0015] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается способ обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, включающий введение млекопитающему эффективного количества популяции Т-клеток, трансдуцированных рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей гибридный белок (TFP) Т-

клеточного рецептора (TCR), содержащий a) субъединицу TCR, содержащую (i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, и (ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена TCR; и b) домен антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, который является связывающим доменом против TAA; причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными, причем TFP включается в TCR при экспрессии в Т-клетке, и при этом после лечения высвобождаются более низкие уровни цитокинов по сравнению с уровнями цитокинов у млекопитающего, получившего лечение CAR-T- клеткой, содержащей тот же самый домен антитела. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен TCR получен из CD3 эпсилон или CD3 гамма. В других вариантах осуществления субъединица TCR дополнительно содержит трансмембранный домен TCR. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR получены из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, дельта-цепи TCR, гамма-цепи TCR, CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR получены из одной субъединицы комплекса TCR, причем одна субъединица является альфа-цепью TCR, бета-цепью TCR, дельта-цепью TCR, гамма-цепью TCR, CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта.

[0016] В некоторых вариантах осуществления домен антитела представляет собой домен V_{HH} против MUC16, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:40. В некоторых вариантах осуществления домен антитела представляет собой домен V_{HH} против IL13Rα2, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:71 или SEQ ID NO:76. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательности определяется с применением алгоритма BLAST с размером слова 6, матрицей BLOSUM62, штрафом за открытие 11 и штрафом за продление 1. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аутологическую Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аллогенную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой человека.

[0017] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается способ лечения млекопитающего, имеющего заболевание, связанное с экспрессией опухолеассоциированного антигена (TAA) (например, MUC16, IL13Rα2 или MSLN), включающий введение млекопитающему эффективного количества популяции Т-клеток, трансдуцированных рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий a) субъединицу TCR, содержащую (i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, и (ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3-эпсилон или CD3-гамма; и b) домен антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, который является связывающим доменом против TAA; причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными, причем TFP включается в TCR при экспрессии в Т-клетке, и при этом после лечения высвобождаются более низкие уровни цитокинов по сравнению с уровнями цитокинов у млекопитающего, получившего лечение CAR-Т-клеткой, содержащей тот же самый домен антитела.

[0018] В некоторых вариантах осуществления домен антитела представляет собой домен V_{HH}, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:40. В некоторых вариантах осуществления домен антитела представляет собой домен V_{HH}, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:71 или SEQ ID NO:76. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательности определяется с применением алгоритма BLAST с размером слова 6, матрицей BLOSUM62, штрафом за открытие 11 и штрафом за продление 1. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аутологическую Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аллогенную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления заболевание, связанное с экспрессией TAA, выбрано из группы, состоящей из пролиферативного заболевания, рака, злокачественной опухоли, неонкологического показания, связанного с экспрессией TAA, например MUC16, IL13Rα2 или MSLN. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из глиобластомы, мезотелиомы, почечно-клеточной карциномы, рака желудка, рака молочной железы, рака легкого, рака яичника, рака предстательной железы, рака толстой кишки, рака шейки матки, рака головного мозга,

рака печени, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака мочевого пузыря, рака мочеточника, рака почки, рака эндометрия, рака пищевода, рака ЖКТ, карциномы вилочковой железы, холангиокарциномы, рака желудка и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из глиобластомы, мезотелиомы, папиллярной серозной аденокарциномы яичника, светлоклеточной карциномы яичника, смешанной карциномы яичника Мюллера, эндометриоидной слизеобразующей карциномы яичника, аденокарциномы поджелудочной железы, протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, серозной карциномы матки, аденокарциномы легкого, карциномы внепеченочного желчного протока, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищевода, колоректальной аденокарциномы, аденокарциномы молочной железы, связанного с экспрессией MUC16 заболевания, связанного с экспрессией IL13Rα2 заболевания, связанного с экспрессией MSLN заболевания и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие молекулу TFP, вводят в комбинации с веществом, которое повышает эффективность клетки, экспрессирующей молекулу TFP. В некоторых вариантах осуществления для данного цитокина после лечения высвобождается по меньшей мере на 10% меньше данного цитокина по сравнению с количеством данного цитокина млекопитающего, получившего лечение CAR-T-клеткой, содержащей тот же самый домен антитела. В некоторых вариантах осуществления данный цитокин содержит один или более цитокинов, выбранных из группы, состоящей из IL-2, IFN-γ, IL-4, TNF-α, IL-6, IL-13, IL-5, IL-10, sCD137, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления рост опухоли у млекопитающего подавляется таким образом, что размер опухоли составляет не более 10%, не более 20%, не более 30%, не более 40%, не более 50%, или не более 60% от размера опухоли у млекопитающего, получившего лечение Т-клетками, которые не экспрессируют TFP, после по меньшей мере 8 дней лечения, причем млекопитающее, получившее лечение Т-клетками, экспрессирующими TFP, и млекопитающее, получившее лечение Т-клетками, которые не экспрессируют TFP, имеют одинаковый размер опухоли до начала лечения. В некоторых вариантах осуществления рост опухоли у млекопитающего полностью подавляется. В некоторых вариантах осуществления рост опухоли у млекопитающего полностью подавляется в течение по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 40 дней, по меньшей мере 50 дней, по меньшей мере 60 дней, по меньшей мере 70 дней, по меньшей мере 80 дней, по меньшей мере 90 дней, по меньшей мере 100 дней или более. В некоторых вариантах осуществления популяция Т-клеток, трансдуцированных TFP, уничтожает сходное количество опухолевых клеток по сравнению с CAR-T-клетками, содержащими

аналогичный домен антитела. В некоторых вариантах осуществления популяция Т-клеток, трансдуцированных TFP, имеет отличающийся профиль экспрессии генов от CAR-Т-клеток, содержащих аналогичный домен антитела. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена отличается в Т-клетках, трансдуцированных TFP, от уровня экспресии этого гена в CAR-Т-клетках, содержащих аналогичный домен антитела. В некоторых вариантах осуществления ген выполняет функцию презентации антигена, сигнализации TCR, гомеостаза, метаболизма, хемокиновой сигнализации, цитокиновой сигнализации, toll-подобной рецепторной сигнализации, сигнализации MMP и молекул адгезии или связанной с TNFR сигнализации.

[0019] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий (a) субъединицу TCR, содержащую (i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и (ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон; и (b) домен антитела, содержащий связывающий домен против TAA, причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными, и при этом TFP включается в TCR при экспрессии в Т-клетке.

[0020] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий (a) субъединицу TCR, содержащую (i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и (ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 гамма; и (b) домен антитела, содержащий связывающий домен против TAA, причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными, и при этом TFP включается в TCR при экспрессии в Т-клетке.

[0021] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий (a) субъединицу TCR, содержащую (i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и (ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 дельта; и (b) домен антитела, содержащий связывающий домен против TAA, причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными, и при этом TFP включается в TCR при экспрессии в Т-клетке.

[0022] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного

рецептора (TCR), содержащий (a) субъединицу TCR, содержащую (i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и (ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена TCR альфа; и (b) домен антитела, содержащий связывающий домен против TAA, причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными, и при этом TFP включается в TCR при экспрессии в Т-клетке.

[0023] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий (a) субъединицу TCR, содержащую (i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и (ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена TCR бета; и (b) домен антитела, содержащий связывающий домен против TAA, причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными, и при этом TFP включается в TCR при экспрессии в Т-клетке.

[0024] В некоторых вариантах осуществления домен антитела представляет собой домен человеческого или гуманизированного антитела. В некоторых вариантах осуществления кодируемый антигенсвязывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В некоторых вариантах осуществления кодируемая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления субъединица TCR содержит внеклеточный домен TCR. В некоторых вариантах осуществления субъединица TCR содержит трансмембранный домен TCR. В некоторых вариантах осуществления субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR. В некоторых вариантах осуществления субъединица TCR содержит (i) внеклеточный домен TCR, (ii) трансмембранный домен TCR и (iii) внутриклеточный домен TCR, причем по меньшей мере два из (i), (ii) и (iii) получены из одной и той же субъединицы TCR. В некоторых вариантах осуществления субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен белка, выбранный из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, или их аминокислотную последовательность, имеющую в дополнение по меньшей мере одну модификацию. В некоторых вариантах осуществления субъединица TCR содержит внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен, выбранный из функционального сигнального домена 4-1BB и/или функционального сигнального домена CD3 дзета, или их аминокислотной последовательности, имеющей к тому же по меньшей мере одну модификацию. В некоторых вариантах осуществления домен антитела содержит фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления домен антитела содержит scFv или домен V_H.

[0025] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты кодирует (a) последовательность тяжелой цепи (HC) CDR1 GRTVSSLF, GRAVSSLF или GDSLDGYV, (b) последовательность CDR2 HC ISRYSLYT или ISGDGSMR, и (c) последовательность CDR3 HC ASKLEYTSNDYDS или AADPPTWDY. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты кодирует (a) последовательность тяжелой цепи (HC) CDR1 GFTSDYYI или GFASDDYI, (b) последовательность CDR2 HC ISSKYANT или ISSRYANT, и (c) последовательность CDR3 HC AADTRRYTCPDIATMHRNFDS или AMDSRRVTCPEISTMHRNFDS. В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты кодирует вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:40. В некоторых вариантах осуществления домен антитела представляет собой домен V_{HH}, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:71 или SEQ ID NO:76. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательности определяют с применением алгоритма BLAST с размером слова 6, матрицей BLOSUM62, штрафом за открытие 11 и штрафом за продление 1. В некоторых вариантах осуществления TFP включает в себя внеклеточный домен субъединицы TCR, которая содержит внеклеточный домен или его часть, белка, 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. В некоторых вариантах осуществления кодируемый TFP включает в себя трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен белка, 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. В некоторых вариантах осуществления кодируемый TFP включает в себя трансмембранный домен, который содержит 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.

[0026] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержат последовательность, кодирующую костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен является функциональным сигнальным доменом, полученным из белка, выбранного из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137), а также их аминокислотных последовательностей, имеющих к тому же по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых вариантах осуществления 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 вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой мРНК. В некоторых вариантах осуществления TFP включает в себя иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) субъединицы TCR, которая содержит ITAM или его часть, белка, 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 вариантах осуществления ITAM замещает ITAM CD3 гамма, CD3 дельта или CD3 эпсилон. В некоторых вариантах осуществления 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. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит нуклеотидный аналог. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидный аналог выбран из группы, состоящей из 2'-O-метила, 2'-O-метоксиэтила (2'-O-MOE), 2'-O-аминопропила, 2'-дезокси, T-дезокси-2'-фтора, 2'-O-аминопропила (2'-O-AP), 2'-O-диметиламиноэтила (2'-O-DMAOE), 2'-O-диметиламинопропила (2'-O-DMAP), T-O-

диметиламиноэтилоксиэтила (2’-O-DMAEOE), модифицированного 2’-O-N-метилацетамидо (2’-O-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. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит лидерную последовательность.

[0027] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается рекомбинантная полипептидная молекула, кодируемая рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе.

[0028] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается рекомбинантная молекула TFP, содержащая связывающий домен против TAA (например, связывающий домен MUC16, IL13Ra2 или MSLN), внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR.

[0029] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается рекомбинантная молекула TFP, содержащая связывающий домен против TAA, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR.

[0030] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается рекомбинантная молекула TFP, содержащая связывающий домен против TAA, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональной интеграции в эндогенный комплекс TCR.

[0031] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная молекула TFP содержит антитело или фрагмент антитела, содержащие связывающий домен против MUC16, против IL13Ra2 или против MSLN, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR.

[0032] В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против TAA представляет собой scFv, домен V_{HH} или V_H.

[0033] В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против TAA содержит тяжелую цепь с 95–100% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:40, ее функциональным фрагментом или ее аминокислотной последовательностью, имеющими по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против TAA содержит тяжелую цепь с 95–100%

идентичностью с аминокислотной последовательностью NO:51, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:71, or SEQ ID NO:76, ее функциональным фрагментом или ее аминокислотной последовательностью, имеющими по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций.

[0034] В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательности определяется с применением алгоритма BLAST с размером слова 6, матрицей BLOSUM62, штрафом за открытие 11 и штрафом за продление 1.

[0035] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная молекула TFP содержит внеклеточный домен TCR, который содержит внеклеточный домен или его часть, белка, 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. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против TAA соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В некоторых вариантах осуществления линкерная область содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 4.

[0036] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую TFP.

[0037] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из ДНК и РНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой мРНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит нуклеотидный аналог. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидный аналог выбран из группы, состоящей из 2'-O-метила, 2'-O-метоксиэтила (2'-O-MOE), 2'-O-аминопропила, 2'-дезокси, T-дезокси-2'-фтора, 2'-O-аминопропила (2'-O-AP), 2'-O-диметиламиноэтила (2'-O-DMAOE), 2'-O-диметиламинопропила (2'-O-DMAP), T-O-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-O-DMAEOE), модифицированного 2'-O-N-метилацетамидо (2'-O-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. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, транскрибированную *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую поли(A)-хвост. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота дополнительно содержит

последовательность 3’UTR.

[0038] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP.

[0039] В некоторых вариантах осуществления вектор выбран из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, вектора вируса саркомы Рауса (BCP) или ретровирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вектор дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой транскрибируемый *in vitro* вектор. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность в векторе дополнительно содержит поли(А)-хвост. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит 3’UTR.

[0040] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предлагается клетка, содержащая рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предлагается полипептидная молекула. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предлагается молекула TFP. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предлагается нуклеиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предлагается вектор. В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой CD8+ или CD4+ Т-клетку, или CD4+CD8+ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой Т-клетку гамма-дельта. В других вариантах осуществления клетка дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанной со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая молекула содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть PD1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и первичный сигнальный домен.

[0041] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается человеческая CD8+ или CD4+ Т-клетка, содержащая по меньшей мере две молекулы TFP, при этом молекулы TFP содержат связывающий домен против TAA, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR в человеческой CD8+ или CD4+ Т-клетке, на ней и/или на ее поверхности.

[0042] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается белковый комплекс, содержащий: (a) молекулу TFP, содержащую связывающий домен против TAA, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; и (b) по меньшей мере одну эндогенную субъединицу TCR или один эндогенный комплекс TCR.

[0043] В некоторых вариантах осуществления TCR содержит внеклеточный домен или его часть, белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против TAA соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В некоторых вариантах осуществления линкерная область содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 4.

[0044] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается белковый комплекс, содержащий (a) молекулу TFP, кодируемую любой из рекомбинантных молекул нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, и (b) по меньшей мере одну эндогенную субъединицу TCR или эндогенный комплекс TCR.

[0045] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается белковый комплекс, содержащий: (a) молекулу TFP, содержащую связывающий домен против TAA, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; и (b) по меньшей мере одну эндогенную субъединицу TCR или один эндогенный комплекс TCR.

[0046] В некоторых вариантах осуществления TCR содержит внеклеточный домен или его часть, белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против TAA соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В некоторых вариантах осуществления линкерная область содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 4.

[0047] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается человеческая CD8+ или CD4+ Т-клетка, содержащая по меньшей мере два разных белка TFP на белковый комплекс.

[0048] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается человеческая CD8+ или CD4+ Т-клетка, содержащая по меньшей мере две разные молекулы TFP, кодируемые выделенными молекулами нуклеиновых кислот, описанных в данном документе.

[0049] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается популяция человеческих CD8+ или CD4+ Т-клеток, причем Т-клетки популяции отдельно или в совокупности содержат по меньшей мере две молекулы TFP, при этом молекулы TFP содержат связывающий домен против TAA, внеклеточный домен, трансмембранный домен

и внутриклеточный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR в человеческой CD8+ или CD4+ Т-клетке, на ней и/или на ее поверхности.

[0050] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается популяция человеческих CD8+ или CD4+ Т-клеток, причем Т-клетки популяции отдельно или в совокупности содержат по меньшей мере две молекулы TFP, кодируемые рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе.

[0051] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается способ создания клетки, включающий трансдуцирование Т-клетки рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, нуклеиновой кислотой, описанной в данном документе, или вектором, описанным в данном документе.

[0052] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается способ получения популяции РНК-сконструированных клеток, включающий в себя введение транскрибированной *in vitro* РНК или синтетической РНК в клетку, причем РНК содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу TFP, описанную в данном документе.

[0053] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается способ обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, включающий введение млекопитающему эффективного количества рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, полипептидной молекулы, описанной в данном документе, клеток, экспрессирующих полипептидную молекулу, описанную в данном документе, молекулы TFP, описанной в данном документе, нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, вектора, описанного в данном документе, или клеток, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аутологическую Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аллогенную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой человека.

[0054] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается способ лечения млекопитающего, имеющего заболевание, связанное с экспрессией MUC16, IL13Rα2 или MSLN, включающий введение млекопитающему эффективного количества выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, полипептидной молекулы, описанной в данном документе, клеток, экспрессирующих полипептидную молекулу, молекулы TFP, описанной в данном документе, нуклеиновой кислоты, вектора или клеток, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание, связанное с экспрессией MUC16, IL13Rα2 или MSLN, выбрано из группы, состоящей из пролиферативного

заболевания, рака, злокачественной опухоли, миелодисплазии, миелодиспластического синдрома, предлейкоза, неонкологического показания, связанного с экспрессией MUC16, IL13Rα2 или MSLN. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак поджелудочной железы, рак яичника, рак молочной железы или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие молекулу TFP, вводят в комбинации с веществом, которое повышает эффективность клетки, экспрессирующей молекулу TFP. В некоторых вариантах осуществления у млекопитающего высвобождается меньше цитокинов по сравнению с млекопитающим, которому вводят эффективное количество Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) против TAA. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие молекулу TFP, вводят в комбинации с веществом, которое облегчает один или более побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей молекулу TFP. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие молекулу TFP, вводят в комбинации с веществом, которое лечит заболевание, связанное с TAA, например MUC16, IL13Rα2 или MSLN. В некоторых вариантах полипептидная молекула, клетка, экспрессирующая полипептидную молекулу, рекомбинантная TFP, нуклеиновая кислота, вектор, комплекс, или клетка, применяются для применения в качестве лекарственного средства.

[0055] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, полипептидная молекула TFP, клетка, экспрессирующая полипептидную молекулу TFP, рекомбинантный TFP, нуклеиновая кислота, кодирующая TFP, вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую TFP, белковый комплекс или клетка, для применения в качестве лекарственного средства. Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается способ лечения млекопитающего, имеющего заболевание, связанное с экспрессией MUC16, IL13Rα2 или MSLN, включающий в себя введение млекопитающему эффективного количества рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты, полипептидной молекулы, клеток, экспрессирующих полипептидную молекулу, рекомбинантной молекулы TFP, нуклеиновой кислоты, вектора или клеток, причем у млекопитающего высвобождается меньше цитокинов по сравнению с млекопитающим, которому вводят эффективное количество Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) против TAA.

[0056] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается фармацевтическая композиция, содержащая (I) Т-клетку субъекта-человека, причем Т-клетка содержит рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий (a) субъединицу TCR, содержащую (i) по

меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, (ii) трансмембранный домен TCR и (iii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена; и (b) антигенсвязывающий домен, содержащий связывающий домен против IL13Rα2; и (II) фармацевтически приемлемый носитель, причем субъединица TCR и связывающий домен против IL13Rα2 функционально связаны; при этом TFP функционально взаимодействует с TCR при экспрессии в Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный TCR, трансмембранный TCR и внутриклеточный TCR субъединицы TCR получены из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, CD3 эпсилон, CD3 дельта или CD3 гамма. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR субъединицы TCR получены из одной субъединицы комплекса TCR, причем одна субъединица является альфа-цепью TCR, бета-цепью TCR, гамма-цепью TCR, дельта-цепью TCR, CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка проявляет повышенную цитотоксичность к клетке, экспрессирующей антиген, который специфически взаимодействует со связывающим доменом против IL13Rα2, по сравнению с Т-клеткой, не содержащей TFP.

[0057] Согласно одному аспекту в настоящем документе предлагается способ обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, включающий введение млекопитающему эффективного количества популяции Т-клеток, трансдуцированных рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR, содержащую по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, и внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена TCR; и домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, который является связывающим доменом против мезотелина; причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными, причем TFP включается в TCR при экспрессии в Т-клетке, и при этом популяция Т-клеток преимущественно уничтожает опухолевые клетки с более высокой экспрессией мезотелина по сравнению с опухолевыми клетками с более низкой экспрессией мезотелина.

[0058] В других вариантах осуществления субъединица TCR дополнительно содержит трансмембранный домен TCR. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR получены из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR субъединицы TCR получены

из одной субъединицы комплекса TCR, причем одна субъединица является альфа-цепью TCR, бета-цепью TCR, гамма-цепью TCR, дельта-цепью TCR, CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен TCR получен из CD3 эпсилон или CD3 гамма.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0059] Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в настоящем описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0060] Данный патент или патентная заявка содержат по меньшей мере один графический материал, выполненный в цвете. Копии этого патента или публикации заявки на патент с цветным(-и) графическим(-и) материалом(-ами) будут предоставлены Патентным ведомством по запросу и уплате необходимой пошлины. Новые признаки изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет получено на основе следующего подробного описания, в котором изложены иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы изобретения, и сопроводительных графических материалов, в которых:

[0061] **На Фиг. 1** изображен пример клоновых последовательностей IL13Rα2.

[0062] **На Фиг. 2** представлена диаграмма, иллюстрирующая способ выполнения анализа с сортировка эпитопов Pall Forte Bio Dip & Read AHC. Наконечник биодатчика AHC связывался с антителом scFv-Fc 4H11 (4H11) посредством домена Fc, который затем связывался с антигенным пептидом («Ag», например, MUC16, IL13Ra2, MSLN) посредством своего домена Fv. Затем добавлялся sdAbs (Ab2) к каждому антителу в концентрации 100 нМ для оценки конкуренции за связывание антигена с антителом scFv-Fc 4H11.

[0063] На **Фиг. 3A** изображены данные анализа лизиса опухолевых клеток, изучающего активность *in vitro* нанотел против IL13Rα2.

[0064] **На Фиг. 3B** изображены экспериментальные данные, отображающие возможность TFP Т-клеток индуцировать продукцию IFNγ и IL-2.

[0065] На **Фиг. 3C** изображены экспериментальные данные анализа лизиса опухолевых клеток, изучающего активность *in vitro* нанотел против IL13Rα2.

[0066] **На Фиг. 3D** изображены экспериментальные данные, отображающие возможность TFP Т-клеток индуцировать продукцию IFNγ и IL-2.

[0067] На **Фиг. 3E** изображены экспериментальные данные анализа лизиса опухолевых клеток, изучающего активность *in vitro* нанотел против IL13Rα2.

[0068] **На Фиг. 3F** изображены экспериментальные данные, отображающие возможность TFP Т-клеток индуцировать продукцию IFNγ и IL-2.

[0069] На **Фиг. 4** изображены экспериментальные данные модели IL13Rα2 U251 GBM, изучающей эффективность IL13Rα2-TFP Т-клеток. На графике показаны средние объемы опухолей, измеренные штангенциркулем с течением времени после подкожной инъекции $5x10^6$ клеток U251 мышам NSG с последующей внутривенного введения $1x10^7$ IL13Rα2-TFP Т-клеток через 4 дня.

[0070] На Фиг. **5A-C** показаны результаты титрования и измерения аффинности связывания исходного (лама) и гуманизированного одноцепочечного антитела к MUC16 (V_{HH}). На **Фиг. 5A** представлена диаграмма, иллюстрирующая экспериментальную процедуру, с помощью которой связывающие белки V_{HH}, полученные в примере 5, отсеивают с использованием биодатчика NTA (покрытая никелем поверхность). His-меченные sdAb MUC16 (3,25 мкг/мл) связывают с биодатчиком, и добавляют пептид MUC16 в концентрациях 0; 1,56; 6,25; 25; 50; 100 или 200 нМ. Буфер: 1X Octet; 1x PBS Corning® Cellgro® (кат. 21-040-CM), содержащий 0,02% Tween® 20 при 30 °C. Датчики: Pall Forte Bio Dip & Read (кат. 18-5102). На **Фиг. 5B** (исходные и гуманизированные варианты клона R3Mu4) и Фиг. 5C (исходные и гуманизированные варианты клона R3Mu29) показаны кинетические параметры связывания sdAbs с мишенью MUC16 (см. также таблицу 1). Эти кривые использованы для получения константы аффинности связывания для каждого белка и оценки влияния гуманизации на связывание антигенов.

[0071] **На Фиг. 6A-C** показана сортировка эпитопов sdAb против MUC16 по сравнению с MUC-16 специфическим scFv-Fc действующим связывающим белком 4H11, используемым в качестве положительного контроля. На **Фиг. 6A** представлена диаграмма, иллюстрирующая способ выполнения анализа сортировки эпитопов Pall Forte Bio Dip & Read AHC, показанного на Фиг. 2 для связующих белков IL13Rα2. Наконечник биодатчика AHC связывался с антителом scFv-Fc 4H11 (4H11) посредством домена Fc, который затем связывался с антигенным пептидом MUC16 (Ag) посредством своего домена Fv. Затем добавлялся sdAbs (Ab2) к каждому антителу в концентрации 100 нМ для оценки конкуренции за связывание антигена MUC16 с антителом scFv-Fc 4H11. Как показано на **Фиг. 6B**, sdAb MUC16 — исходное R3Mu4 (лама) и исходное R3Mu29 (лама) показывают связывание с пептидом MUC16 после того, как действующий связывающий белок 4H11 уже связался с ним, демонстрируя тот факт, что исходные sdAb распознают отличающийся эпитоп пептида MUC16 и связываются с ним, в отличие от действующего связывающего

белка scFv-Fc 4H11. Отрицательный контроль без антигена (пептид MUC16) показывает отсутствие связывания, исключая любые возможности неспецифического связывания. На **Фиг. 6C** изображены эпитопы соответствующих антител в контексте последовательности эктодомена MUC16.

[0072] На **Фиг. 7** показаны графики дозозависимого лизиса экспрессирующих MUC16-эктодомен ($MUC16^{ecto}$) клеток Т-клетками, экспрессирующими гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), который содержит субъединицу TCR, и домена антитела, содержащего связывающий домен против MUC16. Т-клетки специфически уничтожали клетки рака яичника SKOV3-MUC16Cterm, которые трансдуцированы на сверхэкспрессию связанной с клетками С-концевой формы MUC16 дозозависимым образом, в то время как исходные MUC16-отрицательные клетки SKOV3 избежали опосредованной Т-клетками гибели. Аналогичным образом, Т-клетки, экспрессирующие MUC16-TFP, удаляли клетки OVCAR3-MUC16-Cterm, сверхэкспрессировавшие клеточноассоциированную форму MUC16. Исходные клетки OVCAR3, экспрессирующие низкие уровни MUC16, уничтожались только при самых высоких соотношениях TFP-Т-клеток к клеткам-мишеням. Аналогичным образом, TFP-Т-клетки высвобождали цитокины только тогда, когда на клетках-мишенях присутствовал MUC16, что подтверждает специфичность однодоменного антитела.

[0073] **На Фиг. 8** изображен пример экспериментальных данных, показывающих активность MUC16-TFP в клеточных анализах с использованием линий клеток яичника, экспрессирующих высокие и низкие уровни MUC16. В этих исследованиях обнаружено, что MUC16-TFP обладали преимущественно приводящими к гибели качествами, зависящими от уровня MUC16 на поверхности опухолевых клеток. Точнее, было обнаружено, что MUC16-TFP приводили к уничтожению опухолевых клеток с высоким уровнем экспрессии MUC16 дозозависимым образом, в то время как уничтожение с помощью MUC16-TFP опухолевых клеток с низким уровнем экспрессии MUC16 не наблюдалось при уровнях доз, используемых в этих анализах.

[0074] На **Фиг. 9A–B** изображены результаты количественного определения проточной цитометрией количества копий $MUC16^{ecto}$. Окрашенные антителом 4H11-PE опухолевые клетки анализировали на приборе Fortessa® X-20 вместе с гранулами Quantibrite. Для клеток, а также для гранул, рассчитывали среднюю геометрическую интенсивность флуоресценции (гСИФ) (**Фиг. 9A**). Набор гранул содержал 4 популяции, изготовленные с разным содержанием молекул PE на гранулу (высокое, умеренное, низкое, отрицательный контроль). На основе заданного количества копий молекул PE на гранулу по сравнению с измеренной СИФ для каждого набора гранул строили стандартную кривую. Затем

оценивали количество копий MUC16^{ecto} на опухолевых клетках по полученной на основе гранул стандартной кривой. Количества копий MUC16^{ecto} на клетках OVCAR3, OVCAR3-MUC16^{ecto}, SKOV3 и SKOV3-MUC16^{ecto} определили как равные, соответственно, 726, 3616, 39 и 2351 (**Фиг. 9B**).

[0075] На **Фиг. 10A-D** показан ряд графиков, показывающих MUC16^{ecto} специфический лизис опухолевых клеток TFP-Т-клетками MUC16. Т-клетки, экспрессирующие TFP MUC16 специфически уничтожали клетки SKOV3-MUC16^{ecto}, которые сверхэкспрессировали клеточноассоциированную форму MUC16 (**Фиг. 10A**), тогда как исходные клетки SKOV3 не уничтожались Т-клетками, экспрессировавшими TFP MUC16 (**Фиг. 10B**). Аналогичным образом, Т-клетки, экспрессировавшие MUC16-TFP, удаляли клетки OVCAR3-MUC16^{ecto}, сверхэкспрессировавшие клеточноассоциированную форму MUC16 (Фиг. 10C). Исходные клетки OVCAR3, экспрессировавшие низкие уровни MUC16^{ecto}, уничтожались только частично (**Фиг. 10D**).

[0076] На **Фиг. 11A-H** показан ряд графиков, показывающих MUC16^{ecto} специфическую продукцию цитокинов TFP-Т-клетками MUC16. Т-клетки, экспрессировавшие TFP MUC16, секретировали IFN-□□и IL-2 при совместном культивировании с клетками SKOV3-MUC16^{ecto} (**Фиг. 11A** и **11E**, соответственно) или клетками OVCAR3-MUC16^{ecto} (**Фиг. 11C** и **11G**, соответственно), но не с клетками SKOV3 (**Фиг. 11B** и **11F**, соответственно) или клетками OVCAR3 (**Фиг. 11D** и **11H**, соответственно).

[0077] На **Фиг. 12** изображена специфическая по MUC16^{ecto} пролиферация Т-клеток, экспрессирующих MUC16-TFP. Специфическая по MUC16^{ecto} пролиферация Т-клетками MUC16-TFP определялась мониторингом разведения сигнала отслеживания Т-клеток (уменьшение по интенсивности сигнала of CellTrace™) анализом проточной цитометрии. Т-клетки, экспрессировавшие MUC16-TFP, метили с помощью набора для определения пролиферации в инфракрасном диапазоне CellTrace™ Far Red Proliferation Kit (№ C34564 по кат. ThermoFisher), затем совместно культивировали с клетками SKOV3 или SKOV3-MUC16^{ecto} в соотношении 1 к 1 в течение 3 дней. Т-клетки, экспрессировавшие MUC16-TFP, меченные с помощью набора для определения пролиферации в инфракрасном диапазоне CellTrace Far Red Proliferation, также стимулировали только с помощью среды или с помощью связанного с планшетом 1 мкг/мл антитела к CD3 (клон OKT-3, № 14-0037-82 по кат., Invitrogen) в течение 3 дней. Т-клетки, экспрессировашие MUC16-TFP, продемонстрировали MUC16^{ecto}-специфическую пролиферацию, что показано по уменьшению сигнала CellTrace при совместном культивировании с клетками SKOV3-MUC16^{ecto}, но не с клетками SKOV3 (Фиг. 12).

[0078] На **Фиг. 13A-C** изображен ряд графиков, показывающих активность *in vivo* Т-

клеток MUC16-TFP. Т-клетки, экспрессировавшие MUC16-TFP, оценивали на моделях с ксенотрансплантатом мышам NSG человеческих линий клеток карциномы яичника, клеток SKOV3-MUC16^{ecto} и клеток OVCAR3-MUC16^{ecto}. На внутрибрюшинной модели с клетками SKOV3-MUC16^{ecto}, MUC16 TFP 1 показали значительное уменьшение опухолевой нагрузки по сравнению с исходным уровнем на день 0 (день инъекции Т-клеток) (**Фиг. 13A**). Закономерно, MUC16 TFP1 существенно замедляли рост опухоли в подкожных моделях клеток SKOV3-MUC16^{ecto} по сравнению с Т-клетками NT (**Фиг. 13B**). На внутрибрюшинной модели клетки OVCAR3-MUC16^{ecto}, MUC16 TFP1 и MUC16 TFP2 полностью удаляли опухоль у мышей (**Фиг. 13C**).

[0079] На **Фиг. 14A–B** представлены два графика, показывающие различную способность Т-клеток MSLN-TFP к уничтожению опухолей с высоким содержанием MSLN (MSTO-MSLNhigh, 11006 копий поверхностного MSLN) и опухолей с низким содержанием MSLN (MSTO-MSLNlow, 198 копий поверхностного MSLN) у мышей NSG, содержащих опухоли либо MSTO-MSLNhigh, либо MSTO-MSLNlow. Содержащим опухоли мышам внутривенно вводили инъекции нетрансдуцированных Т-клеток (NT, 1x10^7 всех Т-клеток) или Т-клеток MSLN-TFP (1x10^7 всех Т-клеток). Т-клетки MSLN-TFP кардинально ограничивали рост опухолей с высоким MSLN по сравнению с мышами, получавшими Т-клетки NT (**Фиг. 14A**). С другой стороны, ограниченная противоопухолевая реакция наблюдалась у получавших Т-клетки MSLN-TFP мышей с опухолями с низким уровнем MSLN (**Фиг. 14B**).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0080] В настоящем документе описаны новые гибридные белки субъединиц TCR, включая CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, а также цепей альфа-TCR и бета-TCR со связывающими доменами, специфическими к антигенам клеточной поверхности, которые могут потенциально преодолевать ограничения существующих подходов.

[0081] В настоящем документе описаны новые гибридные белки, которые по сравнению с CAR более эффективно уничтожают клетки-мишени, однако высвобождают сравнительные или более низкие уровни провоспалительных цитокинов. Эти гибридные белки и способы их использования представляют собой преимущество гибридных белков (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR) относительно CAR, поскольку повышенные уровни таких цитокинов связаны с дозолимитирующей токсичностью адоптивных CAR-T терапий.

[0082] В одном аспекте в настоящем документе описываются выделенные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), который содержит субъединицу TCR и домен антитела, содержащий связывающий домен против опухолеассоциированного антигена (TAA) (например, IL13Ra2, MUC16 или MSLN). В некоторых вариантах осуществления домен антитела представляет собой домен

человеческого или гуманизированного антитела. В некоторых вариантах осуществления субъединица TCR содержит внеклеточный домен TCR. В других вариантах осуществления субъединица TCR содержит трансмембранный домен TCR. В еще одних вариантах осуществления субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR. В дополнительных вариантах осуществления субъединица TCR содержит (i) внеклеточный домен 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. В других дополнительных вариантах осуществления субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен, выбранный из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, или их аминокислотной последовательности, имеющей к тому же по меньшей мере одну, две или три модификации. В других дополнительных вариантах осуществления субъединица TCR содержит внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен, выбранный из функционального сигнального домена 4-1BB и/или функционального сигнального домена CD3 дзета, или их аминокислотной последовательности, имеющей к тому же по меньшей мере одну, две или три модификации.

[0083] В некоторых вариантах осуществления выделенные молекулы нуклеиновой кислоты содержат (i) CDR1 легкой цепи (LC), LC CDR2 и LC CDR3 любой аминокислотной последовательности связывающего домена легкой цепи против TAA, представленной в настоящем документе, и/или (ii) CDR1 тяжелой цепи (HC), CDR2 HC и CDR3 HC любой аминокислотной последовательности связывающего домена тяжелой цепи против TAA, представленной в настоящем документе.

[0084] В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC любого антитела из тяжелой цепи или однодоменного антитела к TAA, представленного в настоящем документе. Например, антитела из тяжелой цепи или однодоменные антитела могут быть обнаружены у животных семейства *Camelidae*. Семейство *Camelidae* (верблюды: одногорбые *Camelus dromedaries* и двугорбые *Camelus bactrianus*; ламы: *Lama glama, Lama guanicoe, Lama vicugna*; альпаки: *Vicugna pacos*), подотряда *Tylopoda*, отряда *Artiodactyla* имеют особый тип антитела в дополнение к классическим антителам в их сыворотке. Эти антитела, называемые антителами из тяжелых цепей (HCAb), уникальны тем, что в них отсутствует вся легкая цепь и первая константная область тяжелой цепи (C_H1). Антитела, подобные верблюжьим антителам из тяжелых цепей (cAb), также были обнаружены у ковровой акулы, акулах-няньках и американского гидролага.

[0085] В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи

содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 30, 20 или 10 модификаций аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, представленной в настоящем документе, или последовательность с 95–99% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной в настоящем документе. В других вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 30, 20 или 10 модификаций аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, представленной в настоящем документе, или последовательность с 95–99% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной в настоящем документе.

[0086] В некоторых вариантах осуществления TFP включает в себя внеклеточный домен субъединицы TCR, которая содержит внеклеточный домен или его часть, белка, выбранного из группы, состоящей из альфа- или бета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3 дельта, CD3 эпсилон или CD3 гамма, или их функциональных фрагментов или аминокислотной последовательности, имеющей к тому же по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций. В других вариантах осуществления кодируемый TFP включает в себя трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета-цепи TCR или субъединиц TCR CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, или их функционального фрагмента, или аминокислотной последовательности, имеющей к тому же по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций.

[0087] В некоторых вариантах осуществления кодируемый TFP включает в себя трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи TCR, или CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, CD45, CD2, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154 и их функционального фрагмента. В некоторых вариантах осуществления кодируемый TFP содержит трансмембранный домен белка, содержащего аминокислотную последовательность к тому же с по меньшей мере одной, двумя или тремя модификациями, но не более 20, 10 или 5 модификациями, причем белок выбран из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи TCR, или CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, CD45, CD2, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, и их функционального фрагмента.

[0088] В некоторых вариантах осуществления кодируемый связывающий домен против TAA соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности.

В некоторых случаях кодируемая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 4. В некоторых случаях кодируемая линкерная последовательность содержит длинную линкерную (ДЛ) последовательность. В некоторых случаях кодируемая длинная линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где n = от 2 до 4. В некоторых случаях кодируемая линкерная последовательность содержит короткую линкерную (КЛ) последовательность. В некоторых вариантах осуществления кодируемая короткая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 3.

[0089] В некоторых вариантах осуществления выделенные молекулы нуклеиновой кислоты дополнительно содержат последовательность, кодирующую костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен является функциональным сигнальным доменом, полученным из белка, выбранного из группы, состоящей из DAP10, DAP12, CD30, LIGHT, OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137), или их аминокислотной последовательности, имеющей к тому же по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций.

[0090] В некоторых вариантах осуществления выделенные молекулы нуклеиновых кислот дополнительно содержат лидерную последовательность.

[0091] Также в настоящем документе предложены выделенные полипептидные молекулы, кодируемые любой из описанных ранее молекул нуклеиновых кислот.

[0092] Также в другом аспекте в настоящем документе предложены выделенные молекулы гибридного белка (TFP) Т-клеточного рецептора, которые содержат связывающий домен против TAA, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR. В некоторых вариантах осуществления выделенные молекулы TFP содержат антитело или фрагмент антитела, содержащие человеческий или гуманизированный связывающий домен против TAA, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против TAA представляет собой человеческий или гуманизированный связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против TAA не является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против TAA содержит верблюжье антитело или его антительный фрагмент.

[0093] В некоторых вариантах осуществления домен антитела содержит фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления домен антитела содержит scFv, однодоменное антитело (sdAb) или домен V_H.

[0094] В некоторых вариантах осуществления домен человеческого или

гуманизированного антитела содержит фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления домен человеческого или гуманизированного антитела содержит scFv, однодоменное антитело (sdAb) или домен V_H.

[0095] В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против TAA представляет собой scFv, однодоменное антитело (sdAb) или домен V_{HH} или V_H. В других вариантах осуществления связывающий домен против TAA содержит легкую цепь и тяжелую цепь аминокислотной последовательности, представленной в настоящем документе, или их функциональный фрагмент, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 30, 20 или 10 модификаций аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, представленного в настоящем документе, или последовательность с 95–99% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной в настоящем документе.

[0096] В некоторых вариантах осуществления выделенные молекулы TFP содержат внеклеточный домен TCR, который содержит внеклеточный домен или его часть, белка, выбранного из группы, состоящей из альфа- или бета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3 дельта, CD3 эпсилон или CD3 гамма, или аминокислотной последовательности, имеющей к тому же по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций.

[0097] В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против TAA соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В некоторых случаях линкерная область содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит длинную линкерную (ДЛ) последовательность. В некоторых случаях кодируемая 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.

[0098] В некоторых вариантах осуществления выделенные молекулы TFP дополнительно содержат последовательность, кодирующую костимулирующий домен. В других вариантах осуществления выделенные молекулы TFP дополнительно содержат последовательность, кодирующую внутриклеточный сигнальный домен. В еще одних вариантах осуществления выделенные молекулы TFP дополнительно содержат лидерную последовательность.

[0099] Также в настоящем документе предложены векторы, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую любую из описанных ранее молекул TFP. В некоторых вариантах осуществления вектор выбран из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды,

лентивирусного вектора, аденовирусного вектора или ретровирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вектор дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой транскрибируемый *in vitro* вектор. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность в векторе дополнительно содержит поли(A)-хвост. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит 3'UTR.

[00100] Также в настоящем документе предложены клетки, которые содержат любой из описанных векторов. В некоторых вариантах осуществления клетка является Т-клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления клетка является CD8+ или CD4+ Т-клеткой. В других вариантах осуществления клетки дополнительно содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанной со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал из внутриклеточного сигнального домена. В некоторых случаях ингибирующая молекула содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть PD1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и первичный сигнальный домен.

[00101] В другом аспекте в настоящем документе предложены выделенные молекулы TFP, которые содержат связывающий домен против TAA, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против TAA представляет собой человеческий или гуманизированный связывающий домен против TAA.

[00102] В другом аспекте в настоящем документе предложены выделенные молекулы TFP, которые содержат связывающий домен против TAA, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональной интеграции в эндогенный комплекс TCR.

[00103] В другом аспекте в настоящем документе предложены человеческие CD8+ или CD4+ Т-клетки, которые содержат по меньшей мере две молекулы TFP, при этом молекулы TFP содержат человеческий или гуманизированный связывающий домен против TAA, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR в человеческой CD8+ или CD4+ Т-клетке, на ней и/или на ее поверхности.

[00104] В другом аспекте в настоящем документе предложены белковые комплексы,

которые содержат i) молекулу TFP, содержащую человеческий или гуманизированный связывающий домен против TAA, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; и ii) по меньшей мере один эндогенный комплекс TCR.

[00105] В некоторых вариантах осуществления TCR содержит внеклеточный домен или его часть, белка, выбранного из группы, состоящей из альфа- или бета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3 дельта, CD3 эпсилон или CD3 гамма. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против TAA соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В некоторых случаях линкерная область содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит длинную линкерную (ДЛ) последовательность. В некоторых вариантах осуществления длинная линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где n = от 2 до 4. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит короткую линкерную (КЛ) последовательность. В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 3.

[00106] Также в настоящем документе предложены человеческие CD8+ или CD4+ Т-клетки, которые содержат по меньшей мере два различных белка TFP на каждый из описанных белковых комплексов.

[00107] В другом аспекте в настоящем документе предлагается популяция человеческих CD8+ или CD4+ Т-клеток, причем Т-клетки популяции отдельно или в совокупности содержат по меньшей мере две молекулы TFP, при этом молекулы TFP содержат человеческий или гуманизированный связывающий домен против TAA, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR в человеческой CD8+ или CD4+ Т-клетке, на ней и/или на ее поверхности.

[00108] В другом аспекте в настоящем документе предлагается популяция человеческих CD8+ или CD4+ Т-клеток, причем Т-клетки популяции отдельно или в совокупности содержат по меньшей мере две молекулы TFP, кодируемые выделенной молекулой нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе.

[00109] В другом аспекте в настоящем документе предложены способы создания клетки, включающие в себя трансдукцию Т-клетки с помощью любого из описанных векторов.

[00110] В другом аспекте в настоящем документе предложены способы получения популяции РНК-сконструированных клеток, включающие в себя введение транскрибированной *in vitro* РНК или синтетической РНК в клетку, причем РНК содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую любую из описанных молекул TFP.

[00111] В другом аспекте в настоящем документе предложены способы обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, включающие в себя введение млекопитающему эффективного количества клеток, экспрессирующих любую из описанных молекул TFP. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аутологическую Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аллогенную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой человека.

[00112] В другом аспекте в настоящем документе предложены способы лечения млекопитающего, имеющего заболевание, связанное с экспрессией опухолеассоциированного антигена (TAA) (например, MUC16, IL13Rα2 или MSLN), включающие в себя введение млекопитающему эффективного количества клеток, содержащих любую из описанных молекул TFP. В некоторых вариантах осуществления заболевание, связанное с TAA (например, MUC16, IL13Rα2 или MSLN), выбрано из пролиферативного заболевания, такого как рак или злокачественная опухоль, либо предракового состояния, такого как рак поджелудочной железы, рак яичника, рак желудка, мезотелиома, рак легкого или рак эндометрия, либо оно представляет собой неонкологическое показание, связанное с экспрессией TAA (например, MUC16, IL13Rα2 или MSLN).

[00113] В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие любую из описанных молекул TFP, вводятся в комбинации с агентом, который облегчает один или более побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей молекулу TFP. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие любую из описанных молекул TFP, вводятся в комбинации с агентом, который лечит заболевание, связанное с TAA (например, MUC16, IL13Rα2 или MSLN).

[00114] Также в настоящем документе для применения в качестве лекарственного средства предложены любые из описанных выделенных молекул нуклеиновых кислот, любые из описанных выделенных полипептидных молекул, любые из описанных выделенных TFP, любые из описанных белковых комплексов, любые из описанных векторов или любые из описанных клеток.

Определения

[00115] Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такое же значение, которое обычно понимается обычным специалистом в области техники, к которой относится изобретение.

[00116] Форма единственного числа используется для обозначения одного или более чем одного (т. е. по меньшей мере одного) грамматического объекта заявки. В качестве примера,

«элемент» означает один элемент или более одного элемента.

[00117] Как используется в настоящем документе, термин «около» 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.

[00118] Как используется в настоящем описании, «субъект», или «субъекты», или «индивиды» могут включать в себя, без ограничений, млекопитающих, таких как люди или млекопитающие, не относящиеся к человеку, *например* одомашненные, сельскохозяйственные или дикие животные, а также птицы и водные животные. «Пациенты» — это субъекты, страдающие от заболевания, нарушения или состояния, подверженные риску их развития либо любым другим образом нуждающиеся в композициях и способах, представленных в настоящем документе.

[00119] Как используется в настоящем документе, термины «лечить» или «лечение» относятся к любому признаку успеха при лечении или облегчении заболевания или 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 состояния и предполагает ряд результатов, направленных для достижения этой цели, включая, помимо прочего, полное предотвращения состояния.

[00120] Как используется в настоящем документе, термин «предотвращение» относится к предотвращению заболевания или 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.

[00121] 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 неприемлемого влияния на индивида, которому вводят эту композицию. Под термином «терапевтически эффективная доза» в настоящем документе понимают дозу, которая обеспечивает один или более желаемых или

желательных (*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 будет установлена специалистом в данной области с использованием известных методик (см., *например* Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1–3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); и Pickar, *Dosage Calculations* (1999))

[00122] Как используется в данном документе, термин «гибридный белок Т-клеточного рецептора (TCR)» или «TFP» включает в себя 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 Т-клетки. «TFP-Т-клетка» представляет собой Т-клетку, которая была трансдуцирована в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, и которая экспрессирует TFP, например включенный в естественный TCR. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку или CD4+/CD8+ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления TFP-Т-клетка представляет собой NK-клетку. В некоторых вариантах осуществления

[00123] Как используется в настоящем документе, термин «MUC16», также известный как муцин 16 или CA125 (раковый антиген 125, карциномный антиген 125 или углеводный антиген 125), относится к белку, который у человека кодируется посредством гена *MUC16*. MUC16 является представителем муцинового семейства гликопротеинов и нашел применение в качестве опухолевого маркера или биомаркера, который может быть повышен в крови некоторых пациентов со специфическими типами раковых заболеваний или других состояний, которые являются доброкачественными. MUC16 используется в качестве биомаркера для выявления рака яичника, и было обнаружено его повышение при других видах рака, включая рак эндометрия, рак фаллопиевой трубы, рак легкого, рак молочной железы и рак желудочно-кишечного тракта. Также было показано, что MUC16 подавляет активность природных клеток-киллеров в иммунном ответе в отношении раковых клеток (см., например Patankar et al., *Gynecologic Oncology* **99**(3); 704–13).

[00124] Как используемый в настоящем документе, термин «IL13Rα2», также известный как кластер дифференцировки 213A2 (CD213A2), относится к мембраносвязанному белку, который у человека кодируется посредством гена *IL13Rα2*. IL13Rα2 представляет собой субъединицу рецепторного комплекса интерлейкина 13 и представляет собой рецептор белка IL13. Было обнаружено, что IL13Rα2 является сверхэкспрессированным в различных

раковых заболеваниях, включая раковые заболевания поджелудочной железы, яичника, меланомы и злокачественные глиомы.

[00125] Как используется в настоящем документе, термин «MSLN» или «мезотелин» относится к гликозилфосфатидилинозит (GPI)-связанному гликопротеину массой 40 кДа клеточной поверхности. Человеческий мезотелиновый белок синтезируется в виде предшественника массой 69 кД, который затем подвергается протеолитическому расщеплению. Секретируется аминоконцевая часть размером 30 кД мезотелина, и она называется потенцирующим фактором мегакариоцитов. (Yamaguchi et al., *J. Biol. Chem.* 269:805 808, 1994). Карбоксиконцевая часть размером 40 кД остается связанной с мембраной в виде зрелого мезотелина (Chang et al., *Natl. Acad. Sci. USA* 93:136 140, 1996; Scholler et al., *Cancer Lett* 247(2007), 130–136). Типичные последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотные последовательности мезотелина также могут определять по обнаруженному генному транскрипту *MSLN* (учетный номер NM_005823 NCBI или учетный номер NM_013404 NCBI. Соответственно, в тех случаях, когда раскрытые в данном документе конъюгатные конструкции характеризуются перекрестной конкуренцией с эталонным антителом к мезотелину или его эпитопу, причем мезотелин такой, как описан в Scholler et al., *Cancer Lett* 247(2007), 130–136.

[00126] Человеческие и мышиные аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот можно найти в общедоступных базах данных, таких как GenBank, UniProt и Swiss-Prot. Например, аминокислотную последовательность человеческого MUC16 можно найти под учетным номером Q8WXI7 UniProt/Swiss-Prot. Нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий MUC16, можно найти под учетным № NM_024690. Нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант X1 транскрипта человеческого MUC16, можно найти под учетным № XM_017027486. Нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант X2 транскрипта человеческого MUC16, можно найти под учетным № XM_017027487. Нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант X3 транскрипта человеческого MUC16, можно найти под учетным № XM_017027488. Нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант X4 транскрипта человеческого MUC16, можно найти под учетным № XM_017027489. Нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант X5 транскрипта человеческого MUC16, можно найти под учетным № XM_017027490. Нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант X6 транскрипта человеческого MUC16, можно найти под учетным № XM_017027491. Нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант X7 транскрипта человеческого MUC16, можно найти под учетным № XM_017027492. Нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант X8 транскрипта человеческого

MUC16, можно найти под учетным № XM_017027493. Нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант X9 транскрипта человеческого MUC16, можно найти под учетным № XM_017027494. Нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант X10 транскрипта человеческого MUC16, можно найти под учетным № XM_017027495. Нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант X11 транскрипта человеческого MUC16, можно найти под учетным № XM_017027499. Нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант X12 транскрипта человеческого MUC16, можно найти под учетным № XM_017027500. Нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант X13 транскрипта человеческого MUC16, можно найти под учетным № XM_017027501. В одном примере антигенсвязывающая часть TFP распознает и связывает эпитоп в пределах внеклеточного домена белка MUC16 при экспрессии на глиомной клетке, глиома-инициирующей клетке, нормальной или злокачественной клетке мезотелиомы, раковой клетке яичника, клетке аденокарциномы поджелудочной железы или клетке плоскоклеточной карциномы.

[00127] Аминокислотную последовательность человеческого IL13Rα2 можно найти под учетным № Q14627 UniProt/Swiss-Prot. Нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий IL13Rα2, можно найти под учетным № NM_000640. Нуклеотидную последовательность, кодирующую предшественника человеческого IL13Rα2, можно найти под учетным № NP_000631. В одном примере антигенсвязывающая часть TFP распознает и связывает эпитоп в пределах внеклеточного домена белка IL13Rα2 при экспрессии на глиомной клетке, глиомной инициирующей клетке, нормальной или злокачественной клетке мезотелиомы, раковой клетке яичника, клетке аденокарциномы поджелудочной железы или клетке плоскоклеточной карциномы.

[00128] Как используется в настоящем документе, термин «антитело» относится к белку 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 природных или рекомбинантных источников.

[00129] Термины «фрагмент антитела» или «связывающий домен антитела» относятся к по меньшей мере одной части антитела или ее рекомбинантным вариантам, которые содержат антигенсвязывающий домен, т. е. антигенный определяющий вариабельную область интактного антитела, которой 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'-, $F(ab')_2$- и Fv-фрагменты, одноцепочечные (sc) Fv-фрагменты антител («scFv»),

линейные антитела, однодоменные антитела (сокращенно «sdAb») (V_L либо V_H), верблюжьи домены V_{HH} и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[00130] Термин «scFv» относится к гибридному белку, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий вариабельную область легкой цепи, и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, причем вариабельные области легкой и тяжелой цепи последовательно соединены посредством короткого гибкого полипептидного линкера и способны экспрессироваться как одна полипептидная цепь, и при этом scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он был получен.

[00131] «Вариабельная область тяжелой цепи» или «V_H» (или в случае однодоменных антител, например нанотел, — «V_{HH}») в отношении антитела относится к фрагменту тяжелой цепи, который содержит три CDR, размещенных между фланкирующими областями, известными как каркасные области, эти каркасные области, как правило, в большей степени высококонсервативные, чем CDR, и образуют каркас для поддержки CDR.

[00132] Как используется в настоящем документе, если не указано иное, scFv может иметь вариабельные области V_L и V_H в любом порядке, *например* по отношению к N-терминальным или C-терминальным концам полипептида scFv может содержать V_L-линкер-V_H или V_H-линкер-V_L.

[00133] Часть композиции TFP по настоящему изобретению, состоящая антитело или его фрагмент антитела, может существовать в различных формах, в которых антигенсвязывающий домен экспрессируется как часть последовательной полипептидной цепи, включающей в себя, например, фрагмент однодоменного антитела (sdAb) или антитела из тяжелых цепей HCAb, одноцепочечные антитела (scFv), полученные из мышиного, гуманизированного или человеческого антитела (Harlow et al., 1999, B: 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 настоящего изобретения содержит фрагмент антитела. В дополнительном аспекте TFP содержит фрагмент антитела, который содержит scFv или sdAb.

[00134] Термин «тяжелая цепь антитела» относится к большей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях, и которая обычно определяет класс, к которому принадлежит антитело.

[00135] Термин «легкая цепь антитела» относится к меньшей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях. Легкие цепи каппа («κ») и лямбда («λ») относятся к двум основным изотипам легких цепей антитела.

[00136] Термин «рекомбинантное антитело» относится к антителу, которое получают с применением технологии рекомбинантной ДНК, такому как, например, антитело, экспрессируемое бактериофагом или системой экспрессии дрожжей. Термин также следует воспринимать как обозначающий антитело, которое было получено путем синтеза молекулы ДНК, кодирующей антитело, и при этом молекула ДНК экспрессирует белок антитела, или аминокислотной последовательности, определяющей 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.

[00137] Термин «антиген» или «Ag» 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 иммуно-компетентных клеток, или и то, и другое.

[00138] 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 ткани, образец опухоли, клетку или жидкость с другими

биологическими компонентами.

[00139] 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 со злокачественным состоянием. «Противоопухолевый эффект» также может проявляться в способности пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител по настоящему изобретению в первую очередь предотвращать появление опухоли.

[00140] Термин «аутологический» относится к любому материалу, полученному от того же индивида, которому впоследствии он будет вводиться.

[00141] Термин «аллогенный» относится к любому материалу, полученному от другого животного того же вида или другого пациента, отличных от того индивида, которому будет вводиться материал. Говорят, что два или более индивида являются аллогенными друг к другу, когда гены в одном или более локусах не идентичны. В некоторых аспектах аллогенный материал индивидов одного и того же вида может быть достаточно генетически отличным для антигенного взаимодействия.

[00142] Термин «ксеногенный» относится к трансплантату, полученному от животного другого вида.

[00143] Термин «рак» относится к заболеванию, которое характеризуется быстрым и неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Раковые клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части тела. Примеры различных раковых заболеваний описаны в настоящем документе, к ним относится, помимо прочего, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почки, рак печени, рак головного мозга, рак легкого и т. п.

[00144] Фраза «заболевание, связанное с экспрессией» MUC16, IL13Rα2 или MSLN, включает в себя, помимо прочего, заболевание, связанное с экспрессией MUC16, IL13Rα2 или MSLN, или состояние, связанное с клетками, которые экспрессируют MUC16, IL13Rα2 или MSLN, включая, *например*, пролиферативные заболевания, такие как рак, или злокачественная опухоль, или предраковое состояние. В одном аспекте рак представляет собой глиобластому. В одном аспекте рак представляет собой мезотелиому. В одном аспекте рак представляет собой рак поджелудочной железы. В одном аспекте рак представляет собой рак яичника. В одном аспекте рак представляет собой рак головного

мозга. В одном аспекте рак представляет собой рак желудка. В одном аспекте рак представляет собой рак легкого. В одном аспекте рак представляет собой рак эндометрия. К неонкологическим показаниям, связанным с экспрессией MUC16, IL13Rα2 или MSLN, относится, помимо прочего, *например*, аутоиммунное заболевание (*например*, волчанка, ревматоидный артрит, колит), воспалительные заболевания (аллергия и астма) и трансплантация.

[00145] Термин «консервативные модификации в последовательностях» относится к аминокислотным модификациям, которые существенно не влияют или не изменяют характеристики связывания антитела или фрагмента антитела, содержащего такую 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 методик, 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 аминокислоты с основными боковыми цепями (*например*, лизин, аргинин, гистидин), кислотными 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 TFP по настоящему изобретению могут быть замещены другими аминокислотными остатками из одного и того же семейства боковых цепей, а измененный TFP может быть протестирован с помощью функциональных анализов, описанных в настоящем документе.

[00146] Термин «стимуляция» относится к первичному ответу, индуцированному связыванием стимулирующего домена или стимулирующей молекулы (*например*, комплекс TCR/CD3) с их когнатным 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.

[00147] Термин «стимулирующая молекула» или «стимулирующий домен» относится к

молекуле или ее части, экспрессируемой Т-клеткой, которая обеспечивает первичную(-ые) цитоплазматическую(-ие) сигнальную(-ые) последовательность(-и) , которая(-ые) регулирует(-ют) первичную активацию комплекса TCR стимулирующим путем для по меньшей мере некоторого аспекта сигнального пути Т-клетки. В одном аспекте первичный сигнал инициируется посредством, например, связывания комплекса TCR/CD3 с молекулой MHC, нагруженной пептидом, что приводит к опосредованию Т-клеточного ответа, включая, помимо прочего, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т. п. Первичной цитоплазматическая сигнальная последовательность (также называемая «первичный сигнальный домен»), которая действует стимулирующим путем, может содержать сигнальный мотив, который известен как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или «ITAM». К примерам первичной цитоплазматической сигнальной последовательности, содержащей ITAM, для конкретного применения в настоящем изобретении относятся, помимо прочего, производные от TCR дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также известный как «ICOS») и CD66d.

[00148] Термин «антигенпрезентирующая клетка» или «APC» относится к клетке иммунной системы, такой как вспомогательная клетка (*например*, В-клетка, дендритная клетка и т. п.), которая демонстрирует на своей поверхности чужеродный антиген, образующий комплекс с белками главного комплекса гистосовместимости (MHC). Т-клетки могут распознавать эти комплексы с помощью своих Т-клеточных рецепторов (TCR). APC расщепляют антигены и представляют их Т-клеткам.

[00149] 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 TFP, *например* модифицированной TFP-Т-клетки. К примерам иммунной эффекторной функции, *например* в TFP-экспрессирующей Т-клетке, относится цитолитическая активность и активность хелперных Т-клеток, включая секрецию цитокинов. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать первичный внутриклеточный сигнальный домен. К примерам первичных внутриклеточных сигнальных доменов относятся домены, полученные от молекул, которые отвечают за первичную стимуляцию или антигензависимую стимуляцию. 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 независимую от антигенов стимуляцию.

[00150] Первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать ITAM («иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив»). К примерам первичных цитоплазматических сигнальных последовательностей, содержащих ITAM, 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.

[00151] Термин «костимулирующая молекула» относится к когнатному партнеру связывания 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 могут быть необходимы для эффективного иммунного ответа. Костимулирующие молекулы включаю в себя, помимо прочего, молекулу MHC класса 1, BTLA и рецептор Толл-лигандов, а также DAP10, DAP12, CD30, LIGHT, 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: белки рецепторов TNF, иммуноглобулиноподобные белки, рецепторы цитокинов, интегрины, сигнальные молекулы лимфоцитарной активации (белки SLAM) и активирующие рецепторы NK-клеток. К примерам подобных молекул относятся CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, связанный с функционированием 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 представителю суперсемейства TNFR с аминокислотной последовательностью, представленной учетн. № AAA62478.2 GenBank, или эквивалентными остатками из не относящихся к человеку видов, *например* мыши, грызуна, обезьяны, примата и т. п.; а «костимулирующий домен 4-1BB» определен аминокислотными остатками 214–255 учетн. № AAA62478.2 GenBank, или эквивалентными остатками из не относящихся к человеку видов, *например* мыши, грызуна, обезьяны, примата и т. п.

[00152] 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.

[00153] 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.

[00154] 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.

[00155] Термин «эндогенный» относится к любому материалу, полученному от организма, клетки, ткани или системы либо произведенному внутри них.

[00156] Термин «экзогенный» относится к любому материалу, введенному извне организма, клетки, ткани или системы либо произведенному за их пределами.

[00157] Термин «экспрессия» относится к транскрипции и/или трансляции конкретной нуклеотидной последовательности, управляемой промотором.

[00158] 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 переноса» включает в себя способные 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,

полилизиновое соединение, липосома и т. п. К примерам вирусных векторов переноса относятся, помимо прочего, аденовирусные векторы, векторы адено-ассоциированных вирусов, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и т. п.

[00159] Термин «вектор экспрессии» относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, содержащий регулирующие экспрессию последовательности, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, которая подлежит экспрессии. Вектор экспрессии содержит достаточно цис-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут предоставляться 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 адено-ассоциированные вирусы), которые содержат рекомбинантный полинуклеотид.

[00160] 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 одними из наиболее эффективных способов векторной доставки генов. Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус иммунодефицита обезьян (SIV), вирус кошачьего иммунодефицита (FIV) являются примерами лентивирусов.

[00161] Термин «лентивирусный вектор» относится к вектору, полученному по меньшей мере из части генома лентивируса, включая, в частности, самоактивирующийся лентивирусный вектор, как представлено в Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453–1464 (2009). Другие примеры лентивирусных векторов, которые могут использоваться в клинической практике, включают в себя, помимо прочего, *например*, технологию доставки генов LENTIVECTOR™ от Oxford BioMedica, векторную систему LENTIMAX™ от Lentigen и т. п. Неклинические типы лентивирусных векторов также доступны и известны специалисту в данной области техники.

[00162] 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 из двух молекул занимает одна и та же мономерная субъединица, *например*, если положение в каждой из двух молекул ДНК занимает аденин, то 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.

[00163] «Гуманизированные» формы антител нечеловеческого происхождения (*например*, мышиные) представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ или другие антигенсвязывающие подпоследовательности 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 комплементарность области (CDR) реципиента замещены остатками CDR видов, не относящихся к человеку (антитело-донор), таких как мышь, крыса или кролик, обладающими желаемой специфичностью, аффинностью и эффективностью. В некоторых случаях остатки Fv 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 вариабельных 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 (Fc) иммуноглобулина, как правило, из иммуноглобулина человека. Дополнительную информацию, 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.

[00164] Термин «человеческий» или «полностью человеческий» относится к иммуноглобулину, такому как антитело или фрагмент антитела, когда вся молекула имеет человеческое происхождение или состоит из аминокислотной последовательности, идентичной человеческой форме антитела или иммуноглобулина.

[00165] 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.

[00166] В контексте настоящего изобретения для часто встречающихся оснований нуклеиновых кислот используются следующие сокращения. «A» относится к аденозину, «C» относится к цитозину, «G» относится к гуанозину, «T» относится к тимидину, а «U» относится к уридину.

[00167] Термин «функционально связанный» 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 связанной со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты попадает в функциональную взаимосвязь со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Функционально связанные последовательности ДНК могут быть смежными друг с другом и, *например*, если необходимо, соединять две кодирующие белок области, находиться в одной и той же рамке считывания.

[00168] 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.

[00169] 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 в себя их консервативно модифицированные варианты (*например,* вырожденные замещения кодонов), аллели, ортологи, ОНП (однонуклеотидные полиморфизмы) и комплементарные последовательности, а также

последовательность, указанную явно. В частности, вырожденные замены кодонов могут достигать путем создания последовательностей, в которых третья позиция одного или более выбранных (или всех) кодонов заменяется остатками со смешанными основаниями и/или дезоксиинозином (Batzer 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)).

[00170] 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 может содержать последовательность белка или пептида. Полипептиды включают в себя любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Как используется в настоящем документе, этот термин относится как к коротким цепям, которые в данной области техники также обычно называются, например, пептидами, олигопептидами и олигомерами, 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, гибридные белки, среди прочих. Полипептид включает в себя природный пептид, рекомбинантный пептид или их комбинацию.

[00171] Термин «промотор» относится к последовательности ДНК, распознаваемой транскрипционным механизмом клетки или введенным синтетическим механизмом, который может инициировать специфическую транскрипцию полинуклеотидной последовательности.

[00172] Термин «промотор/регуляторная последовательность» относится к последовательности нуклеиновых кислот, которая может быть использована для экспрессии гена, функционально связанного с промотором/регуляторной последовательностью. В некоторых случаях эта последовательность может являться коровой промоторной последовательностью, 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.

[00173] Термин «конститутивный» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, если она функционально связана с полинуклеотидом,

кодирующим или определяющим продукт гена, вызывает выработку продукта гена в клетке при большинстве или всех физиологических условиях клетки.

[00174] Термин «индуцибельный» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, если она функционально связана 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.

[00175] Термин «тканеспецифический» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, если она функционально связана 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.

[00176] 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 является линкером Gly/Ser и содержит аминокислотную последовательность $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_n$, где n представляет собой положительное целое число равное 1 или большее. 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 гибкие полипептидные линкеры включают в себя, помимо прочего, $(Gly_4Ser)_4$ или $(Gly_4Ser)_3$. В другом варианте осуществления линкеры включают в себя множество повторов (Gly_2Ser), (GlySer) или (Gly_3Ser). 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 вариантах осуществления длинная линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где n = от 2 до 4. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит короткую линкерную (КЛ) последовательность. В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 3.

[00177] Как используется в настоящем документе, 5'-кэп (также называемый кэп РНК, 7-метилгуанозиновый кэп РНК или m7G кэп РНК) 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 сотранскрипционно 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 ферментативный комплекс катализирует химические реакции, которые могут потребоваться для кэппирования мРНК. Синтез протекает как многоступенчатая биохимическая реакция. Кэпирующий фрагмент может быть модифицирован для модуляции функциональности мРНК, такой как ее стабильность или эффективность трансляции.

[00178] 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 создания транскрибированной *in vitro* РНК.

[00179] Как используется в настоящем документе, «поли(А)» представляет собой ряд аденозинов, присоединенных к мРНК путем полиаденилирования. В предпочтительном варианте осуществления конструкции для временной экспрессии полиА составляет размер 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.

[00180] 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 добавляется к транскриптам, содержащим определенную последовательность — сигнал полиаденилирования. Поли(А)-хвост и связанный с ним белок помогают защитить 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 под действием эндонуклеазного комплекса, связанного с РНК-полимеразой. Сайт расщепления, как правило,

характеризуется присутствием последовательности оснований AAUAAA возле сайта расщепления. После расщепления мРНК аденозиновые остатки добавляют к свободному 3'-концу на сайте расщепления.

[00181] 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.

[00182] 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.

[00183] Термин «субъект» предназначен для включения в себя живых организмов, у которых может быть вызван иммунный ответ (*например*, млекопитающие, человек).

[00184] 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*.

[00185] Как используется в настоящем документе, термин «терапевтический» означает лечение. Терапевтический эффект достигается путем уменьшения, подавления, ремиссии или устранения болезненного состояния.

[00186] Как используется в настоящем документе, термин «профилактика» означает предотвращение заболевания или болезненного состояния либо их профилактическое лечение.

[00187] В контексте настоящего изобретения «опухолевый антиген», или «антиген гиперпролиферативного нарушения», или «антиген, связанный с гиперпролиферативным нарушением» относится к антигенам, которые характерны для конкретных гиперпролиферативных нарушений. В некоторых аспектах антигены гиперпролиферативного нарушения по настоящему изобретению походят из раковых заболеваний, включая рак, помимо прочего, первичную или метастатическую меланому,

глиобластому, мезотелиому, почечно-клеточную карциному, рак желудка, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника, рак предстательной железы, рак толстой кишки, рак шейки матки, рак головного мозга, рак печени, рак поджелудочной железы, рак почки, рак эндометрия и рак желудка.

[00188] В некоторых случаях заболевание представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из мезотелиомы, глиобластомы, папиллярной серозной аденокарциномы яичника, светлоклеточной карциномы яичника, смешанной карциномы яичника Мюллера, эндометриоидной слизеобразующей карциномы яичника, злокачественного плеврального заболевания, аденокарциномы поджелудочной железы, протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, серозной карциномы матки, аденокарциномы легкого, карциномы внепеченочного желчного протока, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищевода, колоректальной аденокарциномы, аденокарциномы молочной железы, связанного с экспрессией MUC16, IL13Rα2, MSLN заболевания и любой их комбинации.

[00189] 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 трасфицирована, трансформирована или трансдуцирована с помощью экзогенной нуклеиновой кислоты. Клетка включает в себя первичную клетку субъекта и свое потомство.

[00190] Термин «специфически связывает» относится к антителу, фрагменту антитела или специфическому лиганду, которые распознают и связывают партнера когнатного связывания (*например*, MUC16, IL13Rα2 или MSLN), присутствующего в образце, но который не обязательно и не существенно распознают или связывают другие молекулы в образце.

[00191] Диапазоны: во всем этом описании различные аспекты настоящего изобретения могут быть представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона предназначено только для удобства и краткости и не должно толковаться 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 имеющим специально раскрытые 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. д., а также отдельные номера в пределах этого диапазона, например 1; 2; 2,7; 3; 4; 5; 5,3 и 6. В качестве еще одного примера, такой диапазон, как 95–99% идентичности,

который включает что-либо с 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности и включает поддиапазоны, такие как 96–99%, 96–98%, 96–97%, 97–99%, 97–98% и 98–99% идентичности. Этот принцип применяется независимо от ширины диапазона.

ОПИСАНИЕ

[00192] В настоящем документе предложены композиции веществ и способы использования для лечения такого заболевания, как рак, с использованием гибридных белков Т-клеточных рецепторов (TCR). Как используется в данном документе, термин «гибридный белок Т-клеточного рецептора (TCR)» или «TFP» включает в себя 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 Т-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 цитоплазматические сигнальные домены (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 функциональными сигнальными доменами, полученными из по меньшей мере одной костимулирующей молекулы, такой как 4-1BB (т. е., CD137), CD27 и/или CD28.

MUC16

[00193] MUC16 представляет собой опухолеассоциированный антигенный полипептид, экспрессируемый поверхностным эпителием глаза человека, в слизистой оболочке бронха, фаллопиевой трубы и матки. Одной предлагаемой функцией MUC16 может быть обеспечение защитного, смазывающего барьера от частиц и инфекционных агентов на поверхности слизистых оболочках. Сильно полиморфный MUC16 состоит из трех доменов, N-концевого богатого Ser/Thr домена, домена повторов от одиннадцати до более чем 60 частично консервированных тандемных повторов, содержащих в среднем 156 аминокислот каждый, и С-концевого неповторяющегося домена, содержащего трансмембранную последовательность и короткий цитоплазматический хвост. MUC16 может быть сильно О-гликозилированным и N-гликозилированным. мРНК, кодирующая полипептид MUC16,

экспрессированный из гена MUC16, может быть достоверно, воспроизводимо и выявляемо сверхэкспрессирована в некоторых типах раковых опухолей яичника, молочной железы и поджелудочной железы человека по сравнению с соответствующими нормальными человеческими тканями яичника, молочной железы и поджелудочной железы соответственно. Для множества независимых и различных типов образцов раковых тканей яичника человека, количественно проанализированных на экспрессию MUC16, показано, что уровень экспрессии MUC16 в раковых образцах может быть переменным, при этом значительное количество раковых образцов показывает увеличение экспрессии MUC16 по меньшей мере в 6 раз (примерно в 580 раз) по сравнению со средним уровнем экспрессии MUC16 для группы проанализированных образцов нормальных тканей яичника. В частности, может наблюдаться выявляемая и воспроизводимая сверхэкспрессия MUC16 при разных типах рака яичника, эндометриоидной аденокарциноме, серозной цистаденокарциноме, в том числе при папиллярной и светлоклеточной аденокарциноме по сравнению с нормальной тканью яичника. Благодаря своей сверхэкспрессии в некоторых опухолях человека, полипептид MUC16 и нуклеиновая кислота, кодирующая этот полипептид, являются мишенями для количественных и качественных сравнений между различными образцами тканей млекопитающих. Профили экспрессии полипептида MUC16 и нуклеиновая кислота, кодирующая этот полипептид, могут использовать для диагностики и терапевтического лечения некоторых типов раковых опухолей у млекопитающих.

[00194] CA125 (карциномный антиген 125 (O772P, CA-O772P, CA-125) представляет собой внеклеточный выделяемый белок, кодируемый геном MUC16, и сывороточный маркер, традиционно используемый для наблюдения за пациентами с раком яичника. CA125 является антигеном дифференцировки мюллеровых протоков, который сверхэкспрессируется в раковых клетках эпителия яичника и секретируется в кровь, хотя его экспрессия может быть не полностью определяться раком яичника. Уровни CA125 в сыворотке крови могут быть повышены примерно у 80% пациентов с эпителиальным раком яичника (ЭРЯ), но менее чем у 1% здоровых женщин. CA125 представляет собой гигантский муциноподобный гликопротеин, присутствующий на клеточной поверхности опухолевых клеток и связанный со связывающими бета-галактозиды лектинами клеточной поверхности, которые могут быть компонентами внеклеточного матрикса, вовлеченного в регуляцию адгезии клеток, апоптоза, пролиферации клеток и прогрессирования опухолей. Высокая сывороточная концентрация CA125 может быть типичной для серозной аденокарциномы яичника, в то время как при раке слизистой оболочки яичника она не повышается. CA125 не может рекомендоваться для скрининга на рак яичника, поскольку нормальный уровень может не исключать наличие опухоли. Тем не менее, обнаружение

CA125 может быть стандартным инструментом при мониторинге клинического течения и состояния болезни у пациентов с гистологически подтвержденными злокачественными опухолями. Многочисленные исследования подтвердили пригодность уровней CA125 в мониторинге прогрессирования пациентов с ЭРЯ, а также в качестве онкологического сывороточного маркера. Повышение уровней CA125 обычно может предшествовать клиническому обнаружению примерно на 3 месяца. Во время химиотерапии изменения уровней CA125 в сыворотке могут коррелировать с течением заболевания. CA125 может использоваться в качестве суррогатного маркера для определения клинической реакции при испытании новых лекарственных средств. С другой стороны, CA125 может не подходить для первичной диагностике ЭРЯ из-за его повышения при ряде доброкачественных состояний. Специфическое к CA125 антитело MAb-B43.13 (ореговомаб, OvaRex MAb-B43.13) проходило клинические испытания для пациентов с карциномой яичника в качестве иммунотерапевтического средства.

[00195] MUC16 (CA-125) может принимать участие в развитии онкогенеза и пролиферации опухолей по нескольким различным механизмам. Одним способом, с помощью которого MUC16 помогает росту опухолей, может быть супрессирование реакции естественных клеток-киллеров, тем самым защищая раковые клетки от иммунного ответа. Дополнительным доказательством того, что MUC16 может защищать опухолевые клетки от иммунной системы, может быть открытие того, что сильно гликозилированный тандемный домен MUC16 с повторами может связываться с галектином-1 (иммуносупрессивным белком). MUC16 может участвовать во взаимодействиях между клетками, что обеспечивает метастазы опухолевых клеток. Это может подтверждаться доказательством, которое демонстрирует, что MUC16 может избирательно связываться с мезотелином — гликопротеином, нормально экспрессируемым мезотелиальными клетками брюшины (слизистая брюшной полости). Взаимодействия MUC16 и мезотелина может обеспечивать первый этап инвазии опухолевых клеток брюшины. Установлено, что мезотелин также экспрессируется при нескольких типах раковых заболеваний, включая мезотелиому, рак яичника и плоскоклеточную карциному. Поскольку мезотелин также экспрессируется опухолевыми клетками, MUC16 и мезотелиальные взаимодействия могут помочь в накоплении других опухолевых клеток в месте образования метастазов, тем самым увеличивая размер метастазов. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что экспрессия цитоплазматического хвоста MUC16 может способствовать росту опухолевых клеток, стимулировать подвижность клеток и может облегчать инвазию. Это, по-видимому, связано со способностью С-концевого домена MUC16 облегчать сигнализацию, которая приводит к снижению экспрессии Е-кадгерина и увеличению экспрессии N-кадгерина и

виментина, что может быть паттернами экспрессии, согласующимися с эпителиально-мезенхимальным переходом. MUC16 может также играть роль в снижении чувствительности раковых клеток к медикаментозной терапии. Например, сверхэкспрессия MUC16 может защищать клетки от воздействия генотоксических препаратов, таких как цисплатин.

IL13Rα2

[00196] Интерлейкин-13 является иммунным регулятором микроокружения во время иммунной реакции при нормальных физиологических условиях, а также при раковых заболеваниях. IL-13 связывается с двумя различными рецепторами IL13Rα1 и IL13Rα2. В большинстве клеток IL-13 связывается с мономером рецептора IL13Rα1 с низкой аффинностью и связывает IL4Ra с образованием гетеродимерного комплекса, приводящего к активации последующего механизма сигнального трансдуктора и активатора транскрипции (STAT)6. IL-13 связывается с рецептором IL13Rα2 в некоторых нормальных клетках, таких как клетки яичек, но он также связывает с высокой аффинностью рецептор IL13Rα2 в раковых клетках.

[00197] Транскрипт РНК гена IL13Rα2, расположенный в хромосоме Xq13.1-q28, кодирует белок из 380 аминокислот, включающий в себя сигнальную последовательность из 26 аминокислот и короткий внутриклеточный домен из 17 аминокислот. В клетке глиобластомы IL13Rα2 экспрессирует до 30 000 сайтов связывания для белка IL-13.

[00198] Одной предложенной функцией IL13Rα2 является рецептор-приманка, который приводит к изоляции IL-13 от IL13Rα1. Поскольку IL13Rα2 связывает доступные IL-13 с более высокой аффинностью и обеспечивает большее количество сайтов связывания по сравнению с IL13Rα1, изоляция IL-13 стимулируется в клетках. В нормальных клетках связывание IL-13 с IL13Rα1 активизирует STAT6, который транслоцируется в ядро, где осуществляет транскрипционный контроль над генами, содержащими N6-специфический промотор остановки роста, например 15-липооксигеназу-1. Это может приводить к апоптозу из-за повышения активности каспазы-3. Таким образом, изоляция IL-13 может быть механизмом избегания опухолевыми клетками апоптоза. Другой предлагаемой функцией IL13Rα2 является блокировка IL13Rα1 посредством IL13Rα2 путем физической блокировки соединения STST6 с этим рецептором. Отсутствие соединения STAT6 препятствует последующей активации апоптоза. IL13Rα2 также индуцирует повышенную регуляцию STAT3 и белка 2 В-клеточной лимфомы в клетках глиомы.

[00199] IL13Rα2 экспрессируется на глиома-инициирующих клетках и экспрессируется в около 58% опухолей головного мозга взрослых и около 83% детей. При раковых заболеваниях яичника и поджелудочной железы он способствует инвазии и

метастазированию посредством механизма внеклеточной сигналрегулирующей киназы/активаторного белка 1. Экспрессия IL13Rα2 в иммунных клетках, например в миелоидных клетках-супрессорах, также способствует избеганию иммунного ответа и прогрессированию опухолей через повышение регуляции трансформирующего фактора роста β. Повышенная экспрессия IL13Rα2 может способствовать прогрессированию опухолей в глиомных и других опухолевых моделях. Экспрессия IL13Rα2 увеличивается со степенью злокачественности глиомы и, таким образом, может служить прогностическим показателем выживаемости пациента. Профили экспрессии полипептида IL13Rα2 и нуклеиновой кислоты, кодирующей этот полипептид, могут использовать для диагностики и терапевтического лечения некоторых видов злокачественных опухолей у млекопитающих.

Гибридные белки (TFP) Т-клеточных рецепторов (TCR)

[00200] Настоящее описание охватывает рекомбинантные конструкции ДНК, кодирующие TFP, в которых TFP содержит фрагмент антитела, который специфически связывается с MUC16, IL13Rα2 или MSLN, *например* с MUC16, IL13Rα2 или MSLN человека, причем последовательность фрагмента антитела примыкает и находится в той же рамке считывания, что и последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая субъединицу TCR или ее часть. TFP, представленные в настоящем документе, способны связываться с одной или более эндогенных (или альтернативно, с одной или более экзогенных или с комбинацией эндогенных и экзогенных) субъединиц TCR с целью образования функционального комплекса TCR.

[00201] В одном аспекте TFP по настоящему описанию, содержит из специфический по мишени связующий элемент, который иначе называется 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 TFP по настоящему изобретению, включают в себя маркеры, связанные с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями; аутоиммунными заболеваниями и раковыми заболеваниями (*например*, злокачественными заболеваниями).

[00202] В одном аспекте TFP-опосредованный Т-клеточный ответ может быть направлен на представляющий интерес антиген путем встраивания антигенсвязывающего домена в TFP, который специфически связывается с желаемым антигеном.

[00203] В одном аспекте часть TFP, содержащая антигенсвязывающий домен, содержит антигенсвязывающий домен, который нацелен на MUC16, IL13Rα2 или MSLN. В одном аспекте антигенсвязывающий домен нацелен на MUC16, IL13Rα2 или MSLN человека.

[00204] 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 вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), вариабельный домен легкой цепи (V_L) и вариабельный 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 TFP. В некоторых случаях полезно, чтобы антигенсвязывающий домен был получен из того же вида, в котором в конечном итоге будет использоваться TFP. Например, для использования человеком может оказаться полезным, чтобы антигенсвязывающий домен TFP включал в себя человеческие или гуманизированные остатки для антигенсвязывающего домена антитела или фрагмента антитела.

[00205] Таким образом, в одном аспекте антигенсвязывающий домен содержит гуманизированное либо человеческое антитело или фрагмент антитела, либо верблюжье антитело или фрагмент антитела, либо мышиное антитело или фрагмент антитела. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий связывающий домен против TAA содержит одну или более (*например*, все три) из определяющей комплементарность области 1 легкой цепи (CDR1 LC), определяющей комплементарность области 2 легкой цепи (CDR2 LC) и определяющей комплементарность области 3 легкой цепи (CDR3 LC) гуманизированного или человеческого связывающего домена против TAA, описанного в настоящем документе, и/или одну или более (*например*, все три) из определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющей комплементарность области 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и определяющей комплементарность области 3 тяжелой цепи (CDR3 HC) гуманизированного или человеческого связывающего домена против TAA, описанного в настоящем документе, *например* гуманизированный или человеческий связывающий домен против TAA содержит одну или более, *например* все три CDR LC, и одну или более, *например* все три CDR HC. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий связывающий домен

против ТАА содержит одну или более (*например*, все три) из определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющей комплементарность области 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и определяющей комплементарность области 3 тяжелой цепи (CDR3 HC) гуманизированного или человеческого связывающего домена против ТАА, описанного в настоящем документе, *например* гуманизированный или человеческий связывающий домен против ТАА имеет две вариабельные области тяжелой цепи, каждая из которых содержит CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC, описанные в настоящем документе. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий связывающий домен против ТАА содержит гуманизированную или человеческую вариабельную область легкой цепи, описанную в настоящем документе, и/или гуманизированную или человеческую вариабельную область тяжелой цепи, описанную в настоящем документе. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий связывающий домен против ТАА содержит гуманизированную вариабельную область тяжелой цепи, описанную в настоящем документе, *например* по меньшей мере две гуманизированные или человеческие вариабельные области тяжелой цепи, описанные в настоящем документе. В одном варианте осуществления связывающий домен против ТАА представляет собой scFv, содержащий легкую цепь и тяжелую цепь аминокислотной последовательности, представленной в настоящем документе. В одном варианте осуществления связывающий домен против ТАА (*например*, scFv) содержит: вариабельную 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 вариабельной области легкой цепи, представленной в настоящем документе, или последовательность с 95–99% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной в настоящем документе; и/или вариабельную 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 вариабельной области тяжелой цепи, представленной в настоящем документе, или последовательность с 95–99% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной в настоящем документе. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий связывающий домен против ТАА представляет собой scFv, а вариабельная область легкой цепи, содержащая аминокислотную последовательность, описанную в настоящем документе, присоединена к вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность,

описанную в настоящем документе, посредством линкера, *например* линкера, описанного в настоящем документе. В одном варианте осуществления гуманизированный связующий домен против TAA включает в себя линкер $(Gly_4\text{-}Ser)_n$, где n равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно 3 или 4. Вариабельная область легкой цепи и вариабельная область тяжелой цепи scFv могут находиться, *например*, в любой из следующих ориентаций: вариабельная область легкой цепи-линкер-вариабельная область тяжелой цепи или вариабельная область тяжелой цепи-линкер-вариабельная область легкой цепи. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит длинную линкерную (ДЛ) последовательность. В некоторых вариантах осуществления длинная линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где n = от 2 до 4. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит короткую линкерную (КЛ) последовательность. В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 3.

[00206] В некоторых аспектах нечеловеческое антитело является гуманизированным, причем специфические последовательности или области антитела модифицируют для повышения сходства с антителом, которое естественным образом вырабатывается у человека, или его фрагментом. В одном аспекте антигенсвязывающий домен является гуманизированным.

[00207] Гуманизированное антитело могут получать с использованием различных известных в данной области техники методик, включая, но не ограничиваясь, CDR-пересадку (см., *например*, европейский патент № EP 239400; международная публикация № WO 91/09967 и патенты США № 5225539, 5530101 и 5585089, каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки), маскировку поверхностных остатков или изменение поверхности (см., *например*, европейские патенты № 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, каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки), перетасовку цепей (см., *например*, патент США № 5565332, который включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки), и методики, описанные в, *например*, публикации заявки на патент США № US2005/0042664, публикации заявки на патент США № US2005/0048617, патент США № 6407213, 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), каждый из которых включен в настоящий документ в полном объеме 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 замены идентифицируют известными в данной области техники методами, *например* путем моделирования взаимодействий остатков CDR и каркаса с целью идентификации каркасных остатков, важных для связывания антигенов и сравнения последовательностей, для идентификации необычных каркасных остатков в определенных положениях (см., *например*, Queen et al., патент США № 5585089; и Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323, которые включены в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.)

[00208] 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» вариабельного 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 по существу выполняться, 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-пересадки (EP 239400; публикация согласно PCT № WO 91/09967 и патенты США № 4816567; 6331415; 5225539; 5530101; 5585089; 6548640, содержание которых включено в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки). В таких гуманизированных антителах и фрагментах антител по существу менее чем интактный человеческий вариабельный 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 сайтов антител грызунов. Гуманизации антител и фрагментов антител также могут достигать 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 перетасовки цепей (патент США № 5565332), содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00209] Выбор человеческих вариабельных 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 вариабельного домена антитела грызуна по всей библиотеке известных человеческих последовательностей вариабельного домена. Человеческая последовательность, наиболее близкая к последовательности грызуна, затем принимается в качестве человеческого каркаса (FR) для гуманизированного антитела (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987), содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). В другом методе используют конкретный каркас, полученный из консенсусной последовательности всех человеческих антител конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Один и тот же каркас могут использовать 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), содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). В некоторых вариантах осуществления каркасную область, *например* все четыре каркасные области вариабельной области тяжелой цепи, получают из последовательности зародышевой линии V_H4-4-59. 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 вариабельной области 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.

[00210] В некоторых аспектах часть композиции TFP 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 настоящего 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

иммуноглобулинов широко доступны и знакомы специалистам в данной области техники. Имеются компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают вероятные трехмерные конформационные структуры выбранных потенциально пригодных последовательностей иммуноглобулинов. Изучение таких изображений позволяет проводить анализ вероятной роли таких 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 выбирать и объединять из реципиентных и импортируемых последовательностей таким образом, что будет достигаться желаемое свойство антитела или фрагмента антитела, такое как повышенная аффинность к антигену-мишени. В целом, остатки CDR непосредственно и в существенной степени вовлечены в воздействие на связывание с антигеном.

[00211] Гуманизированное антитело или фрагмент антитела может сохранять аналогичную антигенную специфичность, что и исходное антитело, *например*, в настоящем изобретении способность связывать опухолеассоциированные антигены человека, такие как MUC16, IL13Rα2 или MSLN. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело или фрагмент антитела может иметь улучшенную аффинность и/или специфичность связывания с MUC16, IL13Rα2 или MSLN человека.

[00212] В одном аспекте связывающий домен против TAA (т.е. связывающий домен MUC16, IL13Rα2 или MSLN) характеризуется особыми 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 MUC16, IL13Rα2 или MSLN человека. В одном аспекте настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему домену, содержащему антитело или фрагмент антитела, причем антигенсвязывающий домен специфически связывается с белком MUC16, IL13Rα2 или MSLN или их фрагментом, причем антитело или фрагмент антитела содержит вариабельную легкую цепь и/или вариабельную тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в настоящем документе. В некоторых аспектах scFv является смежным с лидерной последовательностью и находится с ней в одной рамке считывания.

[00213] В одном аспекте связывающий домен против TAA представляет собой фрагмент, *например* одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В одном аспекте связывающий домен против TAA представляет собой Fv, Fab, $(Fab')_2$ или бифункциональное (*например*, биспецифическое) гибридное антитело (*например*, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). В одном аспекте антитела и их фрагменты, описанные в настоящем документе,

связывают белок MUC16, IL13Rα2 или MSN с аффинностью дикого типа или повышенной аффинностью.

[00214] В настоящем документе также предложены способы получения антигенсвязывающего домена антитела, специфического к антигену-мишени (*например*, MUC16, IL13Rα2, MLSN или любому антигену-мишени, описанному в другом месте настоящего документе, для нацеливания связывающих доменов гибридного фрагмента), причем способ содержит обеспечение путем добавления, делеции, замещения или вставки одной или более аминокислот в аминокислотной последовательности домена V_H, указанного в настоящем документе, причем домен V_H, который является вариантом аминокислотной последовательности домена V_H, необязательно объединяет предоставленный таким образом домен V_H с одним или более доменов V_L, и тестирование домена V_H или комбинации или комбинаций V_H/V_L для выявления специфического представителя связывания или антигенсвязывающего домена антитела, специфического к представляющему интерес антигену-мишени (*например*, MUC16, IL13Rα2 или MSLN) и необязательно имеющего одно или более желаемых свойств.

[00215] В некоторых случаях домены V_H и scFv можно получать в соответствии со способом, известным в данной области техники (см., например, Bird et al., (1988) Science 242:423–426 и Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879–5883). Молекулы scFv можно создавать путем связывания вместе областей V_H и V_L с использованием гибких полипептидных линкеров. Молекулы scFv содержат линкер (*например*, линкер Ser-Gly) с оптимизированной длинной и/или аминокислотной композицией. Длина линкера может в значительной степени влиять на то, каким образом будут складываться и взаимодействовать вариабельные области scFv. Фактически, если используется короткий полипептидный линкер (*например*, между 5 и 10 аминокислотами), предотвращается внутрицепочечное складывание. Для того, чтобы соединить два вариабельных области вместе для образования области связывания функционального эпитопа также требуется внутрицепочечное сворачивание. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит длинную линкерную (ДЛ) последовательность. В некоторых вариантах осуществления длинная линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где n = от 2 до 4. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит короткую линкерную (КЛ) последовательность. В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 3. Примеры размера и ориентации линкеров см., *например*, Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444–6448, патент США № 7695936, публикации заявок на патент США № 20050100543 и 20050175606, и публикации согласно PCT № WO2006/020258 и WO2007/024715, все из которых включены

в настоящий документ посредством ссылки.

[00216] 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 из глициновых и сериновых повторов, таких как $(Gly_4Ser)_n$, где n представляет собой положительное целое число равное или большее 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 достижение превосходной эффективности в исследованиях активности. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит длинную линкерную (ДЛ) последовательность. В некоторых вариантах осуществления длинная линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где n = от 2 до 4. В некоторых вариантах осуществления 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

[00217] Стабильность связывающего домена против ТАА, *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 исходным scFv в описанных анализах.

[00218] Улучшенная термическая стабильность связывающего домена против ТАА, *например* scFv, впоследствии будет присуща всей конструкции ТАА-TFP, что приведет к улучшению терапевтических свойств конструкции TFP против ТАА. Термическую стабильность связывающего домена против ТАА, *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 ТАА, *например* scFv, имеет улучшенную на 1 °C термическую стабильность по сравнению с традиционным антителом. В другом варианте осуществления связывающий домен против ТАА, *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 традиционным 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 измерять с использованием известные в данной области техники способов. Например, в одном варианте осуществления можно измерять T_M. Способы измерения T_M и другие способы определения стабильности белка описаны далее.

[00219] Мутации в scFv (возникающие вследствие гуманизации или мутагенеза растворимого scFv) изменяют стабильность scFv и улучшают общую стабильность scFv и конструкции TFP против TAA. Стабильность гуманизированного scFv сравнивают по отношению к мышиному scFv, используя измерения, такие как T_M, денатурация по действием температуры и агрегация по действием температуры. В одном варианте осуществления связывающий домен против TAA, *например* scFv, содержит по меньшей мере одну мутацию, возникающую вследствие процесса гуманизации таким образом, что мутировавший scFv обеспечивает улучшенную стабильность для конструкции TFP против TAA. В другом варианте осуществления связывающий домен против TAA, *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 для конструкции TAA-TFP.

[00220] 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 TAA, описанных в настоящем документе. В одном конкретном аспекте композиция TFP по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В дополнительном аспекте фрагмент антитела содержит scFv.

[00221] В различных аспектах антигенсвязывающий домен TFP конструируется путем модификации одной или более аминокислот в пределах одного или обеих вариабельных областей (*например*, V_H и/или V_L), например в пределах одной или более областей CDR и/или в пределах одной или более каркасных областей. В одном конкретном аспекте композиция TFP по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В дополнительном аспекте фрагмент антитела содержит scFv.

[00222] Среднему 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, для белка могут быть выполнены дополнительные нуклеотидные замещения, приводящие к аминокислотным замещениям в «заменимых» аминокислотных остатках. Например, заменимый аминокислотный остаток в молекуле может быть замещен другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. В другом варианте осуществления нить аминокислот может быть замещена структурно аналогичной нитью, которая отличается порядком и/или композицией представителей семейства боковых цепей, *например* может быть осуществлено консервативное замещение, в котором аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь.

[00223] 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).

[00224] Идентичность 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 содержание 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).

[00225] Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность служит эталонной последовательностью, с которой сравнивают исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей исследуемая и эталонная последовательности вводят в компьютер, при необходимости, обозначают координаты подпоследовательности и указывают программные параметры алгоритма для работы с последовательностями. Можно использовать программные параметры по умолчанию или указывать альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности последовательностей для исследуемых последовательностей по сравнению с эталонной последовательностью на основании программных параметров. Методы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения могут проводить, *например*, алгоритмом определения локальной гомологии по Smith and Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c, алгоритмом определения гомологии выравнивания по Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443, путем изучения методом определения сходства по Pearson and Lipman, (1988) Proc. Nat'l. USA 85:2444, путем компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном пакете Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., г. Мэдисон, штат Висконсин, США) или путем ручного выравнивания и визуального просмотра (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). В параметрах алгоритма для использования нуклеотидного BLAST для определения идентичности нуклеотидной последовательности могут применять скоринговые параметры со значением совпадения/несовпадения 1,-2, при этом цены делеций являются линейными. Для выравнивания последовательности длина последовательности, которая инициирует выравнивание, или размер слова в алгоритме BLAST может быть установлен равным 28. В параметрах алгоритма для использования белкового BLAST для определения идентичности пептидных последовательностей могут применять параметры оценивания с матрицей BLOSUM62 для присвоения оценки за выравнивание пар остатков, а также для определения общей оценки выравнивания, причем

цены делеций могут иметь штраф за открытие равный 11 и штраф за продление равный 1. Метод матричной корректировки для компенсации аминокислотной композиции последовательностей может быть условной матричной корректировкой с композиционной оценкой матрицы. Для выравнивания последовательности длина последовательности, которая инициирует выравнивание, или размер слова в алгоритме BLAST может быть установлен равным 6.

[00226] В одном аспекте в настоящем изобретении предусматриваются модификации начальной аминокислотной последовательности антитела или фрагмента (*например*, scFv), которые создают функционально эквивалентные молекулы. Например, V_H или V_L связывающего домена против TAA, *например* scFv, содержащийся в TFP, могут 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 начального каркасной области V_H или V_L связывающего домена против TAA, *например* scFv. В настоящем изобретении предусматривается модификации всей конструкции TFP, *например* модификации в одной или более аминокислотных последовательностей различных доменов конструкции TFP, чтобы создать функционально эквивалентные молекулы. Конструкция TFP может модифицироваться 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% или 99% идентичности начальной конструкции TFP.

Внеклеточный домен

[00227] 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(-ые) область(-и), *например* альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора либо CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, либо в альтернативных вариантах осуществления CD28, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. В некоторых случаях внеклеточный домен TCR содержит внеклеточный домен белка или его часть, выбранные из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, их функциональные фрагменты и их аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере одну, но не более 20

модификаций.

Трансмембранный домен

[00228] 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 которой 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 в себя по меньшей мере 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 или более аминокислот внеклеточной области. В некоторых случаях трансмембранный домен может включать в себя 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 или модифицирован посредством аминокислотного замещения, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами аналогичных или различных белков поверхностной мембраны, *например*, для сведения к минимуму взаимодействий с другими представителями рецепторного комплекса. В одном аспекте трансмембранный домен способен к гомодимеризации с другим TFP на поверхности TFP-T-клетки. В другом аспекте аминокислотная последовательность трансмембранного домена может модифицироваться или замещаться таким образом, чтобы минимизировать взаимодействия со связывающими доменами нативного партнера по связыванию, который присутствует в том же TFP.

[00229] 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 внутриклеточному(-ым) домену(-ам) каждый раз, когда TFP связался с мишенью. В некоторых случаях субъединица TCR содержит трансмембранный домен, состоящий из трансмембранного домена 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 CD3 TCR гамма, субъединицы CD3 TCR дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, их функциональные фрагменты и их аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть присоединен к внеклеточной области TCR, *например* к антигенсвязывающему домену TCR, через шарнир, *например* шарнир из человеческого белка. Например, в одном варианте осуществления шарнир может представлять собой шарнир человеческого иммуноглобулина (Ig), *например* шарнир IgG4 или шарнир CD8a.

Линкеры

[00230] Необязательно, короткий олиго- или полипептидный линкер длиной от 2 до 10 аминокислот может образовывать связь между трансмембранным доменом и цитоплазматической областью TFP. Глицин-сериновый дублет обеспечивает особенно подходящий линкер. Например, в одном аспекте линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 99). В некоторых вариантах осуществления линкер кодируется нуклеотидной последовательностью GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO: 100). Другие примеры линкеров представлены в таблице 4.

Цитоплазматический домен

[00231] 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 какой используется усеченная часть внутриклеточного сигнального домена, такая усеченная часть может использоваться вместо интактной цепи до тех пор, пока она передает сигнал эффекторной функции. Таким образом, термин «внутриклеточный сигнальный домен»

предназначен для охвата любой усеченной части внутриклеточного сигнального домена, достаточного для передачи сигнала эффекторной функции.

[00232] 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.

[00233] Известно, что создаваемых только TCR сигналов может быть недостаточно для полной активации наивных Т-клеток и может потребоваться вторичный и/или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация наивных Т-клеток может опосредоваться двумя различными классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, что инициируют антигензависимую первичную активацию посредством TCR (первичные внутриклеточные сигнальные домены), и теми, что действуют независимым от антигенов образом для обеспечения вторичного или костимулирующего сигнала (вторичный цитоплазматический домен, *например* костимулирующий домен).

[00234] Первичный сигнальный домен может регулировать первичную активацию комплекса TCR либо стимулирующим путем, либо ингибирующим путем. Первичные внутриклеточные сигнальные домены, действующие стимулирующим путем, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM).

[00235] Примеры ITAM, содержащих первичные внутриклеточные сигнальные домены, которые предназначены для конкретного применения в настоящем изобретении, включают в себя мотивы из CD3 дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В одном варианте осуществления TFP по настоящему изобретению содержит внутриклеточный сигнальный домен, *например* первичный сигнальный домен CD3-эпсилон. В одном варианте осуществления первичный сигнальный домен 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 первичный сигнальный домен содержит модифицированный ITAM-содержащий первичный внутриклеточный сигнальный домен, *например* оптимизированный и/или усеченный ITAM-содержащий первичный внутриклеточный сигнальный домен. В одном варианте осуществления первичный сигнальный домен содержит один, два, три, четыре или более мотивов ITAM.

[00236] Внутриклеточный сигнальный домен TFP может содержать сигнальный домен CD3 дзета отдельно или в комбинации с любым(-и) другим(-и) желаемым(-и) внутриклеточным(-и) сигнальным(-и) доменом(-ами), пригодными в контексте TFP по настоящему изобретению. Например, внутриклеточный сигнальный домен TFP может содержать часть цепи CD3 эпсилон 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, DAP10, DAP12, 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-Т-клеток *in vitro* и увеличивает стойкость и противоопухолевую активность человеческих Т-клеток *in vivo* (Song et al. Blood. 2012; 119(3):696–706).

[00237] Внутриклеточные сигнальные последовательности в цитоплазматической части TFP по настоящему изобретению могут связываться 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.

[00238] В одном варианте осуществления в качестве подходящего линкера может использоваться глицин-сериновый дублет. В одном варианте осуществления в качестве подходящего линкера может использоваться одна аминокислота, *например* аланин, глицин.

[00239] 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 (например, MUC16, IL13Rα2, MSLN) 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 виде фрагмента, *например* scFv, который не будет связываться с антигенсвязывающим доменом второго TFP, *например* антигенсвязывающий домен второго TFP представляет собой V_{HH}. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой SD1 (SEQ ID

NO:15), SD2 (SEQ ID NO:20), SD3 (SEQ ID NO:25), SD4 (SEQ ID NO:30), SD5 (SEQ ID NO:35) или SD6 (SEQ ID NO:40). В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой LSD1 (SEQ ID NO:51), H1-LSD1 (SEQ ID NO:56), H2-LSD1 (SEQ ID NO:61), LSD2 (SEQ ID NO:66), H1-LSD1 (SEQ ID NO:71) или H2-LSD2 (SEQ ID NO:76). В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой против VHH1 против MSLN (SEQ ID NO:96) или VHH2 против MSLN (SEQ ID NO:97).

[00240] В другом аспекте TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, может дополнительно экспрессировать другое вещество, *например* вещество, которое повышает активность TFP-экспрессирующей клетки. Например, в одном варианте осуществления вещество может быть таким, которое ингибирует ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, *например* PD1, могут в некоторых вариантах осуществления снижать способность TFP-экспрессирующей 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. 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. В одном варианте осуществления вещество содержит первый полипептид, *например* ингибирующей молекулы, такой как PD1, LAG3, CTLA4, CD160, 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 описано в настоящем документе)) и/или первичный сигнальный домен (*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 является ингибирующим представителем семейства CD28 рецепторов, которое также включает в себя CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. PD1 может экспрессироваться в активированных B-клетках, T-клетках и миелоидных клетках (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765–75). Было показано, что два лиганда для PD1, лиганда 1 белка запрограммированной гибели (PD-L1) и лиганда 2 программированной гибели (PD-L2) клеток подавляют активацию T-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 может присутствовать в избытке в новообразованиях 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 обратимой благодаря ингибированию локального взаимодействия PD1 с PD-L1.

[00241] В одном варианте осуществления вещество содержит внеклеточный домен (ECD) ингибирующей молекулы, *например* белок 1 программированной гибели клеток (PD-1) могут сливать 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 TAA, описанным в настоящем документе, улучшает стойкость Т-клетки. В одном варианте осуществления TFP представляет собой PD1 TFP, содержащий внутриклеточный домен PD 1. Альтернативно, предложены TFP, содержащие антитело или фрагмент антитела, такой как scFv, который специфически связывается с PD-L1 или PD-L2.

[00242] В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается популяция 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 TAA, описанный в настоящем документе, и вторую клетку, экспрессирующую TFP, имеющий другой связывающий домен против TAA, *например* связывающий домен против TAA, описанный в настоящем документе, который отличается от связывающего домена против TAA 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 TAA, *например*, как описано в настоящем документе, и вторую клетку, экспрессирующую TFP, который включает в себя антигенсвязывающий домен для мишени, отличной от TFP против TAA первой клетки (например, со специфичностью к MUC16, IL13Rα2 или MSLN) (*например*, другой ассоциированный с опухолью антиген).

[00243] В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается популяция клеток, причем по меньшей мере одна клетка в популяции экспрессирует TFP, имеющий домен против TAA, описанный в настоящем документе, а вторая клетка экспрессирует другое вещество, *например* вещество, которое повышает активность TFP-экспрессирующих клеток. Например, в одном варианте осуществления вещество может быть таким, которое

ингибирует ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, *например*, могут в некоторых вариантах осуществления снижать способность TFP-экспрессирующей клетки устанавливать иммунный эффекторный ответ. К примерам ингибирующих молекул относятся PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 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.

[00244] 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(A) для получения конструкции, содержащей 3’ и 5’ нетранслируемую последовательность (UTR), 5’-кэп и/или сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), нуклеиновую кислоту, подлежащую экспрессии, и хвост полиА, 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.

[00245] В одном аспекте TFP против TAA кодируется матричной РНК (мРНК). В одном аспекте мРНК, кодирующая TFP против TAA, вводится в Т-клетку для получения TFP-Т-клетки. В одном варианте осуществления транскрибированная *in vitro* РНК TFP может вводиться в клетку в виде 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. Желаемой 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 гибридный белок. Части ДНК, которые лигируются вместе, могут быть получены от одного организма или от более чем одного организма.

[00246] ПЦР применяется для создания матрицы для *in vitro* транскрипции мРНК, которая используется для трансфекции. Методы выполнения ПЦР хорошо известны в данной области. Праймеры для использования в ПЦР разработаны таким образом, чтобы содержать области, которые в значительной степени комплементарны областям ДНК, которые должны 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 интересующий домен. В одном варианте осуществления праймеры разработаны таким образом, чтобы амплифицировать кодирующий область человеческой кДНК, включая все или части 5' и 3' UTR. Праймеры, пригодные для ПЦР, могут быть созданы методами синтеза, которые хорошо известны в данной области. «Прямые праймеры» являются праймерами, содержащими область из нуклеотидов, которые в значительной степени комплементарны нуклеотидам на матрице ДНК, расположенным выше последовательности ДНК, которая должна быть амплифицирована. Выражение «расположенный выше» используется в настоящем документе для обозначения 5' расположения в последовательности ДНК, которая должна быть амплифицирована, по

отношению к кодирующей цепи. «Обратные праймеры» являются праймерами, содержащими область из нуклеотидов, по существу комплементарных матрице двухцепочечной ДНК, которые расположены ниже последовательности ДНК, которая должна быть амплифицирована. Выражение «расположенный ниже» используется в настоящем документе для обозначения 3’ расположения в последовательности ДНК, которая должна быть амплифицирована, по отношению к кодирующей цепи.

[00247] Любая ДНК-полимераза, используемая в ПЦР, может применяться в способах, описанных в настоящем документе. Реагенты и полимераза коммерчески доступны из различных источников.

[00248] 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 кодирующей области, можно изменять различными способами, включая, помимо прочего, разработку праймеров для ПЦР, которые ренатурируются с различными областями UTR. Используя такой подход, обычный специалист в данной области техники сможет модифицировать длину 5’ и 3’ UTR, необходимую для достижения оптимальной эффективности трансляции после трансфекции транскрибированной РНК.

[00249] 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.

[00250] 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. 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.

[00251] 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 Т7, как описано в любом другом месте настоящего документа. К другим пригодным для использования промоторам относятся, помимо прочего, промоторы РНК-полимеразы Т3 и SP6. Консенсусные нуклеотидные последовательности для промоторов Т7, Т3 и SP6 известны в данной области техники.

[00252] В предпочтительном варианте 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, линеаризованной на конце 3’ UTR, приводит к получению мРНК нормального размера, которая не является эффективной при эукариотической трансфекции, даже если после транскрипции она будет полиаденилирована.

[00253] На матрице линейной ДНК РНК-полимераза фага Т7 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).

[00254] Традиционным способом интеграции полиА/Т-участков в матрицу ДНК является молекулярное клонирование. Однако полиА/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 аберрациями. 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 полиА/Т 3'-участком без применения клонирования.

[00255] ПолиА/Т-сегмент транскрипционной матрицы ДНК может быть получен в процессе ПЦР, используя обратный праймер, содержащий полиТ-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.

[00256] Поли(А)-хвосты РНК могут быть дополнительно расширены 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.

[00257] 5'-Кэпы также обеспечивают стабильность молекул РНК. В предпочтительном варианте 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)).

[00258] РНК, полученные с помощью способов, описанных в настоящем документе, могут также содержать последовательность сайта 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.

[00259] РНК могут вводить в клетки-мишени, используя любой из целого ряда различных способов, например, коммерчески доступные способы, которые включают в себя, помимо

прочего, электропорацию (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Кельн, Германия)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Бостон, штат Массачусетс) или электропоратор Gene Pulser II (BioRad, Денвер, штат Колорадо), Multiporator (Eppendort, 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).

Конструкции нуклеиновых кислот, кодирующие TFP

[00260] В настоящем изобретении также предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие одну или более конструкций TFP, описанных в настоящем документе. В одном аспекте молекула нуклеиновой кислоты представлена в качестве транскрипта матричной РНК. В одном аспекте молекула нуклеиновой кислоты представлена в качестве конструкции ДНК.

[00261] 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.

[00262] 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 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 транскрибируемый *in vitro* вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор кольцевой РНК (например, как описано в одновременно находящейся на рассмотрении предварительной заявке на патент № 62/836 977).

[00263] В настоящем изобретении также предложены векторы, в которые встраивается ДНК по настоящему изобретению. Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, являются подходящими инструментами для достижения долговременного переноса гена, поскольку они обеспечивают долгосрочную стабильную интеграцию трансгена и его размножение 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. В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыты векторы, содержащие рекомбинантную нуклеиновую кислоту, раскрытую в данном документе.

[00264] В другом варианте осуществления вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую желаемый TFP по настоящему раскрытию, 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», «криспер», CAS9 и цинк-пальцевая нуклеаза (*см.*, June et al. 2009 Nature Reviews Immunol. 9.10: 704–716, включенную в данный документ посредством ссылки).

[00265] Экспрессирующие конструкции по настоящему раскрытию также могут использоваться для иммунизации нуклеиновыми кислотами и генной терапии, используя стандартные протоколы доставки генов. Способы доставки генов известны в данной области техники (см., *например*, патенты США № 5 399 346, 5 580 859, 5 589 466, включенные в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте). В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предлагается вектор для генной терапии.

[00266] 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.

[00267] Более того, вектор экспрессии можно доставлять в клетку в форме вирусного вектора. Технология вирусных векторов, хорошо известная в данной области техники и описана, *например*, в Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volumes 1–4, Cold Spring Harbor Press, NY), и в других пособиях по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, используемые в качестве векторов, включают, но не ограничиваются ими, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. В общем, подходящий вектор содержит сайт начала репликации, функционирующую по меньшей мере в одном организме, последовательность промотора, подходящие сайты для рестрикционных эндонуклеаз и один или более селективных маркеров (*например*, WO 01/96584; WO 01/29058; и патент США № 6 326 193).

[00268] Был разработан ряд систем на основе вирусов для переноса генов в клетки млекопитающих. Например, ретровирусы обеспечивают удобную платформу для систем доставки генов. Выбранный ген может вводиться в вектор и упаковываться в ретровирусные частицы с использованием известных в данной области техники способов. Затем рекомбинантный вирус могут выделять и доставлять в клетки субъекта либо *in vivo* либо *ex vivo*. В данной области техники известен ряд ретровирусных систем. В некоторых вариантах осуществления используются аденовирусные векторы. В данной области техники известен ряд аденовирусных векторов. В некоторых вариантах осуществления используются лентивирусные векторы.

[00269] Дополнительные элементы промотора, *например* энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они расположены в области размером 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 увеличивать до 50 п. о., прежде чем активность начнет снижаться. В зависимости от промотора оказывается, что для активации транскрипции отдельные элементы могут функционировать либо совместно, либо независимо.

[00270] Примером промотора, способного к экспрессии трансгена TFP в Т-клетке млекопитающего, является промотор EF1a. Нативный промотор EF1a стимулирует экспрессию альфа-субъединицы комплекса фактора элонгации-1, который отвечает за ферментную доставку аминоацил-тРНК в рибосому. Промотор EF1a широко используется в плазмидах экспрессии млекопитающих, и было показано, что он эффективен в управлении экспрессией 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 с длинными концевыми повторами (ДКП) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, немедленно ранний промотор вируса Эпштейна-Барр, промотор вируса саркомы

Рауса, а также промоторы человеческих генов, такие как, помимо прочего, промотор актина, промотор миозина, промотор фактора элонгации-1a, 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, металлотиониновый промотор , глюкокортикоидный промотор, прогестероновый промотор и регулируемый тетрациклином промотор.

[00271] Чтобы оценить экспрессию полипептида TFP или его частей, вектор экспрессии, вводимый в клетку, может также содержать селективный маркерный ген, репортерный ген или и тот, и другой, чтобы способствовать идентификации и отбору экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые необходимо подвергать 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 клетках-хозяевах. К пригодным для использования селективным маркерам относятся, например, устойчивые к антибиотикам гены, такие как neo и т. п.

[00272] 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 минимальной 5’ фланкирующей областью, демонстрирующая самый высокий уровень экспрессии репортерного гена, идентифицируется как промотор. Такие

промоторные области могут быть связаны с репортерным геном и использоваться для оценки способности веществ модулировать активированную промотором транскрипцию.

[00273] Способы введения и экспрессии генов в клетке известны в данной области техники. В контексте вектора экспрессии вектор легко вводится в клетку-хозяина, например в *клетку* млекопитающего, бактерии, дрожжей или насекомого, любым способом известным в данной области техники. Например, вектор экспрессии переносится в клетку-хозяина физическими, химическими или биологическими способами.

[00274] 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, подходят для описанных в настоящем описании способов (*см.*, *например*, Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volumes 1–4, Cold Spring Harbor Press, NY). Одним способом введения полинуклеотида в клетку-хозяина является трансфекция фосфатом кальция.

[00275] 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 № 5 350 674 и 5 585 362).

[00276] 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.

[00277] 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 бислойной 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, аминоспирты и альдегиды.

[00278] 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 при температуре около -20 °C. Хлороформ используется как единственный растворитель, так как он испаряется легче, чем метанол. Термин «липосома» в контексте настоящего описания представляет собой общий термин, охватывающий множество одно- и многослойных липидных носителей, сформированных путем образования замкнутых липидных бислоев или агрегатов. Липосомы можно охарактеризовать, как содержащие везикулярные структуры с фосфолипидной бислойной 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 самоорганизации перед образованием замкнутых структур и захватывают воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505–10). Однако также охватываются композиции, которые содержат в растворе структуры, отличающиеся 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.

Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина или иным образом воздействия на клетку ингибитора по настоящему изобретению, можно проводить разнообразные анализы с целью подтверждения наличия последовательности рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине. 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 (твердофазные ИФА и вестерн-блоттинги), или путем анализов, описываемых в настоящем документе, для идентификации веществ, входящих в объем настоящего изобретения.

Технологии редактирования генов

[00279] В некоторых вариантах осуществления модифицированные Т-клетки, раскрытые в настоящем документе, сконструированы с использованием методик редактирования генов, таких как способы использующие короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (CRISPR®, см., например, патент США № 8 697 359), эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALE) (TALEN, см., например, патент США № 9 393 257), мегануклеазы (эндодезоксирибонуклеазы, имеющие большие сайты распознавания, содержащие последовательности двухцепочечной ДНК из от 12 до 40 пар оснований), нуклеазу с цинковыми пальцами (ZFN, см., например, Urnov et al., Nat Rev. Genetics (2010) v11, 636–646) или нуклеазы megaTAL (гибридный 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. См. также Sander & Joung, Nat. Biotech. (2014) v32, 347–55; и June et al., 2009 Nature Reviews Immunol. 9.10: 704–716, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления 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).

[00280] 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».

[00281] 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 осуществления методики редактирования генов открывают путь для мультиплексного 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 дефицитны в отношении экспрессии эндогенного TCR, и/или лейкоцитарных антигенов человека (HLA), и/или белка программируемой гибели клеток 1 (PD1), и/или других генов.

[00282] Современные методики редактирования генов включают в себя мегануклеазы, цинк-пальцевые нуклеазы (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 негомологичным 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 одноцепочечные разрывы ДНК (SSB). DSB можно репарировать путем включения одноцепочечной ДНК (ssDI) или репарации одноцепочечной матрицы (ssTR), события, при котором вводится гомологичная последовательность из донорной ДНК.

[00283] Генетическая модификация геномной ДНК может быть выполнена с использованием сайт-специфических редкощепящих эндонуклеаз, которые сконструированы для распознавания последовательностей ДНК в интересующем локусе. В данной области техники известны способы получения сконструированных сайт-специфических эндонуклеаз. Например, цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN) могут конструироваться для распознавания и разрезания предопределенных сайтов в геноме. ZFN представляют собой химерные белки, содержащие ДНК-связывающий домен цинкового пальца, гибридизированный 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 гибридизации этого сконструированного белкового домена с нуклеазой FokI можно воздействовать на разрывы ДНК-мишени 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, гибридизированный с доменом нуклеазы FokI (рассмотрено в Mak et al. (2013), Curr Opin Struct Biol. 23:93–9). Однако в этом случае ДНК-связывающий домен содержит тандемный массив TAL-эффекторных доменов, каждый из которых специфически распознает одну пару оснований ДНК. Компактные TALEN имеют альтернативную архитектуру эндонуклеаз, которая позволяет избегать димеризации (Beurdeley et al. (2013), Nat Commun. 4: 1762). Компактный TALEN содержит сконструированный сайт-специфический TAL-эффекторный ДНК-связывающий домен, гибридизированный 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.

[00284] В данной области техники также известны сконструированные эндонуклеазы на основе системы CRISPR/Cas9 (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 разрезающая активность которой могут быть запрограммированы с помощью короткой направляющей РНК или дуплекса crРНК/tracrРНК. Эндонуклеаза CRISPR содержит два компонента: (1) эффекторную нуклеазу каспазу, обычно микробную Cas9; и (2) короткую «направляющую РНК» или РНК-дуплекс, включающие целевую последовательность из от 18 до 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 нескольких сайтах генома (мультиплексное редактирование генома).

В данной области техники известны два класса систем CRISPR (Adli (2018) Nat. Commun. 9:1911), каждый содержит множество типов CRISPR. Класс 1 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 видов Acidaminococcus (AsCpf1) и бактерии Lachnospiraceae (LbCpf1).

[00285] Хоуминг-эндонуклеазы представляют собой группу встречающихся в природе нуклеаз, которые распознают сайты расщепления из 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 генов 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 Sel. 30(7): 503–522). Мегануклеазы (MN) являются мономерными белками с присущей 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.

[00286] В дополнение к упомянутым четырем основным методикам редактирования генов, были сконструированы химерные белки, содержащие гибридизированные 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.

[00287] Чтобы выполнить методику редактирования генов, нуклеазы, а в случае системы CRISPR/Cas9 — гРНК, должны эффективно доставляться в интересующие клетки. Способы доставки, такие как физические, химические и вирусные методы, также известны в данной области (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 ограничиваются ими.

[00288] 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-клетку. 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 одном аспекте Т-клетка млекопитающего представляет собой Т-клетку человека.

Источники Т-клеток

[00289] 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*, млекопитающих). 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 разделение с помощью Ficoll™. В одном предпочтительном аспекте клетки из циркулирующей крови индивидуума получают посредством афереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, в том числе Т-клетки и В-клетки, моноциты, гранулоциты, 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 CytoMate 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.

[00290] В одном аспекте Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови посредством лизиса эритроцитов и деплеции моноцитов, например посредством центрифугирования в градиенте PERCOLLTM или противоточной центрифужной элютриации. Конкретная субпопуляция Т-клеток, таких как CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и CD45RO+ 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™ M-450 CD3/CD28 T, в течение периода времени, достаточного для позитивной селекции желаемых Т-клеток. В одном аспекте такой 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 индивидов с ослабленным иммунитетом. Более того, использование большего времени инкубации может повышать эффективность захвата CD8+ 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.

[00291] Обогащение популяции Т-клеток посредством отрицательной селекции может достигаться с комбинацией антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для отрицательно отобранных 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+ посредством отрицательной селекции, смесь моноклональных антител обычно включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В определенных аспектах может быть желательным обогащение или положительная селекция регуляторных Т-клеток, которые обычно экспрессируют CD4+, CD25+, CD62Lhi, GITR+ и FoxP3+. Альтернативно, в определенных аспектах регуляторные Т-клетки деплецируют посредством гранул, конъюгированных с антителом к CD25, или другим аналогичным способом селекции.

[00292] В одном варианте осуществления можно выбрать такую популяцию Т-клеток, которая экспрессирует один или более из IFN-γ, TNF-альфа, IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, гранзима B и перфорина, или другие соответствующие молекулы, *например* другие цитокины. Способы скрининга на экспрессию клеток можно определить, *например*, с помощью способов, описанных в публикации согласно PCT №: WO 2013/126712.

[00293] 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*, увеличивать концентрацию 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 концентрации 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 интересующие антигены-мишени,

таких как CD28-отрицательные Т-клетки, или выделение 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+ Т-клеток, которые обычно слабо экспрессируют CD28.

[00294] 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+ Т-клетки экспрессируют высокие уровни CD28, и их можно более эффективно захватывать по сравнению с CD8+ Т-клетками в разведенных концентрациях. В одном аспекте используемая концентрация клеток составляет $5x10^6$/мл. В других аспектах используемая концентрация может составлять от около $1x10^5$/мл до $1x10^6$/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.

[00295] Т-клетки для стимуляции также можно замораживать после этапа промывания. Без привязывания к какой-либо теории, этап замораживания и последующего размораживания обеспечивает получение более однородного продукта 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 растворе для замораживания. Несмотря на то, что многие растворы и параметры для замораживания 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, Hespan и PlasmaLyte A, затем клетки замораживают до -80 °C со скоростью 1 градус 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 отстаивать в течение одного часа при комнатной температуре перед активацией с использованием способов по настоящему изобретению.

[00296] 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 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, микофенолат и FK506, антитела или другие иммунодеструктивные средства, такие как алемтузумаб, антитела к CD3, цитоксан, флударабин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, FR901228 и облучение.

[00297] 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, описанных в настоящем документе, эти клетки могут находиться в предпочтительном состоянии для улучшенного 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

[00298] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут быть получены и размножены, как правило, с использованием способов, описанных, например, в патентах США № 6 352 694; 6 534 055; 6 905 680; 6 692 964; 5 858 358; 6 887 466; 6 905 681; 7 144 575; 7 067 318; 7 172 869; 7 232 566; 7 175 843; 5 883 223; 6 905 874; 6 797 514; 6 867 041; и публикации заявки на патент США № 7 572 631.

[00299] 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+ Т-клеток или CD8+ 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, Безансон, 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).

[00300] Т-клетки, которые подвергали стимуляции в течение различных периодов времени, могут обладать различными характеристиками. Например, типичные продукты крови или продукты мононуклеарных клеток периферической крови после афереза

содержат популяцию хелперных Т-клеток (ТН, CD4+), которая больше, чем популяция цитотоксических или супрессорных Т-клеток (ТС, CD8+). 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 антиген-специфическая субпопуляция ТС-клеток, может быть полезно размножение этой субпопуляции до большего количества.

[00301] 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.

[00302] После создания TFP против TAA 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 TAA описаны более подробно далее.

[00303] 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 $CD4^+$ и $CD8^+$ 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.

[00304] Размножение TFP^+ Т-клеток *in vitro* после стимуляции антигеном может быть измерено с помощью проточной цитометрии. Например, смесь $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток стимулируют с помощью альфаCD3/альфаCD28 и APC с последующей трансдукцией лентивирусными векторами, экспрессирующими GFP, под контролем промоторов, подлежащих анализу. К примерам промоторов относятся промоторы гена CMV IE, EF-1альфа, убиквитина С или фосфоглицерокиназы (ФГК). Флуоресценцию GFP оценивают на 6 день культивирования в субпопуляциях CD4+ и/или CD8+ Т-клеток с помощью

проточной цитометрии (см., *например*, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453–1464 (2009)). Альтернативно, смесь CD4+ и CD8+ Т-клеток стимулируют с помощью магнитных гранул, покрытых альфаCD3/альфаCD28 на 0 сутки и трансдуцируют с помощью TFP на 1 сутки, используя бицистронный лентивирусный вектор, экспрессирующий TFP вместе с eGFP с помощью последовательности ухода с рибосомы 2A. Культуры повторно стимулируют либо TAA+ клетками (например, K562), клетками K562 дикого типа (K562 дикого типа), либо клетками K562, экспрессирующими hCD32 и 4-1BBL, в присутствии антитела к CD3 и к CD28 (K562-BBL-3/28) после промывания. К культурам добавляют экзогенный IL-2 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)).

[00305] 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 день 8 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.

[00306] Для измерения активности TFP-Т также можно использовать животные модели. Например, ксенотрансплантатная модель с использованием человеческих TFP+ Т-клеток, специфических к TAA, для лечения рака у мышей с иммунодефицитом (см., *например*, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453–1464 (2009)). Если описывать очень кратко, после установления рака мышей рандомизируют в группы лечения. Различное количество сконструированных Т-клеток совместно инъецируют в соотношении 1:1 мышам NOD/SCID/ Y/-. После инъекции Т-клеток в различные моменты времени оценивают количество копий каждого вектора в ДНК селезенки, полученной у мышей. Животных оценивают на предмет ракового заболевания с еженедельными интервалами. Количества TAA+ раковых клеток крови измеряют у мышей, которым вводили альфа-TAA-зета TFP + Т-клетки или ложнотрансдуцированные Т-клетки. Кривые выживаемости в группах сравнивают посредством логарифмического рангового теста. Кроме того, также можно анализировать абсолютные количества CD4+ и CD8+ Т-клеток периферической крови через 4 недели после инъекции Т-клеток мышам NOD/SCID/γ-/-. Мышам инъецируют раковые клетки, а через 3 недели инъецируют Т-клетки, сконструированные с возможностью экспрессии TFP с помощью бицистронного линтивирусного вектора, который кодирует TFP, связанный с eGFP. Т-клетки нормализуют к 45–50% введенных GFP+ Т-клеток путем смешивания с ложнотрансдуцированными клетками перед инъекцией и подтверждают

содержание с помощью проточной цитометрии. Животных оценивают на предмет ракового заболевания с 1-недельными интервалами. Кривые выживаемости в группах TFP+ Т-клеток сравнивают посредством логарифмического рангового теста.

[00307] Можно оценивать 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 ракового заболевания у мышей, инъецированных на 21 день TFP-Т-клетками, эквивалентным количеством ложнотрансдуцированных Т-клеток или без инъекции Т-клеток. У мышей из каждой группы случайным образом берут кровь для определения количеств TAA+ раковых клеток периферической крови, а затем животных умерщвляют на 35 и 49 день. Оставшихся животных оценивают на 57 и 70 день.

[00308] 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 Т-клеток с клетками, экспрессирующими TAA, или CD32 и CD137 (KT32-BBL) для получения конечного соотношения Т-клеток с клетками, экспрессирующими TAA, равного 2:1. Перед использованием экспрессирующие TAA клетки облучают гамма-радиацией. Моноклональные антитела к CD3 (клон OKT3) и CD28 (клон 9.3) добавляют к культурам с клетками KT32-BBL в качестве положительного контроля для стимуляции пролиферации Т-клеток, поскольку такие сигналы поддерживают длительное размножение CD8+ Т-клеток *ex vivo*. Т-клетки в культурах подсчитывают с помощью флуоресцирующих гранул CountBright™ (Invitrogen) и проточной цитометрии, как описано у производителя. TFP+ Т-клетки идентифицируют по экспрессии GFP, используя Т-клетки, которые были сконструированы с помощью лентивирусных векторов экспрессирующих TFP, связанный с eGFP-2A. В случае TFP+ Т-клеток, которые не экспрессируют GFP, TFP+ Т-клетки определяют с помощью биотинилированного рекомбинантного белка TAA и вторичного конъюгата авидин-PE. Экспрессию CD4+ и CD8+ на Т-клетках также одновременно определяют с помощью специфических моноклональных антител (BD Biosciences). Измерения цитокинов выполняют в надосадочных жидкостях, собранных через 24 часа после рестимуляции, используя набор с массивом гранул для определения цитокинов TH1/TH2 человека (BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя. Флуоресценцию оценивают с помощью проточного цитометра FACScalibur, а данные анализируют в соответствии с инструкциями производителя.

[00309] Цитотоксичность могут оценивать с помощью стандартного анализа высвобождения ^{51}Cr (см., *например*, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453–1464

(2009)). Вкратце, клетки-мишени нагружают ^{51}Cr (в виде $NaCrO_4$, New England Nuclear) при температуре 37 °C в течение 2 часов с частым перемешиванием, дважды промывают в полной среде RPMI и высевают на планшеты для микротитрования. Эффекторные Т-клетки смешивают с клетками-мишенями в лунках в полной среде RPMI в различных соотношениях эффекторных клеток с клетками-мишенями (E:T). Готовят также дополнительные лунки, содержащие только среду (спонтанное высвобождение, СВ) или 1% раствор детергента тритон-X 100 (полное высвобождение, ПВ). Через 4 часа инкубации при температуре 37 °C собирают супернатант из каждой лунки. Затем измеряют высвобожденный ^{51}Cr с помощью счетчика гамма-частиц (Packard Instrument Co., Уолтем, штат Массачусетс). Каждое состояние измеряют по меньшей мере в трех повторностях, и процентное соотношение лизиса подсчитывают, используя следующую формулу: % лизиса = (ER - SR) / (TR - SR), где ER представляет среднее значение высвобожденного ^{51}Cr для каждого экспериментального условия.

[00310] 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). Вкратце, мышам NOD/SCID/γc-/- (NSG) в/в инъецируют раковые клетки, затем через 7 дней — Т-клетки через 4 часа после электропорации конструкциями TFP. Т-клетки стабильно трансфицируют лентивирусной конструкцией для экспрессии люциферазы светлячка, и мышей визуализируют на наличие биолюминесценции. Альтернативно, терапевтическую эффективность и специфичность одной инъекции TFP+ Т-клеток в раковой ксенотрансплантатной модели можно измерить следующим образом: мышам NSG инъецируют раковые клетки, трансдуцированные с возможностью стабильно экспрессировать люциферазу светлячка, с последующей одной инъекцией через 7 дней в хвостовую вену Т-клеток, которым ввели электропорацией TAA TFP. Животных визуализируют в различные моменты времени после инъекции. Например, можно получить тепловые карты плотности фотонов ракового заболевания, 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).

[00311] Для оценки конструкций TFP против TAA по настоящему изобретению также могут применяться другие анализы, включая анализы, описанные в разделе «Примеры» настоящего документа, а также анализы, известные в данной области техники.

Терапевтическое применение

Связанные с MUC16, IL13Rα2 и MSLN заболевания и/или нарушения

[00312] В одном аспекте в настоящем раскрытии предложены способы лечения

заболевания, связанного с экспрессией MUC16, IL13Rα2 или MSLN. В одном аспекте в настоящем раскрытии предложены способы лечения заболевания, причем часть опухоли является отрицательной по MUC16, IL13Rα2 или MSLN, а часть опухоли — положительной по MUC16, IL13Rα2 или MSLN. Например, TFP по настоящему раскрытию пригоден для лечения субъектов, которые получили лечение заболевания, связанного с повышенной экспрессией MUC16, IL13Rα2 или MSLN, причем субъект, который получил лечение вследствие повышенных уровней MUC16, IL13Rα2 или MSLN, демонстрирует заболевание, связанное с повышенными уровнями MUC16, IL13Rα2 или MSLN.

[00313] В одном аспекте в настоящем раскрытии вектор, содержащий TFP против TAA, функционально связан с промотором для экспрессии в Т-клетках млекопитающего. В одном аспекте в настоящем раскрытии предлагается рекомбинантная Т-клетка, экспрессирующая MUC16, IL13Rα2 или MSLN TFP для применения при лечении соответственно MUC16-, IL13Rα2- или MSLN-экспрессирующих опухолей, причем эта рекомбинантная Т-клетка, экспрессирующая MUC16, IL13Rα2 или MSLN TFP называется MUC16, IL13Rα2 MSLN TFP-T. В одном аспекте MUC16, IL13Rα2 или MSLN TFP-T по настоящему описанию способна к приведению в контакт с опухолевой клеткой с по меньшей мере одним MUC16, IL13Rα2 или MSLN TFP данного изобретения, экспрессируемым на ее поверхности, так что TFP-T нацеливается на опухолевую клетку, и рост опухоли подавляется.

[00314] В одном аспекте настоящее раскрытие относится к способу ингибирования роста MUC16-, IL13Rα2- или MSLN-экспрессирующей опухолевой клетки, включающему в себя приведение в контакт опухолевой клетки с TFP-T-клеткой против MUC16, против IL13Rα2 или против MSLN по настоящему раскрытию таким образом, что TFP-T активируется в ответ на антиген (например, антиген MUC16, IL13Rα2 или MSLN, присутствующий на поверхности раковой клетки) и нацеливается на раковую клетку, при этом рост опухоли подавляется.

[00315] В одном аспекте настоящее описание относится к способу лечения ракового заболевания у субъекта. Способ включает в себя введение субъекту TFP-T-клетки против TAA по настоящему изобретению, так что у субъекта лечится раковое заболевание. Примером ракового заболевания, подлежащего лечению TFP-T-клеткой против TAA по настоящему изобретению, является рак, связанный с экспрессией соответствующего TAA. В одном аспекте рак представляет собой мезотелиому. В одном аспекте рак представляет собой рак поджелудочной железы. В одном аспекте рак представляет собой рак яичника. В одном аспекте рак представляет собой рак желудка. В одном аспекте рак представляет собой рак легкого. В одном аспекте рак представляет собой рак эндометрия. В некоторых вариантах осуществления терапия с помощью TFP против TAA может применяться в

комбинации с одним или более дополнительных видов лечения.

[00316] Настоящее раскрытие включает в себя тип клеточной терапии, при которой Т-клетки генетически модифицируют для экспрессии TFP, и TFP-экспрессирующую Т-клетку вводят инфузией нуждающемуся в этом реципиенту. Вводимая инфузией клетка способна уничтожать опухолевые клетки у реципиента. В отличие от терапии антителами TFP-экспрессирующие клетки способны к репликации *in vivo*, что приводит к длительной стойкости, способной приводить к устойчивому контролю над опухолью. В различных аспектах вводимые пациенту Т-клетки или их потомство сохраняются у пациента в течение по меньшей мере одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, 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.

[00317] Настоящее изобретение также включает в себя тип клеточной терапии, при которой Т-клетки модифицируют, *например* с помощью транскрибированной *in vitro* РНК, для временной экспрессии TFP, и TFP-экспрессирующую Т-клетку вводят инфузией нуждающемуся в этом реципиенту. Вводимая инфузией клетка способна уничтожать 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.

[00318] Без привязки к какой-либо конкретной теории противоопухолевый иммунный ответ, вызываемый TFP-экспрессирующими Т-клетками, может представлять собой активный или пассивный иммунный ответ или, альтернативно, может быть обусловлен прямым или непрямым иммунным ответом. В одном аспекте TFP-трансдуцированные Т-клетки демонстрируют специфическую секрецию провоспалительных цитокинов и сильную цитолитическую активность в ответ на человеческие раковые клетки, экспрессирующие опухолеассоциированный антиген (TAA) (например, MUC16, IL13Rα2 или MSLN), противостоят ингибированию растворимым TAA, опосредуют неспецифический цитолиз и/или опосредуют регрессию установленной опухоли человека. Например, содержащие меньшее количество антигена опухолевые клетки в пределах неоднородного поля TAA-экспрессирующей опухоли могут быть чувствительны к непрямому разрушению TAA-перенаправленными Т-клетками, которые ранее оказывали противодействие смежным антиген-положительным раковым клеткам.

[00319] В одном аспекте человеческие TFP-модифицированные Т-клетки по настоящему раскрытию могут представлять собой вид вакцины для иммунизации *ex vivo* и/или терапии *in vivo* у млекопитающего. В одном аспекте млекопитающее представляет собой человека.

[00320] 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, или iii) криоконсервация клеток.

[00321] *Процедуры ex vivo* хорошо известны в данной области техники и более подробно описываются ниже. Вкратце, клетки выделяют у млекопитающего (*например*, человека) и генетически модифицируют (т. е. трансдуцируют или трансфицируют *in vitro*) с помощью вектора, экспрессирующего TFP, описанного в настоящем документе. TFP-модифицированную клетку могут вводить млекопитающему-реципиенту для обеспечения терапевтической пользы. Млекопитающее-реципиент может быть человеком, и TFP-модифицированная клетка может быть аутологической по отношению к реципиенту. Альтернативно, клетки могут быть аллогенными, сингенными или ксеногенными по отношению к реципиенту.

[00322] Процедура размножения *ex vivo* гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников описана в патенте США № 5 199 942, 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 изобретении не ограничивается каким-либо конкретным способом размножения клеток *ex vivo*. Вкратце, культивирование и размножение Т-клеток *ex vivo* содержит: (1) выделение CD34+ гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников 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 № 5 199 942, для культивирования и размножения клеток необязательно можно использовать другие факторы, такие как flt3-L, IL-1, IL-3 и лиганд c-kit.

[00323] Помимо использования вакцины на основе клеток с точки зрения иммунизации *ex vivo*, в настоящем изобретении также предложены композиции и способы иммунизации *in vivo* с целью вызвать иммунный ответ, направленный против антигена у пациента.

[00324] В целом, клетки, активированные и размноженные так, как описано в настоящем документе, могут использоваться для лечения и предотвращения заболеваний, которые возникают у индивидов с ослабленным иммунитетом. В частности, TFP-модифицированные Т-клетки по настоящему изобретению используются для лечения

заболеваний, нарушений и состояний, связанных с экспрессией MUC16, IL13Rα2 или MSLN. В некоторых аспектах Т-клетки по настоящему изобретению используются для лечения пациентов, подверженных риску развития заболеваний, нарушений и состояний, связанных с экспрессией MUC16, IL13Rα2 или MSLN. Таким образом, в настоящем изобретении предложены способы для лечения или предотвращения заболеваний, нарушений и состояний, связанных с экспрессией MUC16, IL13Rα2 или MSLN, включающие в себя введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества TFP-модифицированных Т-клеток по настоящему раскрытию.

[00325] В одном аспекте TFP-Т-клетки по настоящему раскрытию могут использоваться для лечения пролиферативного заболевания, такого как рак, или злокачественная опухоль, или предраковое состояние. В одном аспекте рак представляет собой мезотелиому. В одном аспекте рак представляет собой рак поджелудочной железы. В одном аспекте рак представляет собой рак яичника. В одном аспекте рак представляет собой рак желудка. В одном аспекте рак представляет собой рак легкого. В одном аспекте рак представляет собой рак молочной железы. В одном аспекте рак представляет собой рак эндометрия. Более того, заболевание, связанное с экспрессией MUC16, IL13Rα2 или MSLN, включает в себя, помимо прочего, например, атипичные и/или неклассические раковые заболевания, злокачественные опухоли, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, экспрессирующие MUC16, IL13Rα2 или MSLN. Неонкологические показания, ассоциированные с экспрессией MUC16, IL13Rα2 или MSLN, включают, но не ограничивается ими, например, аутоиммунное заболевание (например, волчанку), воспалительные нарушения (аллергия и астма), воспалительное заболевание кишечника, цирроз печени, сердечную недостаточность, перитонеальную инфекцию и хирургию или трансплантацию органов брюшной полости.

[00326] TFP-модифицированные Т-клетки по настоящему раскрытию можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или другими компонентами, такими как IL-2, или другими цитокинами, или популяциями клеток.

[00327] В настоящем изобретении также предложены способы ингибирования пролиферации или сокращения популяции TAA-экспрессирующих клеток, причем способы включают в себя приведение в контакт популяции клеток, содержащей TAA-экспрессирующие клетки, с TFP-Т-клеткой против TAA по настоящему раскрытию, которая связывается с TAA-экспрессирующей клеткой. В одном аспекте в настоящем раскрытии предложены способы ингибирования пролиферации или сокращения популяции раковых клеток, экспрессирующих TAA, причем способы включают в себя приведение в

контакт популяции ТАА-экспрессирующих раковых клеток с TFP-Т-клеткой против ТАА по настоящему раскрытию, которая связывается с ТАА-экспрессирующей клеткой. В одном аспекте в настоящем раскрытии предложены способы ингибирования пролиферации или сокращения популяции раковых клеток, экспрессирующих опухолеассоциированный антиген, причем способы включают в себя приведение в контакт популяции ТАА-экспрессирующих раковых клеток с TFP-Т-клеткой против ТАА по настоящему раскрытию, которая связывается с ТАА-экспрессирующей клеткой. В некоторых аспектах TFP-Т-клетка против ТАА по настоящему раскрытию сокращает численность, число, количество или процентное содержание клеток и/или раковых клеток на по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% у субъекта или в животной модели с раковым заболеванием, связанным с ТАА-экспрессирующими клетками, по отношению к отрицательному контролю. В одном аспекте субъект представляет собой человека.

[00328] В настоящем раскрытии также предложены способы предотвращения, лечения и/или сдерживания заболевания, связанного с ТАА-экспрессирующими клетками (*например*, рака, экспрессирующего ТАА), причем способы включают в себя введение нуждающемуся субъекту TFP-Т-клетки против ТАА по настоящему раскрытию, которая связывается с ТАА-экспрессирующей клеткой. В одном аспекте субъект представляет собой человека. К неограничивающим примерам нарушений, связанных с ТАА-экспрессирующими клетками, относятся аутоиммунные заболевания (такие как волчанка), воспалительные заболевания (такие как аллергии и астма) и раковые заболевания (такие как рак поджелудочной железы, рак яичника, рак желудка, рак легкого или рак эндометрия или атипичные раковые заболевания, экспрессирующие ТАА).

[00329] В настоящем изобретении также предложены способы предотвращения, лечения и/или сдерживания заболевания, связанного с ТАА-экспрессирующими клетками, причем способы включают в себя введение нуждающемуся субъекту TFP-Т-клетки против ТАА по настоящему раскрытию, которая связывается с ТАА-экспрессирующей клеткой. В одном аспекте субъект представляет собой человека.

[00330] В настоящем раскрытии предложены способы предотвращения рецидива ракового заболевания, связанного с ТАА-экспрессирующими клетками, причем способы включают в себя введение нуждающемуся в этом субъекту TFP-Т-клетки против ТАА по настоящему раскрытию, которая связывается с ТАА-экспрессирующей клеткой. В одном аспекте способы включают в себя введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества TFP-Т-клетки против ТАА, описанной в настоящем документе, которая

связывается с TAA-экспрессирующей клеткой, в комбинации с эффективным количеством другого терапевтического препарата.

Комбинированная терапия

[00331] TFP-экспрессирующая 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.

[00332] В некоторых вариантах осуществления «по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое вещество» включает в себя TFP-экспрессирующую клетку. Также предложены Т-клетки, которые экспрессируют множество TFP, 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, а вторая субпопуляция Т-клеток экспрессирует второй TFP.

[00333] TFP-экспрессирующая 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 TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, может вводиться первой, а дополнительное вещество может вводиться вторым, либо же порядок введения может быть противоположным.

[00334] В дополнительных аспектах TFP-экспрессирующая 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, FK506, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, FR901228, цитокины, и облучением. TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, также может использоваться в комбинации с пептидной вакциной, такой как описанная у Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963–971. В дополнительном аспекте TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, также может использоваться в комбинации с промотором дифференцировки миелоидных клеток (например, полностью транс-ретиноевая кислота), ингибитором размножения супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC) (например, ингибиторы рецептора c-kit или ингибитор VEGF), ингибированием функции MDSC (например, ингибиторы COX2 или ингибиторы фосфодиэстеразы-5) или терапевтическим устранением MDSC (например, с помощью химиотерапевтических схем, таких как лечение доксорубицином и циклофосфамидом). К другим терапевтическим веществам, которые могут предотвращать размножение MDSC, относится амино-бисфосфонат, бисфосфонат, силденафил и тадалафил, нитроаспирин, витамин D3 и гемцитабин. (См., например, Gabrilovich and Nagaraj, *Nat. Rev. Immunol*, (2009) v9(3): 162–174).

[00335] В одном варианте осуществления субъекту могут вводить вещество, которое снижает или облегчает побочный эффект, связанный с введением TFP-экспрессирующей клетки. Побочные эффекты, связанные с введением TFP-экспрессирующей 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 TFP-экспрессирующей клетки,

описанной в настоящем документе, субъекту и дополнительное введение вещества для сдерживания повышенных уровней растворимого фактора, возникающих вследствие лечения TFP-экспрессирующей клеткой. В одном варианте осуществления растворимый фактор, повышенный у субъекта, представляет собой один или более из IFN-γ, TNFα, IL-2, IL-6 и IL8. 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 TNFα и ингибитор IL-6. Примером ингибитора TNFα является энтанерсепт. Примером ингибитора IL-6 является тоцилизумаб (toc).

[00336] В одном варианте осуществления субъекту могут вводить вещество, которое повышает активность TFP-экспрессирующей 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 TFP-экспрессирующей клетки установить 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 TFP-экспрессирующей клетки. В вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота, *например* ингибирующая нуклеиновая кислота, *например* дсРНК, *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 TFP-экспрессирующей клетки. В этих вариантах осуществления молекула дсРНК, 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™; Bristol-Myers Squibb; тремелимумаб (моноклональное антитело IgG2, доступное от компании Pfizer, ранее известный 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.

[00337] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут быть изменены (например, путем генного переноса) *in vivo* с помощью лентивируса, например лентивируса, специфически нацеленного на CD4+ или CD8+ Т-клетку. (См., например, Zhou et al., J. Immunol. (2015) 195:2493–2501).

[00338] В некоторых вариантах осуществления вещество, которое повышает активность TFP-экспрессирующей клетки, может представлять собой, *например*, гибридный 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 первичный сигнальный домен, *например* CD3 дзета, *например*, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления гибридный белок экспрессируется той же клеткой, которая экспрессирует TFP. В другом варианте осуществления гибридный белок экспрессируется клеткой, *например* Т-клеткой, которая не экспрессирует TFP против TAA.

Фармацевтические композиции

[00339] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать TFP-экспрессирующую клетку, *например* множество TFP-экспрессирующих клеток, как описано в настоящем документе, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. 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.

[00340] 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.

[00341] В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по существу не

содержит, *например* в ней отсутствуют определяемые уровни загрязняющего вещества, *например*, выбранного из группы, состоящей из эндотоксина, микоплазмы, компетентного по репликации лентивируса (RCL), p24, нуклеиновой кислоты VSV-G, gag ВИЧ, остаточных гранул, покрытых антителами к CD3/CD28, мышиных антител, смешанной сыворотки человека, бычьего сывороточного альбумина, бычьей сыворотки, компонентов культуральной среды, клеточных или плазмидных компонентов упаковывающего вектора, а также бактерий и грибков. 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 A.

[00342] Когда указывается «иммунологически эффективное количество», «противоопухолевое эффективное количество», «ингибирующее опухоль эффективное количество» или «терапевтическое количество», точное количество композиций по настоящему раскрытию, 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).

[00343] 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 активируют во взятых порциях крови объемом от 10 куб. см до 400 куб. см. В некоторых аспектах Т-клетки активируют во взятых порциях 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.

[00344] 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, внутрикожно, внутриопухолево,

интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной (в/в) инъекции или внутрибрюшинно. В одном аспекте композиции Т-клетки по настоящему изобретению вводят пациенту путем внутрикожной или подкожной инъекции. В одном аспекте композиции Т-клеток по настоящему изобретению вводят путем в/в инъекции. Композиции Т-клеток могут инъецировать непосредственно в опухоль, лимфатический узел или в область инфекции.

[00345] В конкретном иллюстративном аспекте субъекты могут подвергаться лейкаферезу, при котором собирают, обогащают или деплецируют лейкоциты *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 раскрытию, таким образом, создавая модифицированную TFP-экспрессирующую 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 TFP Т-клеток по настоящему раскрытию. В дополнительном аспекте размноженные клетки вводят до операции или после нее.

[00346] Дозировка вышеприведенных требующих введения пациенту видов лечения будет варьироваться в зависимости от точной природы 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 № 6 120 766).

[00347] 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 раскрытию и одно или более последующих введений TFP-Т-клеток по настоящему раскрытию, 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 раскрытию в неделю, *например* выполняют 2, 3 или 4 введения TFP-Т-клеток по настоящему раскрытию 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.

[00348] В одном аспекте TFP-Т-клетки к TAA получают с помощью лентивирусных вирусных векторов, таких как лентивирус. Полученные таким образом TFP-Т-клетки будут иметь устойчивую экспрессию TFP.

[00349] 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.

[00350] Потенциальной проблемой, которая может возникнуть у пациентов, получающих лечение с помощью Т-клеток, временно экспрессирующих TFP (в частности с помощью мышиных TFP-Т-клеток, несущих scFv), является анафилаксия после нескольких лечений.

[00351] 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.

[00352] Если пациент подвержен высокому риску развития ответа на антитела к TFP в ходе лечения терапией с временными TFP (например, полученными путем трансдукции РНК), перерывы в инфузии TFP-Т-клеток не должны длиться более, чем от десяти до четырнадцати дней.

Высвобождение цитокинов

[00353] Синдром высвобождения цитокинов является одной из форм синдрома системной воспалительной реакции, который возникает как осложнение некоторых заболеваний или инфекций, а также является неблагоприятным эффектом некоторых препаратов моноклональных антител, а также видов адоптивной Т-клеточной терапии. TFP-Т-клетки

могут проявлять лучшую уничтожающую активность, чем CAR-T-клетки. Введенные субъекту TFP-T-клетки могут проявлять лучшую уничтожающую активность, чем введенные субъекту CAR-T-клетки. Это может быть одним из преимуществ TFP-T-клеток по сравнению с CAR-T-клетками. TFP-T-клетки могут вызывать меньшее высвобождение цитокинов, чем CAR-T-клетки. Введенные субъекту TFP-T-клетки могут вызывать меньшее высвобождение цитокинов, чем введенные субъекту CAR-T-клетки. Это может быть одним из преимуществ терапий TFP-T-клетками по сравнению с терапиями CAR-T-клетками. TFP-T-клетки могут проявлять схожую или лучшую уничтожающую активность, чем CAR-T-клетки, и TFP-T-клетки могут вызывать меньшее высвобождение цитокинов, чем CAR-T-клетки. Введенные субъекту TFP-T-клетки могут проявлять схожую или лучшую уничтожающую активность, чем введенные субъекту CAR-T-клетки, и у субъекта может происходить меньшее высвобождение цитокинов, чем у субъекта, которому введены CAR-T-клетки. Это может быть одним из преимуществ терапий TFP-T-клетками по сравнению с терапиями CAR-T-клетками.

[00354] В некоторых случаях высвобождение цитокинов при лечении TFP-T-клетками меньше, чем высвобождение цитокинов при лечении CAR-T-клетками. В некоторых вариантах осуществления высвобождение цитокинов при лечении TFP-T-клетками составляет по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% меньше, чем высвобождение цитокинов при лечении CAR-T-клетками. При лечении TFP-T-клетками различные цитокины могут высвобождаться, чем при лечении CAR-T-клетками. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-2, IFN-γ, IL-4, TNF-α, IL-6, IL-13, IL-5, IL-10, sCD137, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β или их комбинацию. В некоторых случаях лечение TFP-T-клетками высвобождает меньше перфорина, гранзима A, гранзима B или их комбинации, чем лечение CAR-T клетками. В некоторых вариантах осуществления перфорин, гранзим A или гранзим B, высвобождается при обработке TFP-T-клетками по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 60% меньше, чем при лечении CAR-T-клетками.

[00355] В некоторых вариантах осуществления для данного цитокина после лечения высвобождается по меньшей мере на 10% меньше данного цитокина по сравнению с количеством данного цитокина млекопитающего, получившего лечение CAR-T-клеткой, содержащей тот же домен человеческого или гуманизированного антитела. В некоторых вариантах осуществления данный цитокин содержит один или более цитокинов,

выбранных из группы, состоящей из IL-2, IFN-γ, IL-4, TNF-α, IL-6, IL-13, IL-5, IL-10, sCD137, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β и любой их комбинации.

[00356] TFP-Т-клетки могут проявлять подобную или лучшую активность при уничтожении опухолевых клеток, чем CAR-Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления рост опухоли у млекопитающего подавляется таким образом, что размер опухоли составляет не более 10%, не более 20%, не более 30%, не более 40%, не более 50%, или не более 60% от размера опухоли у млекопитающего, получившего лечение Т-клетками, которые не экспрессируют TFP, после по меньшей мере 8 дней лечения, причем млекопитающее, получившее лечение Т-клетками, экспрессирующими TFP, и млекопитающее, получившее лечение Т-клетками, которые не экспрессируют TFP, имеют одинаковый размер опухоли до начала лечения. В некоторых вариантах осуществления рост опухоли у млекопитающего полностью подавляется. В некоторых вариантах осуществления рост опухоли у млекопитающего полностью подавляется в течение по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 40 дней, по меньшей мере 50 дней, по меньшей мере 60 дней, по меньшей мере 70 дней, по меньшей мере 80 дней, по меньшей мере 90 дней, по меньшей мере 100 дней или более. В некоторых вариантах осуществления популяция Т-клеток, трансдуцированных TFP, уничтожает сходное количество опухолевых клеток по сравнению с CAR-Т-клетками, содержащими аналогичный домен человеческого или гуманизированного антитела.

[00357] TFP-Т-клетки могут иметь иной профиль экспрессии генов, чем клетки, которые не экспрессируют TFP. В некоторых случаях TFP-Т-клетки могут проявлять подобные профили экспрессии генов, как и CAR-Т-клетки. В некоторых других случаях TFP-Т-клетки могут проявлять отличающиеся от CAR-Т-клеток профили экспрессии генов. В некоторых вариантах осуществления популяция Т-клеток, трансдуцированных TFP, имеет отличающийся профиль экспрессии генов от CAR-Т-клеток, содержащих аналогичный домен человеческого или гуманизированного антитела. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена отличается в Т-клетках, трансдуцированных TFP, от уровня экспресии этого гена в CAR-Т-клетках, содержащих аналогичный домен человеческого или гуманизированного антитела. В некоторых вариантах осуществления ген выполняет функцию презентации антигена, сигнализации TCR, гомеостаза, метаболизма, хемокиновой сигнализации, цитокиновой сигнализации, toll-подобной рецепторной сигнализации, сигнализации MMP и молекул адгезии или связанной с TNFR сигнализации.

ПРИМЕРЫ

[00358] 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, настоящее раскрытие 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 обычный 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 раскрытия, и их не следует интерпретировать как ограничивающие каким-либо образом остальную часть описания.

Пример 1. Конструкции TFP

[00359] Конструкции TFP против TAA могут конструировать путем клонирования фрагмента ДНК домена V_{HH} против TAA (или домена SD), связанного с фрагментом ДНК CD3 или TCR либо последовательностью ДНК, кодирующей короткий линкер (КЛ): AAAGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:2), либо длинный линкер (ДЛ): AAAIEVMYPPPYLGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:3), в вектор p510 ((System Biosciences (SBI)) по сайтам XbaI и EcoR1. Могут также использовать другие векторы, например вектор pLRPO.

[00360] Примеры создаваемых конструкций TFP против TAA включают в себя p510_анти-TAA_LL_TCRα (V_{HH} против TAA — длинный линкер — полноразмерная α-цепь Т-клеточного рецептора человека), p510_TAA_LL_TCR αC (V_{HH}против TAA — длинный линкер — α-цепь константного домена Т-клеточного рецептора человека), p510_анти-TAA_LL_TCRβ (V_{HH} против TAA — длинный линкер — полноразмерная β-цепь Т-клеточного рецептора человека), p510_анти-TAA_LL_TCRβC (V_{HH} против TAA — длинный линкер — β-цепь константного домена Т-клеточного рецептора человека), p510_анти-TAA _LL_CD3γ (V_{HH} против TAA — длинный линкер — CD3γ-цепь человека), p510_анти-TAA_LL_CD3δ (V_{HH} против TAA — длинный линкер — CD3δ-цепь человека), p510_ анти-TAA _LL_CD3ε (V_{HH} против TAA — длинный линкер — CD3ε-цепь человека), p510_анти-TAA_SL_TCRβ (V_{HH} против TAA — короткий линкер — полноразмерная β-цепь Т-клеточного рецептора человека), p510_анти-TAA _SL_CD3γ (V_{HH} против TAA — короткий линкер — CD3γ-цепь человека), p510_анти-TAA _SL_CD3δ (V_{HH} против TAA — короткий линкер — CD3δ-цепь человека), p510_анти-TAA _SL_CD3ε (V_{HH} против TAA — короткий линкер — CD3ε-цепь человека).

[00361] Фрагмент против MUC16, используемый в данном документе, может представлять собой MUC16-специфический scFv человека, например 4H11.

[00362] Пример соответствующей конструкции анти-MUC16, анти-IL13Ra2 или анти-MSLN A CAR, p510_анти-TAA_28ζ может быть создан путем клонирования синтезированной ДНК, кодирующей анти-TAA, части внеклеточного домена CD28, трансмембранного домена CD28, внутриклеточного домена CD28 и CD3-дзета в вектор p510 по сайтам XbaI и EcoR1.

[00363] Для создания конструкций гибридных белков могут быть использованы различные другие векторы.

Пример 2. Последовательности антител

Получение последовательностей антител

Получение scFv

[00364] Человеческие или гуманизированные IgG против TAA используются для получения scFv-последовательностей для конструкций TFP. Могут получать последовательности ДНК, кодирующие человеческие или гуманизированные домены V_L и V_H, и кодоны для этих конструкций могут необязательно оптимизировать для экспрессии в клетках Homo sapiens. Порядок, в котором домены V_L и V_H появляются в scFv, различен (т. е. ориентация V_L–V_H или V_H–V_L), и для создания scFv-домена соединяют три копии субъединицы G4S или G_4S $(G_4S)_3$ вариабельные домены. Плазмидные конструкции scFv против TAA могут иметь необязательные метки аффинности Flag, His или другие, и такие конструкции электропорируют в HEK293 или другие подходящие клеточные линии человека или млекопитающего и очищают. Валидационные анализы включают в себя анализ связывания методом FACS, кинетический анализ с использованием Proteon и окрашивание MUC16-, IL13Rα2- или MSLN-экспрессирующих клеток.

[00365] В некоторых публикациях и/или коммерческих источниках могут указываться примеры связывающих доменов против MUC16, против IL13Rα2 или против MSLN против, включая домены V_L, V_H и CDR, которые могут быть использованы с описанными в данном документе композициями и способами. Например, определенные антитела к MUC16, включая 3A5 и 11D10, были описаны в WO 2007/001851, содержание которой включен посредством ссылки. Моноклональное антитело 3A5 связывает множество сайтов полипептида MUC16 с аффинностью 433 пМ по результатам анализа Скетчарда OVCAR-3. Примеры доменов VL и VH, CDR и, соответственно, кодирующих их нуклеотидных последовательностей, могут взяты из следующих моноклональных антител: GTX10029, GTX21107, MA5-124525, MA5-11579, 25450002, ABIN1584127, ABIN93655, 112889, 120204, LS-C356195, LS-B6756, TA801241, TA801279, V3494, V3648, 666902, 666904,

HPA065600, AMAb91056.

[00366] Каноническую полипептидную последовательность IL13Rα2 человека можно найти под учетным номером Uniprot № Q14627. предложены полипептиды антител, которые способны специфически связываться с человеческим полипептидом MUC16, IL13Rα2 или MSLN, а также его фрагментами или доменами. Антитела к TAA могут быть получены с помощью различных методик (см., *например*, Nicholson et al, 1997). Когда мышиные антитела к TAA используются в качестве исходного материала, гуманизация мышиных антител к TAA является желаемой в клинических условиях, когда мышиные специфические остатки могут индуцировать ответ человеческих антител против мышиного антигена (HAMA) у субъектов, которые получают лечение гибридным белком (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), т. е. лечение Т-клетками, трансдуцированными конструкциями TFP.TAA. Гуманизацию осуществляют путем прививки областей CDR мышиного антитела к TAA на соответствующие акцепторные каркасы человеческой зародышевой линии, необязательно включая другие модификации областей CDR и/или каркасных областей. Как представлено в настоящем документе, нумерация остатков антитела или фрагмента антитела осуществляется согласно Kabat (Kabat E. A. et al, 1991; Chothia et al, 1987).

Однодоменные связывающие белки

[00367] Верблюжьи и другие однодоменные антитела также могут использовать для создания конструкций против MUC16, IL13Rα2, MSLN или других конструкций против опухолевых антигенов TFP. Домен V_{HH} может использоваться для гибридизации с различными субъединицами TCR. В некоторых вариантах осуществления используются такие однодоменные (например, V_{HH}) связывающие белки, как представленные в таблице 4 (см., например, неограничивающие примеры SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:97 ИЛИ SEQ ID NO:98). Получение однодоменных антител к TAA дополнительно описано в примерах 3 и 5.

Источники субъединиц TCR

[00368] Все субъединицы комплекса человеческого Т-клеточного рецептора (TCR) содержат внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Комплекс человеческого TCR содержит полипептид CD3-эпсилон, полипептид CD3-гамма, полипептид CD3-дельта, полипептид CD3-дзета, полипептид альфа-цепи TCR и полипептид бета-цепи TCR. Каноническую полипептидную последовательность CD3-эпсилон человека можно найти под учетным номером Uniprot P07766. Каноническую

полипептидную последовательность CD3-гамма человека можно найти под учетным номером Uniprot P09693. Каноническую полипептидную последовательность CD3-дельта человека можно найти под учетным номером Uniprot P043234. Каноническую полипептидную последовательность CD3-дзета человека можно найти под учетным номером Uniprot P20963. Каноническую последовательность альфа-цепи TCR человека можно найти под учетным номером Uniprot Q6ISU1. Каноническую последовательность C-области бета-цепи TCR человека можно найти под учетным номером Uniprot P01850, последовательность V-области бета-цепи TCR человека — под номером P04435.

[00369] Каноническая полипептидная последовательность CD3-эпсилон человека представляет собой: MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILW QHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARV CENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQ NKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI (SEQ ID NO:4).

[00370] Каноническая полипептидная последовательность CD3-гамма человека представляет собой: MEQGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDG KMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATIS GFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVRQSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQ GNQLRRN (SEQ ID NO:5).

[00371] Каноническая полипептидная последовательность CD3-дельта человека представляет собой: MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLG KRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLALG VFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNKS (SEQ ID NO:6).

[00372] Каноническая полипептидная последовательность CD3-дзета человека представляет собой: MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:7).

[00373] Каноническая полипептидная последовательность альфа-цепи TCR человека представляет собой: MAGTWLLLLLALGCPALPTGVGGTPFPSLAPPIMLLVDGKQQMVVVCLVLDVAPPGLD SPIWFSAGNGSALDAFTYGPSPATDGTWTNLAHLSLPSEELASWEPLVCHTGPGAEGHS

RSTQPMHLSGEASTARTCPQEPLRGTPGGALWLGVLRLLLFKLLLFDLLLTCSCLCDPA GPLPSPATTTRLRALGSHRLHPATETGGREATSSPRPQPRDRRWGDTPPGRKPGSPVWG EGSYLSSYPTCPAQAWCSRSALRAPSSSLGAFFAGDLPPPLQAGAA (SEQ ID NO:8).

[00374] Каноническая полипептидная последовательность С-области альфа-цепи TCR человека представляет собой: PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFK SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIG FRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:9).

[00375] Каноническая полипептидная последовательность CTL-L17 V-области альфа-цепи TCR человека представляет собой: MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDY FLWYKKYPAEGPTFLISISSIKDKNEDGRFTVFLNKSAKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAAK GAGTASKLTFGTGTRLQVTL (SEQ ID NO:10).

[00376] Каноническая полипептидная последовательность С-области бета-цепи TCR человека представляет собой: EDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTD PQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRK DF (SEQ ID NO:11).

[00377] Каноническая полипептидная последовательность CTL-L17 V-области бета-цепи TCR человека представляет собой: MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQNPRHNITKRGQNVTFRCDPISEHNRLYWYRQT LGQGPEFLTYFQNEAQLEKSRLLSDRFSAERPKGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSLAG LNQPQHFGDGTRLSIL (SEQ ID NO:12).

[00378] Каноническая полипептидная последовательность YT35 V-области бета-цепи TCR человека представляет собой: MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHNSLFWYRQTM MRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSFSTCS ANYGYTFGSGTRLTVV (SEQ ID NO:13).

Получение TFP из доменов TCR и scFv

[00379] scFv MUC16, IL13Rα2 или MSLN могут быть рекомбинантно связаны с CD3-эпсилон или другими субъединицами TCR с использованием линкерной последовательности, такой как G_4S, $(G_4S)_2$ $(G_4S)_3$ или $(G_4S)_4$. Могут использоваться различные линкеры и конфигурации scFv. Альфа- и бета-цепи TCR могут использовтся для получения TFP в качестве полноразмерных полипептидов или только их константных

доменов. Любая вариабельная последовательность альфа-цепи TCR и бета-цепи TCR может использоваться для создания TFP.

Векторы экспрессии TFP

[00380] предложены векторы экспрессии, которые включают в себя: промотор (промотор с энхансером цитомегаловируса (CMV)), сигнальную последовательность для осуществления секреции, сигнал полиаденилирования и терминатор транскрипции (ген бычьего гормона роста (BGH)), элемент, обеспечивающий эписомальную репликацию и репликацию у прокариот (*например*, сайт начала репликации SV40 и ColE1 или другие, известные в данной области техники), и элементы для обеспечения селекции (ген резистентности к ампициллину и зеоциновый маркер).

[00381] Конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP, могут клонировать в лентивирусный вектор экспрессии, и экспрессию подтверждают на основании количества и качества эффекторного Т-клеточного ответа TFP.TAA-трансдуцированных Т-клеток («TAA.TFP», или «TAA.TFP-Т-клетки», или «TFP.TAA», или «TFP.TAA.Т-клетки») в ответ на TAA+ клетки-мишени, где TAA представляет собой, например, MUC16, IL13Ra2 или MSLN. Эффекторные ответы Т-клеток включают в себя, помимо прочего, клеточное размножение, пролиферацию, удвоение, выработку цитокинов и лизис клеток-мишеней или цитолитическую активность (т. е. дегрануляцию).

[00382] Лентивирусные векторы переноса TFP против TAA могут использоваться для выработки геномного материала, упакованного в псевдотипированные лентивирусные частицы VSV-G. ДНК лентивирусного вектора переноса смешивают с тремя упаковывающими компонентами VSV-G, gag/pol и rev в комбинации с реагентом Lipofectamine® для трансфицирования их вместе в клетки HEK-293 (почки эмбриона, TCC® CRL-1573™). Через 24 и 48 часов среду собирают, фильтруют и концентрируют ультрацентрифугированием. Полученный вирусный препарат хранят при температуре -80 °C. Количество трансдуцированных единиц определяют титрованием на клетках Sup-T1 (Т-клеточная лимфобластная лимфома, ATCC® CRL-1942™). Перенаправленные TFP-Т-клетки получают путем активации свежих наивных Т-клеток, например с помощью гранул против CD3 и CD28 в течение 24 часов, а затем добавления соответствующего количества трансдуцированных единиц для получения желаемого процентного содержания трансдуцированных Т-клеток. Эти модифицированные Т-клетки оставляют размножаться, пока они не перейдут в состояние покоя и не уменьшатся в размере, после чего их криоконсервируют для последующего анализа. Количества и размеры клеток измеряют с помощью Coulter Multisizer™ III. Перед криоконсервацией определяют процентное содержание трансдуцированных клеток (экспрессирующих TFP на клеточной поверхности)

и относительную интенсивность флуоресценции такой экспрессии с помощью анализа методом проточной цитометрии. На графиках гистограмм изучают относительные уровни экспрессии TFP путем сравнения процентного содержания трансдуцированных клеток с их относительной интенсивностью флуоресценции.

[00383] В некоторых вариантах осуществления вводят множество TFP путем Т-клеточной трансдукции при помощи множества вирусных векторов.

Оценка цитолитической активности, возможностей пролиферации и секреции цитокинов гуманизированных TFP-перенаправленных Т-клеток

[00384] Функциональные возможности TFP-Т-клеток по выработке экспрессируемых на клеточной поверхности TFP, а также по уничтожению опухолевых клеток-мишеней, пролиферации и секреции цитокинов определяют с помощью анализов, известных в данной области техники.

[00385] Человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC, *например*, кровь нормального донора после афереза, чьи наивные Т-клетки были получены путем отрицательной селекции Т-клеток, CD4+ и CD8+ лимфоцитов) обрабатывают человеческим интерлейкином-2 (IL-2), затем активируют с помощью гранул против CD3x и CD28, *например* в 10% RPMI при температуре 37°C, 5% CO_2 перед трансдукцией лентивирусными векторами, кодирующими TFP. Анализы методом проточной цитометрии используют для подтверждения присутствия на клеточной поверхности TFP, например, с помощью антитела к FLAG или антитела с антимышиным вариабельным доменом. Выработка цитокинов (*например*, IFN-γ) измеряется с помощью твердофазного ИФА или других анализов.

Пример 3. Выработка нанотел против IL13Rα2

Конструирование библиотек

Иммунизация

[00386] На сутки 0, 7, 14, 21, 28 и 35 каждый раз ламе подкожно вводили около 150 мкг рекомбинантного IL13Rα2 человека гибридизированного с Fc-доменом IgG1 человека (hIL13Rα2-Fc) (R&D Systems). Использованный адъювант представлял собой адъювант P GERBU (GERBU Biotechnik GmbH). На сутки 40 отбирали около 100 мл антикоагулированной крови ламы для получения лимфоцитов.

Конструирование библиотеки VHH

[00387] Конструировали библиотеку V_{HH} из лимфоцитов ламы для скрининга присутствия антиген-специфических нанотел. С этой целью в качестве шаблона для синтеза первой цепи кДНК с помощью олиго(дТ) праймера использовали общую РНК из лимфоцитов периферической крови. Используя эту кДНК, кодирующие V_{HH} последовательности

амплифицировали методом ПЦР, расщепляли с помощью PstI и NotI и клонировали в сайты PstI и NotI фагмидного вектора pMECS. Полученную, таким образом, библиотеку V_{HH} назвали Core 94. Данная библиотека состоит из около $7x10^8$ независимых трансформантов, причем 100% трансформантов содержат вектор с правильным размером вставки.

Выделение IL13Rα2-специфических нанотел человека

[00388] Библиотеку Core 94 сортировали за 3 цикла на твердой фазе, покрытой (100 мкл/мл в 100 мМ $NaHCO_3$ pH 8,2) антигеном hIL13Rα2 : антигеном hIL13Rα2-Fc, подвергшимися удалению Fc с помощью фактора Xa. Связывание фагов с любым оставшимся Fc IgG1 человека на антигене, нанесенном на лунку, и любым загрязняющим фактором Xa конкурировало с рекомбинантными человеческими Fc IgG1 (R&D Systems, № 110-HG по кат.) и фактором Xa, каждым в конечной концентрации 1 мкМ. Оценивали обогащение антиген-специфическими фагами после каждого цикла сортировки путем сравнения количества фагмидных частиц, элюированных из покрытых антигеном лунок, с количеством фагмидных частиц, элюированных из лунок с отрицательным контролем (без покрытия и заблокированных). Эти эксперименты дают основание предположить, что популяция фагов обогащалась по антиген-специфическим фагам, соответственно, приблизительно 7-кратно, 200-кратно и 1000-кратно после $1^{-го}$, $2^{-го}$ и $3^{-го}$ цикла. В целом, случайным образом отобрали 190 колоний (95 из цикла 2 и 95 из цикла 3) и проанализировали методом твердофазного ИФА на наличие антиген-специфических нанотел в их периплазматических экстрактах (в твердофазном ИФА использовали неочищенные периплазматические экстракты, содержащие растворимые нанотела). Антиген, используемый для скрининга твердофазным ИФА, был таким же, как и для сортировки, используя непокрытые заблокированные лунки и лунки, покрытые смесью рекомбинантных человеческих Fc IgG1 и фактора Xa в качестве отрицательных контролей. Вторичное антитело (антимышиное антитело) дало слабый фоновый сигнал на лунках, покрытых рекомбинантными человеческими Fc IgG1/Xa (около 0,3 ОП при 405 нм), который отмечает 5 клонов как кросс-реактивные на Fc. Из этих 190 колоний, 141 колония определены положительными по hIL13Rα2, но не по смеси Fc hIgG1/фактору Xa в этом анализе. На основании данных о последовательности 141 колония, положительная по hIL13Rα2, но не по смеси Fc hIgG1/фактора Xa, было выделено 54 различных полноразмерных нанотела, принадлежащих к 16 различным группам CDR3 (линии В-клеток). Нанотела, принадлежащие к одной и той же группе CDR3 (одной и той же линии В-клеток), очень похожи, а их аминокислотные последовательности подтверждают, что они происходят из клонально родственных В-клеток в результате соматической гипермутации или получены из одной и той же В-клетки, но диверсифицированы из-за ошибки ПЦР при

конструировании библиотеки. Нанотела, принадлежащие к одной и той же группе CDR3, распознают один и тот же эпитоп, но их другие свойства (например, аффинность, активность, стабильность, экспрессионный выход и т. д.) могут быть разными. Исследовали методом твердофазного ИФА также специфические к IL13Rα2 нанотела с His-меченным человеческим IL13Rα1 (Acro Biosystems, № IL1-H5224 по кат.). Этими экспериментами с твердофазным ИФА выявлено, что ни одно из of the IL13Rα2-специфических нанотел не связывает человеческий IL13Rα1. Клоны, полученные в результате этих сортировок, несут в своих названиях следующий код: TIG.

Проточный цитометрический анализ hIL13Rα2-специфических нанотел

Нанотела и клетки

[00389] Получали периплазматические экстракты для Nb к HIL13Rα2 таким же образом, как это было сделано при первоначальном скрининге твердофазным ИФА, описанным выше. Размораживали, промывали и подсчитывали клетки из каждой клеточной линии (U251_Luc_Mch и A431_Luc). Периплазматический экстракт каждого клона Nb инкубировали с около $2x10^5$ клеток. После промывания клетки инкубировали с мышиным антителом к метке HA и антителом к мышиному PE. После очередного промывания к каждому образцу добавляли Topro как краситель для определения живых/мертвых клеток, и клетки анализировали на проточном цитометре. В качестве положительного контроля использовали связывающий Mab, PE клон 47 против IL13Rα2 (+Topro). Отрицательный контроль для каждой линии клеток: образец с нерелевантным Nb (BCII10 — бактериальная специфическая β-лактамаза), образец со всеми Mab обнаружения, образец только с вторичным Mab к мышиному-PE и образец только с клетками (с и без Topro).

Гуманизация антител

[00390] Для гуманизации выбрали два клона. На Фиг. 1 показаны выравнивания последовательностей клона 1 и клона 2, содеращие исходную (негуманизированную) последовательность для каждого и десяти гуманизированных вариантов. Каждое гуманизированное нанотело анализировали методом Octet при 500 нМ на датчике Ni-NTA с трехкратными разведениями антигена (IL13Rα2-Fc) при 125 нМ, 41,66 нМ и 13,86 нМ. Изображение экспериментальной процедуры показано на Фиг. 2. Краткий обзор octed-измерений для каждого из гуманизированных вариантов, изображенных на Фиг. 1, показан в таблице 1 (клон 1) и таблице 2 (клон 2).

Таблица 1. Анализ исходных и гуманизированных вариантов клона 1

Конструкция	**Колич. мутаций**	**% человеч.**	**Проточная цитометрия, СИФ**	Octet KD, нМ	**KD, кратность разницы**

исходная	0	84,62	2265,3	0,63	1
1-h1	5	90,11	Не исслед.	0,42	0,67
1-h2	6	91,21	Не исслед.	1,01	1,6
1-h3	7	92,31	1988,9	1,76	2,8
1-h4	8	93,41	1570,7	1,77	2,8
1-h5	9	94,51	1729,3	1,94	3,1
1-h6	10	96,70	1503,6	1,44	2,3
1-h7	11	96,70	1227,9	1,50	2,4
1-h8	**12**	**97,80**	**1240,2**	**1,94**	3,1
1-h9	13	98,90	842,1	1,91	3,0
1-h10	**14**	**100**	**639,2**	**1,46**	2,3
2o Ab			90,4		
Изотипический контроль			21,4		

Таблица 2. Анализ исходных и гуманизированных вариантов клона 1

Конструкция	**Колич. мутаций**	**% человеч.**	**Проточная цитометрия СИФ**	**Octet KD, нМ**	**KD, кратность разницы**
2- исходная	0	81,32	3647,4	0,81	1
2-h1	8	90,11	Не исслед.	0,93	1,1
2-h2	9	91,21	Не исслед.	3,30	4,1
2-h3	10	92,31	3065,3	0,91	1,1
2-h4	11	93,41	3058,4	0,96	1,2
2-h5	12	94,51	1453,2	0,87	1,1
2-h6	13	95,60	2868,7	1,13	1,4
2-h7	14	96,70	1903,5	0,95	1,2
2-h8	**15**	**97,80**	**2024,2**	**0,95**	**1,2**
2-h9	16	98,90	1637,3	0,87	1,1

2-h10	**17**	**100**	**1122,3**	**3,31**	4,1

[00391] Для дальнейшего исследования для каждого клона выбрали две гуманизированные последовательности и они отвечают SEQ ID NO:19–28 и 35–43, соответственно.

Пример 4. Активность нанотел к IL13Rα2 *in vitro*

[00392] На скелете pLRPO экспрессировали гуманизированные sdAb, описанные в примере 3, и вводили в CD3ε TFP. Соответствующую активность IL13Rα2-TFP-T-клеток исследовали на IL-13-экспрессирующей линии клеток (U87) и IL13Rα2-отрицательной линии клеток (A431). И клон 1 и клон 2 TFP-T-клеток индуцировали лизис опухолевых клеток в U87, но не в A431 клетках (Фиг. 3A).

[00393] Те же TFP-T-клетки исследовали на их способность индуцировать выработку IFNγ и IL-2. Как показано на Фиг. 3B, TFP-T-клетки не индуцировали IFNγ или IL-2 из IL13Rα2 отрицательных клеток (A431), но клон 1 и клон 2 TFP-T-клеток проявили ответ IFNγ более 3000 пг/мл и низкую продукцию IL-2 около 100 пг/мл. Сходные результаты наблюдали при повторении в глиобластомных клетках U251.

Пример 5. Создание и идентификация нанотел, специфических к человеческому пептиду MUC16: NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSD LP

Материалы и методы

Трансформация, повторное клонирование и экспрессия V_{HH}

Трансформация несупрессорного штамма (например, WK6) рекомбинантным pMECS GG

[00394] Ген нанотела, клонированный в векторе pMECS GG, содержит сигнальную последовательность PelB на N-конце и маркер HA и маркер His_6 на C-конце (лидер PelB-нанотело-HA-His_6). Лидерная последовательность PelB направляет нанотело в периплазматическое пространство *E.coli*, и для очистки и выявления нанотела могут использоваться маркеры HA и His_6 (например, в анализе твердофазного ИФА, вестерн-блот и т. д.).

[00395] В векторе pMECS GG за маркером His_6 следует амбер стоп-кодон (TAG), и за этим амбер стоп-кодоном следует ген III из фага M13. В супрессорных штаммах *E. coli* (например, TG1) амбер стоп-кодон считывается как глутамин, и поэтому нанотело экспрессируется в виде гибридного белка с белком III фага, который позволяет отображать нанотеле на фаговой оболочке для сортировки. В несупрессорных штаммах *E. coli* (например, WK6) амбер стоп-кодон считывается как стоп-кодон, и поэтому получаемое нанотело не гибридизировано с белком III.

[00396] Чтобы экспрессировать и очищать нанотела, клонированные в векторе pMECS GG, просто готовят pMECS GG, содержащий ген интересующего нанотела, и трансформируют несупрессорный штамм (например, WK6) этой плазмидой. Последовательность нанотела получаемого клона проверяют на идентичность клона с использованием праймера MP057 (5'-TTATGCTTCCGGCTCGTATG-3'). Повторно исследуют антигенсвязывающую способность методом твердофазного ИФА или любым другим подходящим анализом. Теперь несупрессорный штамм (например, WK6), содержащий рекомбинантный вектор pMECS GG с геном нанотела, может применяться для экспрессии и очистки нанотела.

Повторное клонирование генов нанотела из pMECS GG в вектор pHEN6c

Последовательности праймеров:

[00397] - Праймер A6E (5' GAT GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGR GGA GG 3').

[00398] - Праймер PMCF (5' CTA GTG CGG CCG CTG AGG AGA CGG TGA CCT GGG T 3').

[00399] - Универсальный обратный праймер (5' TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C 3').

[00400] - Универсальный прямой праймер (5 CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC 3').

[00401] Ген нанотела амплифицируется методом ПЦР с использованием *E. coli*, содержащий рекомбинантный pMECS GG, несущий ген нанотела в виде матрицы и праймеров A6E и PMCF (около 30 циклов ПЦР, каждый цикл содержал 30 секунд при 94 °C, 30 секунд при 55 °C и 45 секунд при 72 °C, с последующими 10 минутами удлинения при 72°C в конце ПЦР). Амплифицируется фрагмент размером около 400 п.н. Затем продукт ПЦР очищается (например, набором для очистки QiaqQuick PCR от компании Qiagen) и расщепляется в течение ночи с помощью PstI.

[00402] Продукт ПЦР очищается и расщепляется в течение ночи с помощью BstEII (или Eco91I от компании Fermentas). Продукт ПЦР очищается как указано выше, и вектор pHEN6c расщепляется с помощью PstI в течение 3 часов; расщепленный вектор очищается, как указано выше, и затем расщепляется с помощью BstEII в течение от 2 до 3 часов. Расщепленный вектор анализируют на 1% агарозном геле, полосу с вектором вырезают из геля и очищают (например, набором для экстракции геля QiaQuick от Qiagen). Продукт ПЦР и вектор лигируют. Электрокомпетентные клетки WK6 трансформируют реакционной смесью лигирования. Трансформанты отбирают с использованием чашек с LB/агаром/ампициллином (100 мкг/мл)/глюкозы (1–2%).μ

Экспрессия и очистка нанотел:

[00403] Свежетрансформированную колонию WK6 используют для инокулирования 10–20 мл LB + ампициллин (100 мкг/мл) + глюкоза (1%) и инкубируют при 37 °C в течение

ночи со встряхиванием при 200–250 об/мин. Добавляют 1 мл этой предварительной культуры к 330 мл среды ТВ с добавкой 100 мкг/мл ампициллина, 2 мМ $MgCl_2$ и 0,1% глюкозы и выращивают при 37 °С со встряхиванием (200–250 об/мин) до достижение $ОП_{600}$ равного 0,6–0,9. Экспрессию нанотел индуцируют добавлением IPTG до конечной концентрации 1 мМ, и инкубируют культуру при 28 °С со встряхиванием в течение ночи (около 16–18 часов; $ОП_{600}$ после индукции в течение ночи в идеальном случае составляет от 25 до 30).

Культуру центрифугируют в течение 8 минут при 8000 об./мин, осадок из 1 литра культуры ресуспендируют в 12 мл TES и встряхивают в течение 1 часа на льду. На каждые 12 мл использованного TES добавляют 18 мл TES/4 и дополнительно инкубируют на льду в течение дополнительного часа (со встряхиванием) и затем центрифугируют в течение 30 мин при 8000 об/мин при 4 °С. Супернатант содержит белки, экстрагированные из периплазматического пространства.

Очистка методом IMAC:

[00404] His-select уравновешивают PBS: в пробирке falcon на 50 мл к периплазматическому экстракту, извлеченному из 1 литра культуры, добавляют 1 мл смолы (около 2 мл раствора His-select solution), добавляют PBS до конечного объема 50 мл и смешивают, затем центрифугируют при 2000 об/мин в течение 2 мин, и супернатант отбрасывают. Смолу промывают дважды PBS, и затем добавляют периплазматический экстракт и инкубируют в течение от 30 минут до 1 часа при комнатной температуре с осторожным встряхиванием (более длительные периоды инкубации могут приводить к неспецифическому связыванию). Образец загружают на колонку PD-10 с фильтром в нижней части (GE healthcare, № 17-0435-01 по кат.) и промывают от 50 до 100 мл PBS (50–100 мл PBS на 1 мл использованной смолы). Выполняют элюирование 3 раза, каждый раз 1 мл PBS/0,5 М имидазола на 1 мл использованной смолы, и диализируют в течение ночи при 4 °С против PBS (масса отсечения 3500 дальтон) для удаления имидазола.

[00405] В этот момент можно оценивать количество белка можно оценивать по величине $ОП_{280}$ элюированного образца. Коэффициент экстинкции каждого клона можно определять прибором protParam при анализе первичной структуры на сервере Expasy proteomics. Дополнительной очистки нанотел можно добиваться различными способами. Например, образец можно концентрировать (на Vivaspin с отсечением ММ 5000, Vivascience) путем центрифугирования при 2000 об/мин при 4 °С до получения подходящего объема для нанесения на колонку Superdex 75 16/60 (макс. 4 мл). Затем концентрированный образец нагружают на колонку Superdex 75 16/60, уравновешенную PBS. Фракции пиков объединяют и измеряют $ОП_{280}$ образца для количественного определения. Аликвоты хранят

при -20 °C при концентрации около 1 мг/мл.

Иммунизация

[00406] На сутки 0, 7, 14, 21, 28 и 35 ламе подкожно вводили инъекцию человеческого пептида MUC16 (hMUC16), конъюгированного с KLH (NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLP-C-KLH), и/или человеческого пептида MUC16, биотинилированного на C-конце (NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLP-C-Биотин), и/или человеческого пептида MUC16, биотинилированного на N-конце (Биотин-NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLP). Перед инъекциями биотинилированные пептиды смешивали с нейтрализующим авидином. Использованный адъювант представлял собой адъювант P GERBU (GERBU Biotechnik GmbH). На сутки 40 отбирали около 100 мл антикоагулированной крови ламы для получения лимфоцитов.

Конструирование библиотеки VHH

[00407] Конструировали библиотеку VHH из лимфоцитов ламы для скрининга присутствия антиген-специфических нанотел. С этой целью в качестве шаблона для синтеза первой цепи кДНК с помощью олиго(дТ) праймера использовали общую РНК из лимфоцитов периферической крови. Используя эту кДНК, кодирующие VHH последовательности амплифицировали методом ПЦР, расщепляли с помощью SAPI и клонировали в сайты SAPI фагмидного вектора pMECS-GG. Полученную, таким образом, библиотеку VHH назвали Core 93GG. Данная библиотека состояла из около 10^8 независимых трансформантов, причем около 87% трансформантов содержат вектор с правильным размером вставки.

Выделение MUC16 пептид-специфических нанотел человека

[00408] Библиотеку Core 93GG сортировали на hMUC16-пептиде NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLP, биотинилированном либо на C-, либо на N-конце (bio-hMUC16) в течение 4 циклов. Пептиду bio-hMUC16 давали возможность взаимодействовать с планшетами, покрытыми стрептавидином, после чего к планшетам добавляли фаги из библиотеки. Оценивали обогащение антиген-специфическими фагами после каждого цикла сортировки путем сравнения количества фагмидных частиц, элюированных из покрытых антигеном лунок, с количеством фагмидных частиц, элюированных из лунок с отрицательным контролем (покрытых стрептавидином и блокированных, но не содержащих пептид). Эти эксперименты дают основание предположить, что популяция фагов обогащалась по

антиген-специфическим фагам, соответственно, приблизительно 2-кратно после 2-го цикла. После 1-го, 3-го и 4-го цикла обогащения не наблюдали. В целом, случайным образом отобрали 380 колоний (190 из цикла 3, 190 из цикла 4) и проанализировали методом твердофазного ИФА на наличие антиген-специфических нанотел в их периплазматических экстрактах (в твердофазном ИФА использовали неочищенные периплазматические экстракты, содержащие растворимые нанотела). Использованные для скрининга на твердофазном ИФА пептиды были такими же, как и использованные для сортировки пептиды, с применением в качестве отрицательного контроля блокированных покрытых стрептавидином лунок без пептида. В данном анализе из этих 380 колоний 34 колонии считались положительными. На основании данных секвенирования положительных колоний были определены 6 различных полноразмерных нанотел, принадлежащих к 2 различным группам CDR3 (линии В-клеток) (см. файл Excel). Нанотела, принадлежащие к одной и той же группе CDR3 (одной и той же линии В-клеток), очень похожи, а их аминокислотные последовательности подтверждают, что они происходят из клонально родственных В-клеток в результате соматической гипермутации или получены из одной и той же В-клетки, но диверсифицированы из-за ошибки ПЦР при конструировании библиотеки. Нанотела, принадлежащие к одной и той же группе CDR3, распознают один и тот же эпитоп, но их другие свойства (например, аффинность, активность, стабильность, экспрессионный выход и т. д.) могут быть разными. Клоны, полученные в результате этих сортировок, несут в своих названиях следующий код: MU.

Проточный цитометрический анализ hMUC16 пептид-специфических нанотел

Нанотела и клетки

[00409] Получали периплазматические экстракты для Nb к hMUC16-пептиду таким же образом, как это было сделано при первоначальном скрининге твердофазным ИФА, описанным выше. Размораживали клетки из каждой клеточной линии (SKOV3 Muc16 Luc, OVCAR 3 Muc16 Luc, Expi-293 and Jurkat), промывали и подсчитывали. Периплазматический экстракт каждого клона Nb инкубировали с около $2x10^5$ клеток. После промывания клетки инкубировали с мышиным антителом к метке HA и антителом к мышиному PE. После очередного промывания к каждому образцу добавляли Топро как краситель для определения живых/мертвых клеток, и клетки анализировали на проточном цитометре. В качестве положительного контроля использовали Mab, человеческое антитело к Muc16-4h11 (+ античеловеческий IgG-PE + Topro), на клетках SKOV3 Muc16 Luc и OVCAR 3 Muc16 Luc. В качестве отрицательных контролей для каждой линии клеток авторы применяли: образец с нерелевантным Nb (BCII10 — бактериальная специфическая β-лактамаза), образец со всеми Mab обнаружения, образец только с вторичным Mab к

мышиному-PE и образец только с клетками (с и без Topro).

Пример 6. Скрининг sdAb к MUC16 по отношению к мишени hMUC16

[00410] Связывающие белки V_{HH}, полученные в примере 5, подвергали скринингу с использованием биодатчика NTA (никелевая колонка, см. Фиг. 5A для получение краткого изображения способа). His-меченные sdAb MUC16 (3,25 мкг/мл) связывают с биодатчиком, и добавляют пептид MUC16 в концентрациях 200; 100; 50; 25; 6,25; 1,56 или 0 нМ. Буфер: 1X PBS Corning® Cellgro® pH 7,4 (кат. 21-040-CM), содержащий 0,02% Tween® 20 при 30 °C. Датчики: Pall Forte Bio Dip & Read (кат. 18-5102).

[00411] Насыщение связывания двух клонов, R3Mu4 (Фиг. 1C) и R3Mu29 (Фиг. 1D) sdAb ламы и гуманизированного sdAb в отношении мишени MUC16 демонстрирует, что исходный и гуманизированный варианты sdAb αMuc16 проявляют высокую аффинность связывания с пептидом эктодомена MUC16 ($MUC16^{ecto}$), ассоциируя со значениями K_D в диапазоне 6–94 нМ. Наблюдается некоторая потеря аффинности, демонстрируемая гуманизированными вариантами по сравнению с соответствующими исходными клонами ламы. Сводная информация представлена в таблице 3.

Таблица 3. Определение K_D из общей модели подбора 1:1 по титрованию связывания

αMu16 sdAb*	**K_D (нМ)**
Исходное R3Mu4	10,2 ± 1,7
R3Mu4 h11#2	10,9 ± 1,6
R3Mu4 h12#2	94,6 ± 1,5
R3Mu4 h13#9	36,2 ± 15,4
Исходное R3Mu29	6,3 ± 0,1
R3Mu29_h13#11	8,3 ± 0,1
R3Mu29_h14#13	36,4 ± 0,8
R3Mu29_h15#16	22,9 ± 0,4

Пример 7. Эпитопная сортировка связывающих белков против MUC16 по сравнению с действующим связывающим белком 4H11

[00412] Для определения того, что sdAb MUC16 исходного R3Mu4 и исходного R3Mu29 связываются с одинаковыми или разными эпитопами, по сравнению с действующим связывающим белком scFv-Fc 4H11 (из гибридомы 4H11), использовали сэндвич-анализ

(см. Фиг. 6A).

[00413] Как показано на Фиг. 6B, sdAb MUC16 — исходное R3Mu4 (лама) и исходное R3Mu29 (лама) показывают связывание после воздействия действующего связывающего белка 4H11, демонстрируя тот факт, что исходные sdAb распознают отличающийся эпитоп пептида MUC16 и связываются с ним, в отличии от действующего связывающего белка scFv-Fc 4H11. Отрицательный контроль без антигена (пептид MUC16) демонстрирует отсутствие связывания, исключая любые возможности неспецифического связывания. Схема, изображающая связывающий эпитоп исходных антител R3Mu4 и R3Mu29 ламы, показана на Фиг. 6C.

Пример 8. Доклинические исследования с Т-клетками, экспрессирующими MUC16-TFP

[00414] В доклинических исследованиях *in vitro* оценивали Т-клетки, экспрессирующие MUC16-TFP (Фиг. 7). Т-клетки, экспрессирующие MUC16-TFP, специфически уничтожали клетки рака яичника SKOV3-MUC16Cterm, которые трансдуцированы на сверхэкспрессию связанной с клетками С-концевой формы MUC16 дозозависимым образом, в то время как исходные MUC16-отрицательные клетки SKOV3 избежали опосредованной Т-клетками, экспрессирующими MUC16-TFP, гибели. Аналогичным образом, Т-клетки, экспрессирующие MUC16-TFP, удаляли клетки OVCAR3-MUC16-Cterm, сверхэкспрессировавшие клеточноассоциированную форму MUC16. Исходные клетки OVCAR3, экспрессирующие низкие уровни MUC16, уничтожались только при самых высоких соотношениях TFP-Т-клеток к клеткам-мишеням, что особо выделяет дозозависимый лизис опухолевых клеток. Аналогично, TFP-Т-клетки высвобождают цитокины только тогда, когда на клетках-мишенях присутствует MUC16. На Фиг. 8 изображен пример экспериментальных данных, показывающих активность MUC16-TFP в клеточных анализах с использованием линий клеток яичника, экспрессирующих высокие и низкие уровни MUC16. В этих исследованиях обнаружено, что MUC16-TFP обладали преимущественно приводящими к гибели качествами, зависящими от уровня MUC16 на поверхности опухолевых клеток. Точнее, было обнаружено, что MUC16-TFP приводили к уничтожению опухолевых клеток с высоким уровнем экспрессии MUC16 дозозависимым образом, в то время как уничтожение с помощью MUC16-TFP опухолевых клеток с низким уровнем экспрессии MUC16 не наблюдалось при уровнях доз, используемых в этих анализах.

Пример 9. Количественное определение числа копий $MUC16^{ecto}$ проточной цитометрией

[00415] Клеточноассоциированную С-концевую форму MUC16 ($MUC16^{ecto}$)

специфического антитела 4H11 получали в соответствии с патентом США № 9 169 328, а затем ее конъюгировали с PE. Среднее количество молекул PE на антитело по оценкам было приблизительно 1. Линии клеток OVCAR3 и SKOV3 карциномы яичника или их производные, стабильно сверхэкспрессирующие $MUC16^{ecto}$ (клетки OVCAR3-$MUC16^{ecto}$ и SKOV3-$MUC16^{ecto}$), окрашивали Ab 4H11-PE при содержание 2 мкг на образец. Количество копий $MUC16^{ecto}$ клеточной поверхности оценивали набором количественного определения по флуоресценции Quantibrite Beads PE Fluorescence Quantitation (BD Bioscience) согласно инструкций производителя. Окрашенные антителом 4H11-PE опухолевые клетки анализировали на приборе Fortessa® X-20 вместе с гранулами Quantibrite. Для клеток, а также для гранул, рассчитывали среднюю геометрическую интенсивность флуоресценции (гСИФ). Набор гранул содержал 4 популяции, изготовленные с разным содержанием молекул PE на гранулу (высокое, умеренное, низкое, отрицательный контроль). На основе заданного количества копий молекул PE на гранулу по сравнению с измеренной СИФ для каждого набора гранул строили стандартную кривую. Затем оценивали количество копий $MUC16^{ecto}$ на опухолевых клетках по полученной на основе гранул стандартной кривой. Количества копий $MUC16^{ecto}$ на клетках OVCAR3, OVCAR3-$MUC16^{ecto}$, SKOV3 и SKOV3-$MUC16^{ecto}$ определили как равные, соответственно, 726, 3616, 39 и 2351 (Фиг. 9B).

Пример 10. Лизис $MUC16^{ecto}$ специфических клеток Т-клетками MUC16-TFP

[00416] Лизис $MUC16^{ecto}$ специфических клеток Т-клетками MUC16-TFP оценивали анализом цитотоксичности *in vitro*. Линии опухолевых клеток с экспрессией $MUC16^{ecto}$ или без нее стабильно трансдукцировали для получения экспрессии в качестве репортерного белка люциферазы светляка. Через двадцать четыре часа совместного культивирования определяли люциферазную активность совместно культивированных клеток с помощью системы анализа люциферазы Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega, № E2610 по кат.) в качестве заменителя остаточных живых опухолевых клеток. Затем рассчитывали процент уничтожения опухолевых клеток согласно следующей формулы: % лизиса опухолевых клеток = 100% x [1 – RLU (Опухолевые клетки + Т-клетки) / RLU (Опухолевые клетки)].

[00417] Т-клетки, экспрессирующие MUC16-TFP специфически уничтожали клетки SKOV3-$MUC16^{ecto}$ (Фиг. 10A), тогда как исходные клетки SKOV3 избежали опосредованной Т-клетками, экспрессирующими MUC16-TFP, гибели (Фиг. 10B). Аналогичным образом, Т-клетки, экспрессировавшие MUC16-TFP, удаляли клетки OVCAR3-$MUC16^{ecto}$, сверхэкспрессировавшие клеточноассоциированную форму MUC16 (Фиг. 10C). Исходные клетки OVCAR3, экспрессировавшие низкие уровни $MUC16^{ecto}$, уничтожались только частично (Фиг. 10D).

Пример 11. MUC16^{ecto} специфическая выработка цитокинов Т-клетками MUC16-TFP

[00418] MUC16^{ecto} специфическую выработку цитокинов Т-клетками MUC16-TFP определяли по супернатанту, собранному при совместном культивировании различных опухолевых клеток с экспрессией MUC16^{ecto} и без нее, а также MUC16-TFP Т-клеток. В супернатантах анализировали уровни IFN-□□и IL-2 человека с использованием технологии MAGPIX Luminex® xMAP (EMD Millipore) с 2-плексными наборами (Millipore, № HCYTOMAG-60K по каталогу).

[00419] Т-клетки, экспрессирующие MUC16-TFP, секретировали провоспалительные цитокины антигенспецифическим образом. Т-клетки, экспрессировавшие TFP MUC16, секретировали IFN-□□и IL-2 при совместном культивировании с клетками SKOV3-MUC16^{ecto} (Фиг. 11A и 11E, соответственно) или клетками OVCAR3-MUC16^{ecto} (Фиг. 11C и 11G, соответственно), но не с клетками SKOV3 (Фиг. 11B и 11F, соответственно) или клетками OVCAR3 (Фиг. 11D и 11H, соответственно).

Пример 12. MUC16^{ecto} специфическая пролиферация Т-клеток, экспрессирующих MUC16-TFP

[00420] Специфическая по MUC16^{ecto} пролиферация Т-клетками MUC16-TFP определялась мониторингом разведения сигнала отслеживания Т-клеток (уменьшение по интенсивности сигнала of CellTrace™) анализом проточной цитометрии. Т-клетки, экспрессирующие MUC16-TFP, метили с помощью набора для определения пролиферации в дальнем ИК-диапазоне CellTrace™ Far Red Proliferation (№ C34564 по кат. ThermoFisher), затем совместно культивировали с клетками SKOV3 или SKOV3-MUC16^{ecto} в соотношении 1-к-1 в течение 3 суток. Т-клетки, экспрессировавшие MUC16-TFP, меченные с помощью набора для определения пролиферации в инфракрасном диапазоне CellTrace Far Red Proliferation, также стимулировали только с помощью среды или с помощью связанного с планшетом 1 мкг/мл антитела к CD3 (клон OKT-3, № 14-0037-82 по кат., Invitrogen) в течение 3 дней. Т-клетки, экспрессировашие MUC16-TFP, продемонстрировали MUC16^{ecto}-специфическую пролиферацию, что показано по уменьшению сигнала CellTrace при совместном культивировании с клетками SKOV3-MUC16^{ecto}, но не с клетками SKOV3 (Фиг. 12).

Пример 13. Активность *in vivo* Т-клеток MUC16-TFP

[00421] Т-клетки, экспрессировавшие MUC16-TFP, оценивали на моделях с ксенотрансплантатом мышам NSG человеческих линий клеток карциномы яичника, клеток SKOV3-MUC16^{ecto} и клеток OVCAR3-MUC16^{ecto}. Самкам мышей NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, The Jackson Laboratory, номенклатурный номер 005557) возрастом шесть недель внутрибрюшинно инокулировали клетки SKOV3-MUC16^{ecto} (5 x 10^5

клеток/мышь) или клетки OVCAR3-MUC16^{ecto} (5 x 10^6 клеток/мышь), или подкожно клетки SKOV3-MUC16^{ecto} (5 x 10^6 клеток/мышь, смесь 1-к-1 с Matrigel®). Для внутрибрюшинных моделей определяли опухолевую нагрузку методом визуализации биолюминесценции (BLI) с помощью внубрюшинной инъекции 0,2 мл субстрата люциферина (VWR), разбавленного в PBS (150 мг/кг). Опухолевую нагрузку подкожной модели измеряли как объем опухоли штангенциркулем. Сразу после формирования модели опухоли (внутрибрюшинные модели: сигнал BLI > 10^8; подкожная модель: объем опухоли > 75 мм^3), внутривенно вводили Т-клетки, экспрессирующие MUC16-TFP (MUC16 TFP1 и MUC16 TFP2) или нетрансдуцированные Т-клетки (NT), или внутривенно вводили носитель (PBS) в дозе 10^7 Т-клеток на мышь.

[00422] Наблюдали эффективность *in vivo* Т-клеток, экспрессирующих MUC16 TFP, среди внутрибрюшинных и подкожной моделей клеток SKOV3-MUC16^{ecto} и клеток OVCAR3-MUC16^{ecto}. На внутрибрюшинной модели с клетками SKOV3-MUC16^{ecto}, MUC16 TFP 1 показали значительное уменьшение опухолевой нагрузки по сравнению с исходным уровнем на день 0 (день инъекции Т-клеток) (Фиг. 13A). Закономерно, MUC16 TFP1 существенно замедляли рост опухоли в подкожных моделях клеток SKOV3-MUC16^{ecto} по сравнению с Т-клетками NT (Фиг. 13B). На внутрибрюшинной модели клетки OVCAR3-MUC16^{ecto}, MUC16 TFP1 и MUC16 TFP2 полностью удаляли опухоль у мышей (Фиг. 13C).

Пример 14. Иммунохимическое окрашивание нормальных тканей человека с использованием гибридного белка однодоменного антитела к MUC16

[00423] Целью исследований было получение информации о экспрессии MUC16 нормальных человеческих тканей.

[00424] Контрольные материалы и срезы FFPE окрашивали однодоменным антителом к MUC16, которое было генетически гибридизировано с областью Fc мыши для обнаружения с помощью HRP-конъюгированного вторичного антитела к Fc мыши. Положительный контроль состоял из срезов FFPE человеческих опухолей яичника, полученных у двух доноров. Отрицательный контроль представлял собой срез FFPE человеческого сердца. Панель исследуемых тканей включала: клетки крови, кору мозжечка или головного мозга, желудочно-кишечный тракт (пищевод, тонкий кишечник, желудок, толстая кишка, по возможности), селезенку, почки (клубочки, канальцы), печень, лимфатический узел, кожу, плаценту, яичко и миндалину от по одному каждого донора.

[00425] Результаты. В качестве положительного контроля использовали две ткани карциномы яичника человека от разных доноров, которые показали окрашивание с различной интенсивностью в диапазоне 1–3+ (от эпизодического до частого) и 1–4+ (от эпизодического до частого) для клеточных мембран и цитоплазмы новообразований. Из

нормальных тканей все показали отрицательное окрашивание по MUC16, но две: 1) эпителий желудка человека, пристеночный (цитоплазма, цитоплазматические гранулы) — 1–2+ (от эпизодического до частого) и 2) поверхность эпителия миндалевидной железы человека, крипта (мембрана, цитоплазма и другие элементы) — 1–3+ от редкого до эпизодического.

[00426] Эти данные показывают, что MUC16 обладает ограниченной экспрессией в нормальных тканях человека и повышенной экспрессией в некоторых опухолях. Это делает его привлекательной мишенью для противоракового лечения MUC16-положительных злокачественных опухолей. MUC16-специфическое однодоменное антитело обладало способностью связывать и окрашивать антиген-положительные ткани.

Пример 15. Клинические исследования

[00427] Пациенты с неоперабельным раком яичника с рецидивирующим или рефрактерным заболеванием будут включены в клинические исследования Т-клеток, экспрессирующих TFP MUC16. В первоначальном исследовании будет изучаться профиль безопасности Т-клеток, экспрессирующих TFP MUC16, а также будет изучаться данные кинетики для клеток и результаты фармакодинамики. Эти результаты обеспечат информацией по выбору дозировок для дальнейших исследований, которые затем будут вводиться более многочисленной когорте пациентов с неоперабельным раком яичника для определения профиля эффективности Т-клеток, экспрессирующих TFP MUC16.

Пример 16. TFP-Т-клетки против MSLN предпочтительно уничтожают опухолевые клетки с высокой экспрессией MSLN.

[00428] Различную способность Т-клеток MSLN-TFP к уничтожению опухолей с высоким содержанием MSLN (MSTO-MSLN^{high}, 11006 копий поверхностного MSLN) и опухолей с низким содержанием MSLN (MSTO-MSLN^{low}, 198 копий поверхностного MSLN) у мышей NSG, содержащих опухоли либо MSTO-MSLN^{high}, либо MSTO-MSLN^{low}.

[00429] Клетки MSTO-MSLN^{high} и MSTO-MSLN^{low} ресуспендировали в стерильном PBS (pH 7,4) при концентрации 1 x 10^6 клеток/100 мкл. Затем суспензию клеток в PBS смешивали 1:1 со ледяным Matrigel® для получения конечного инъецируемого объема 200 мкл на мышь. Всем животным подкожным введением инъецировали 200 мкл суспензии опухолевых клеток в стерильном PBS/Matrigel® в верхнюю и заднюю часть боковой стороны. Опухолевый рост отслеживали по объему опухоли, выполняя измерения дважды в неделю штангенциркулем. Сразу после формирования опухолевой модели (14 суток после инъекции опухоли) со средними объемами опухолей, достигающими ~300 мм^3, содержащим опухоли мышам внутривенно вводили инъекции нетрансдуцированных Т-клеток (NT, 1x10^7 всех Т-клеток) или Т-клеток MSLN-TFP (1x10^7 всех Т-клеток).

[00430] Т-клетки MSLN-TFP кардинально ограничивали рост опухолей с высоким MSLN по сравнению с мышами, получавшими Т-клетки NT (Фиг. 14A). С другой стороны, ограниченная противоопухолевая реакция наблюдалась у получавших Т-клетки MSLN-TFP мышей с опухолями с низким уровнем MSLN (Фиг. 14B). В то время как у одного животного наблюдалась регрессия опухоли, у 9 мышей, получавших Т-клетки MSLN-TFP, наблюдалась либо более медленная (n=2), либо аналогичная (n=6) скорость прогрессирования опухолей как и у животных, получавших Т-клетки NT (Фиг. 14B).

Примечания

[00431] Несмотря на то что в данном документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления приведены исключительно с целью иллюстрации. Множество вариаций, изменений и замен будут очевидны специалистам в данной области техники без выхода за рамки настоящего изобретения. Следует понимать, что различные альтернативные варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в данном документе, могут применяться при практической реализации настоящего изобретения. Предполагается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем изобретения и, что таким образом охватываются способы и структуры в пределах объема данных пунктов формулы изобретения и их эквивалентов.

Таблица 4. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO:	**Название**	**Последовательность**
1	Короткий линкер 1	GGGGSGGGGSGGGGSLE
2	Короткий линкер 2	AAAGGGGSGGGGSGGGGSLE
3	Длинный линкер	AAAIEVMYPPPYLGGGGSGGGGSGGGGSLE
4	CD3-ε человека	MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPY KVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNI GSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLY LRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVYY WSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNP DYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI
5	CD3-γ человека	MEQGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQE

		DGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLG SNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELN AATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVRQSRASDK QTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN
6	CD3-δ человека	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTS ITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIY KDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLL LALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRD RDDAQYSHLGGNWARNKS
7	CD3-ζ человека	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGI LFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR
8	α-цепь TCR человека	MAGTWLLLLLALGCPALPTGVGGTPFPSLAPPIMLLVD GKQQMVVVCLVLDVAPPGLDSPIWFSAGNGSALDAFT YGPSPATDGTWTNLAHLSLPSEELASWEPLVCHTGPGA EGHSRSTQPMHLSGEASTARTCPQEPLRGTPGGALWLG VLRLLLFKLLLFDLLLTCSCLCDPAGPLPSPATTTRLRA LGSHRLHPATETGGREATSSPRPQPRDRRWGDTPPGRK PGSPVWGEGSYLSSYPTCPAQAWCSRSALRAPSSSLGA FFAGDLPPPLQAGA
9	С-область α-цепи TCR человека	PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQS KDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFAC ANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQ NLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
10	V-область α-цепи TCR человека CTL-L17	MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPS LSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLIS ISSIKDKNEDGRFTVFLNKSAKHLSLHIVPSQPGDSAVY FCAAKGAGTASKLTFGTGTRLQVTL
11	С-область β-цепи TCR человека	EDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPD HVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCL SSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDR AKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEI LLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF

12	V-область β-цепи TCR человека CTL-L17	MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQNPRHNITKRGQ NVTFRCDPISEHNRLYWYRQTLGQGPEFLTYFQNEAQL EKSRLLSDRFSAERPKGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCAS SLAGLNQPQHFGDGTRLSIL
13	V-область β-цепи TCR человека YT35	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQE VTLRCKPISGHNSLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPID DSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASS FSTCSANYGYTFGSGTRLTVV
14	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая однодоменное антитело 1 против MUC16 (SD1)	caggtgcagctgcaggagtctgggggaggattggtgcaggctgggggctctctgaga ctctcctgtgcagcctctggacgcaccgtcagtagcttgttcatgggctggttccgccaa gctccagggaaggagcgtgaacttgtagcagccattagccggtatagtctatatacata ctatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccgcagacaacgccaagaacgc ggtatatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacacggccgtttattactgtgcatc aaagttggaatatacttctaatgactatgactcctggggccaggggacccaggtcaccg tctcctca
15	Однодоменное связывающее антитело R3MU4 против MUC16	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GRTVSSLF**MGW FRQAPGKERELVAA**ISRYSLYT**YYADSVKGRFTISADN AKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYC**ASKLEYTSNDYDS**W GQGTQVTVSS
16	R3MU4CDR1	GRTVSSLF
17	CDR2 R3MU4	ISRYSLYT
18	CDR3 R3MU4	ASKLEYTSNDYDS
19	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая однодоменное R3MU29 против MUC16	caggtgcagctgcaggagtctgggggaggattggtgcaggctggggactctctgaga ctctcctgtgcagcctctggacgcgccgtcagtagcttgttcatgggctggttccgccga gctccagggaaggagcgtgaacttgtagcagccattagccggtatagtctatatacata ctatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccgcagacaacgccaagaacgc ggtatatctgcaaatgaacagcctaaaacctgaggacacggccgtttattactgtgcatc aaagttggaatatacttctaatgactatgactcctggggccaggggacccaggtcaccg tctcctca
20	Однодоменное R3MU29 против MUC16	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAAS**GRAVSSLF**MGW FRRAPGKERELVAA**ISRYSLYT**YYADSVKGRFTISADN AKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYC**ASKLEYTSNDYDS**W GQGTQVTVSS
21	CDR1 R3MU29	GRAVSSLF

22	CDR2 R3MU29	ISRYSLYT
23	CDR3 R3MU29	ASKLEYTSNDYDS
24	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая однодоменное R3MU63 против MUC16	caggtgcagctgcaggagtctgggggaggattggtgcaggctggggactctctgagactctcctgtgcagcctctggacgcaccgtcagtagcttgttcatggggtggttccgccgagctccagggaaggagcgtgaacttgtagcagccattagccggtatagtctatatacatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccgcagacaacgccaagaacgcggtatatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacacggccgtttattactgtgcatcaaagttggaatatacttctaatgactatgactcctggggccaggggacccaggtcaccgtctcctca
25	Однодоменное R3MU63 против MUC16	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAAS**GRTVSSLF**MGWFRRAPGKERELVAA**ISRYSLYT**YYADSVKGRFTISADNAKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYC**ASKLEYTSNDYDS**WGQGTQVTVSS
26	CDR1 R3MU63	GRTVSSLF
27	CDR2 R3MU63	ISRYSLYT
28	CDR3 R3MU63	ASKLEYTSNDYDS
29	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая однодоменное R3MU119 против MUC16	caggtgcagctgcaggagtctgggggaggtttggtgcagcctggggattctatgagactctcctgtgcagccgaggggactctttggatggttatgtagtaggttggttccgccaggccccagggaaggagcgccaggggtctcaagtattagtggcgatggcagtatgcgatacgttgctgactccgtgaaggggcgattcaccatctcccgagacaacgccaagaacacggtgtatctgcaaatgatcgacctgaaacctgaggacacaggcgtttattactgtgcagcagacccacccacttgggactactggggtcaggggacccaggtcaccgtctcctca
30	Однодоменное R3MU119 против MUC16	QVQLQESGGGLVQPGDSMRLSCAAE**GDSLDGYV**VGWFRQAPGKERQGVSS**ISGDGSMR**YVADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMIDLKPEDTGVYYC**AADPPTWDY**WGQGTQVTVSS
31	CDR1 R3MU119	GDSLDGYV
32	CDR2 R3MU119	ISGDGSMR
33	CDR3 R3MU119	AADPPTWDY

34	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая однодоменное R3MU150 против MUC16	caggtgcagctgcaggagtctgggggaggcttggtgcagcctgggggtctctgaga ctctcctgtgcagcctctggacgcaccgtcagtagcttgttcatgggctggttccgccga gctccagggaaggagcgtgaacttgtagcagccattagccggtatagtctatatacata ctatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccgcagacaacgccaagaacgc ggtatatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacacggccgtttattactgtgcatc aaagttggaatatacttctaatgactatgactcctggggccaggggacccaggtcaccg tctcctca
35	Однодоменное R3MU150 против MUC16	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTVSSLF**MGWF RRAPGKERELVAAI**SRYSLY**TYYADSVKGRFTISADNA KNAVYLQMNSLKPEDTAVYYC**ASKLEYTSNDYDS**WG QGTQVTVSS
36	CDR1 R3MU150	GRTVSSLF
37	CDR2 R3MU150	ISRYSLYT
38	CDR3 R3MU150	ASKLEYTSNDYDS
39	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая однодоменное R3MU147 против MUC16	caggtgcagctgcaggagtctgggggaggattggtgcaggctggggagtctctgaga ctctcctgtgcagcctctggacgcaccgtcagtagcttgttcatgggctggttccgccga gctccagggaaggagcgtgaacttgtagcagccattagccggtatagtctatatacata ctatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccgcagacaacgccaagaacgc ggtatatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacacggccgtttattactgtgcatc aaagttggaatatacttctaatgactatgactcctggggccaggggacccaggtcaccg tctcctca
40	Однодоменное R3MU147 против MUC16	QVQLQESGGGLVQAGESLRLSCAAS**GRTVSSLF**MGWF RRAPGKERELVAA**ISRYSLYT**YYADSVKGRFTISADNA KNAVYLQMNSLKPEDTAVYYC**ASKLEYTSNDYDS**WG QGTQVTVSS
41	CDR1 R3MU147	GRTVSSLF
42	CDR2 R3MU147	ISRYSLYT
43	CDR3 R3MU147	ASKLEYTSNDYDS
44	R3MU29h15 (98,9% человеческого)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRAVSSLF**MGWV RQAPGKGLEWVSA**ISRYSLYT**YYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC**ASKLEYTSNDYDS**W GQGTLVTVSS
45	R3MU29h14 (97,8% человеческого)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRAVSSLF**MGWF RQAPGKGLEWVSA**ISRYSLYT**YYADSVKGRFTISRDN

		AKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC**ASKLEYTSNDYDS**W GQGTLVTVSS
46	R3MU29h13 (96,7% человеческого)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRAVSSLF**MGWF R**Q**APGK**GL**ELVSA**ISRYSLYT**YYADSVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC**ASKLEYTSNDYDS**WG QGTLVTVSS
47	R3MU4h13 (98,9% человеческого)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTVSSLF**MGWV RQAPGKGLEWVSA**ISRYSLYT**YYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC**ASKLEYTSNDYDS**W GQGTLVTVSS
48	R3MU4h12 (97,8% человеческого)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTVSSLF**MGWF RQAPGKGLEWVSA**ISRYSLYT**YYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC**ASKLEYTSNDYDS**W GQGTLVTVSS
49	R3MU4h11 (96,7% человеческого)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTVSSLF**MGWF RQAPGKGLELVSA**ISRYSLYT**YYADSVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC**ASKLEYTSNDYDS**WG QGTLVTVSS
50	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая клон 1 однодоменного антитела ламы против IL13Rα2 (LSD1)	GATGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTG CAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGATTCACTTCGGATTATTATATCATAGGCTGGTT CCGCCAGGCCCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTAT CATGTATTAGTAGTAAATATGCGAACACAAACTATG CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCCAGTCCAGAG GTGCTGCTAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACG CCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGCG CGGCAGATACGAGGCGGTATACATGCCCGGATATAG CGACTATGCACAGGAACTTTGATTCCTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
51	Клон 1 однодоменного антитела ламы против IL13Rα2 (LSD1)	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTSDYYI**IGWFR QAPGKEREGVSC**ISSKYANT**NYADSVKGRFTQSRGAA KNTVYLQMNALKPEDTAVYYC**AADTRRYTCPDIATM HRNFDS**WGQGTQVTVSS

52	CDR1 LSD1	GFTSDYYI
53	CDR2 LSD1	ISSKYANT
54	CDR3 LSD1	AADTRRYTCPDIATMHRNFDS
55	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая клон 1 гуманизированного однодоменного антитела ламы против IL13Rα2 (H1-LSD1)	GA**a**GTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTG CAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGATTCACTTCGGATTATTATATCAT**g**GGCTGGTT CCGCCAGGCCCCAGGGAAGG**gc**C**tg**GAGGGGGTATCA TGTATTAGTAGTAAATATGCGAACACA**tat**TATGCAG ACTCCGTGAAGGGCCGATTCACC**att**TCCAGAG**a**T**aac**G CTAAGAACACG**c**TGTATCTGCAAATGAAC**ag**CCTG**cgt** CCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGCGCGGCAGAT ACGAGGCGGTATACATGCCCGGATATAGCGACTATG CACAGGAACTTTGATTCCTGGGGCCAGGGGACCC**t**G GTCACCGTCTCCTCA
56	Клон 1-h8 гуманизированного однодоменного антитела ламы против IL13Rα2 (H1-LSD1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTSDYYI**MGWF RQAPGKGLEGVSC**ISSKYANT**YYADSVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC**AADTRRYTCPDIATM HRNFDS**WGQGTLVTVSS
57	CDR1 H1-LSD1	GFTSDYYI
58	CDR2 H1-LSD1	ISSKYANT
59	CDR3 H1-LSD1	AADTRRYTCPDIATMHRNFDS
60	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая клон 1 гуманизированного однодоменного антитела ламы против IL13Rα2 (H2-LSD1)	GA**a**GTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTG CAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGATTCACTTCGGATTATTATATCAT**g**GGCTGG**gtg** CGCCAGGCCCCAGGGAAGG**gc**C**tg**GAG**t**GGGTATCAT GTATTAGTAGTAAATATGCGAACACA**tat**TATGCAGA CTCCGTGAAGGGCCGATTCACC**att**TCCAGAG**a**T**aac**GC TAAGAACACG**c**TGTATCTGCAAATGAAC**ag**CCTG**cgt**C CTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGCGCGGCAGATA CGAGGCGGTATACATGCCCGGATATAGCGACTATGC ACAGGAACTTTGATTCCTGGGGCCAGGGGACCC**t**GGT CACCGTCTCCTCA

61	Клон 1-h10 гуманизированного однодоменного антитела ламы против IL13Rα2 (H2-LSD1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTSDYYI**MGWV RQAPGKGLEWVSC**ISSKYANT**YYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC**AADTRRYTCPDIAT MHRNFDS**WGQGTLVTVSS
62	CDR1 H2-LSD1	GFTSDYYI
63	CDR2 H2-LSD1	ISSKYANT
64	CDR3 H2-LSD1	AADTRRYTCPDIATMHRNFDS
65	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая клон 2 однодоменного антитела ламы против IL13Rα2 (LSD2)	GATGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTG CAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGAAGCC TCTGGATTCGCTTCGGATGATTATATCATAGGCTGGT TCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTT CATGTATTAGTAGTAGGTATGCGAACACTGTCTATAC AGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCGCATCTCCAGAGG CACTGCTAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAGCGC CCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGC GATGGATTCGAGGCGCGTTACATGCCCCGAGATATC GACTATGCACAGGAACTTTGATTCCTGGGGCCAGGG GACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
66	Клон 2 однодоменного антитела ламы против IL13Rα2 (LSD2)	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**GFASDDYI**IGWFR QAPGKEREGVSC**ISSRYANT**VYTDSVKGRFRISRGTAK NTVYLQMSALKPEDTAVYYC**AMDSRRVTCPEISTMH RNFDS**WGQGTQVTVSS
67	CDR1 LSD2	GFASDDYI
68	CDR2 LSD2	ISSRYANT
69	CDR3 LSD2	AMDSRRVTCPEISTMHRNFDS
70	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая клон 2 гуманизированного однодоменного	GA**a**GTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTG CAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTG**cg**GCCT CTGGATTCGCTTCGGATGATTATATCAT**g**GGCTGGTT CCGCCAGGCCCCAGGGAAGG**gc**C**tg**GAGGGGGTTTCA TGTATTAGTAGTAGGTATGCGAACACT**tat**TAT**gCg**GA CTCCGTGAAGGGCCGATTC**ac**CATCTCCAGAG**at**A**ac**G

	антитела ламы против IL13Rα2 (H1-LSD2)	CTAAGAACACG**c**TGTATCTGCAAATGA**a**C**ag**CCTG**cgt**C CTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGATGGATTC GAGGCGCGTTACATGCCCCGAGATATCGACTATGCA CAGGAACTTTGATTCCTGGGGCCAGGGGACCC**t**GGTC ACCGTCTCCTCA
71	Клон 2-h8 гуманизированного однодоменного антитела ламы против IL13Rα2 (H1-LSD2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFASDDYI**MGWF RQAPGKGLEGVSC**ISSRYANT**YYADSVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC**AMDSRRVTCPEISTM HRNFDS**WGQGTLVTVSS
72	CDR1 H1-LSD2	GFASDDYI
73	CDR2 H1-LSD2	ISSRYANT
74	CDR3 H1-LSD2	AMDSRRVTCPEISTMHRNFDS
75	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая клон 2 гуманизированного однодоменного антитела ламы против IL13Rα2 (H2-LSD2)	GA**a**GTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTG CAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTG**cg**GCCT CTGGATTCGCTTCGGATGATTATATCAT**g**GGCTGG**gtg** CGCCAGGCCCCAGGGAAGG**gc**C**tg**GAG**t**GGGTTTCATG TATTAGTAGTAGGTATGCGAACACT**tat**TAT**gCg**GACT CCGTGAAGGGCCGATTC**ac**CATCTCCAGAG**at**A**ac**GCT AAGAACACG**c**TGTATCTGCAAATGA**a**C**ag**CCTG**cgt**CCT GAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGATGGATTCG AGGCGCGTTACATGCCCCGAGATATCGACTATGCAC AGGAACTTTGATTCCTGGGGCCAGGGGACCC**t**GGTCA CCGTCTCCTCA
76	Клон 2-h10 гуманизированного однодоменного антитела ламы против IL13Rα2 (H2-LSD2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC**A**AS**GFASDDYI**MGW**V** RQAPGKGLE**W**VSC**ISSRYANT**YYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC**AMDSRRVTCPEIST MHRNFDS**WGQGTLVTVSS
77	CDR1 H2-LSD2	GFASDDYI
78	CDR2 H2-LSD2	ISSRYANT
79	CDR3 H2-LSD2	AMDSRRVTCPEISTMHRNFDS

80	2TIG14	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGLTFSTYS-MGWFRQAPGKEREFVTALRWTGMDTWYADSVKGRFAISRDNAKNTVYLQMNSLNAEDTAVYYCA-TRHKSVLG--AVANPTRYDYWGQGTQVTVSS
81	2TIG23	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYV-MGWFRQAPGKEREFVARSTSTGY-INYADPVKGRFTISRDDAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAATRY--------VNRNREYDYWGQGTQVTVSS
82	2TIG4	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT---YG-MGWFRQAPGKEREFVAVGVWSSGNTYYADFARGRFTISRDNAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAAPRYSSY-----TTYHAAYDYWGPGTQVTVSS
83	2TIG52	QVQLQESGGGLAQTGGSLRLSCDASARTFNKYV-MGWFRQAPGKEREFVAAVNWDGDSTYYADDVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAWYGTT-----WSPKVRNSYDYSGHGTQVTVSS
84	2TIG21	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRTFSNYN-LGWFRQAPGKEREFVAGVRWNYANTYYAESVKGRFKMSKDIAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCA-------MGPKPGYELGPDDYWGQGTQVTVSS
85	2TIG15	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAPSGRSFS-FRGMGWFRQAPGKEREFVAAASWIYATTDYSDSVKGRFTISKDNAKDTLNLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRGTSDT-VLPPRSDYEYDVWGRGTQVTVSS
86	2TIG35	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGSTFSRYTNIGWFRQAPGKEREFVAAFRWGFANTYYGDSVKGRSTISRDNAKKQVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASSEW-------TTEAVKYDYWGQGTQVTVSS
87	2TIG40	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG--LSSNA-MAWFRQGPGKDREFVAAFHWRFANTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTALYYCAARQGSVYGGSSPV----DYDYWGQGTQVTVSS
88	2TIG6	QVQLQESGGGLVQAGDSLKLSCVASGRTFSTYA-MAWFRRAPGKEREFVASIIWSGGSSYYANSVKGRFTIS

		GDNAKNTVYLQMNGLKPEDTAVYYCAADNRPMGRS-TG------YNYWGQGTQVTVSS
89	2TIG18	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVDSGRTFGSYT-MAWFRQAPGKEREFVAAISGSGGWKYYADSVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCA------- GGLLPVTAAREYTYWGQGTQVTVSS
90	2TIG54	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSY-RMAWFRQAPGKESEFVAGIRWSGGRTYYADSVKGRF AISGDSAKNMVYLQMNSLKSEDTAVYYCAADENSS---- -----DQGYDYWGQGTQVTVSS
91	2TIG66	QVQLQESGGGLVQIGGSLRLSCAASGRTFSSY-FMAWFRQAPGKEREFVAAIGWSGADTYYEDSVKGRFT ISRDNANKMVYLQMNSLKPEDTAVYYCASGRGS------- TWSTSTYSIRGQGTQVTVSS
92	3TIG26	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRTFSDY-YMAWFRQASGKEREFVATISRGGFNSDYADSAKGRFTI SRDNAKNTVYLQMNSLTPEDTAVYYCAADR----- GIGDSRSATAYDYWGQGTQVTVSS
93	3TIG35	QVQLQESGGGLVQAGESLRLSCTASGLTDSNYA-IGWFRQAPGKEREFVTESNWRGGNHYYLDSIKGRFTIS RDNAKSTLYLQMNNLQPEDTAVYYCAARR---------- TARYDYWGQGTQVTVSS
94	3TIG52	QVQLQESGGGLVQAGASLKLSCAASGRTFSMYG-LGWFRQAPGKEREFVASIRWSDNSTHYANSVKGRFTIS ADNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAG-----GRAGSP---- ---LEYWGQGTQVTVSS
95	3TIG53	QVQLQESGGGSVQAGDSLRLSCAVSARTFSSYT-MGWFRQAPGKEREFVTAITWSAGWTYYADSVKGRFTI SRDNTQNTVYLQMDSLKVEDTAVYYCAA------- GPLPVTSPSSYDYWGQGTQVTVSS
96	Полипептид MUC16 человека	NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSV LVDGYSPNRNEPLTGNSDLP
97	VHH1 к MSLN	QVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAASGIDLSLYRMRWY RQAPGKERDLVALITDDGTSYYEDSVKGRFTITRDNPS

		NKVFLQMNSLKPEDTAVYYCNAETPLSPVNYWGQGTQVTVS
98	VHH2 к MSLN	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAPSGSIFGIRTMDWYRQAPGKERELVARITMDGRVFHADSVKGRFSGSRDGASNAVYLQMNSLKPDDTAVYYCRYSGLTSREDYWGPGTQVTVSS
99	Короткий линкер 3	GGGGSGGGGS
100	Последовательность ДНК короткого линкера 3	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC
101	Праймер MP057	TTATGCTTCCGGCTCGTATG
102	A6E праймера	GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG
103	PMCF праймера	CTAGTGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGACCTGGGT
104	Универсальный обратный праймер	TCACACAGGAAACAGCTATGAC
105	Универсальный прямой праймер	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая

(I) Т-клетку субъекта-человека, причем Т-клетка содержит рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий

(a) субъединицу TCR, содержащую

(i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR,

(ii) трансмембранный домен TCR и

(iii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена TCR; и

(b) антигенсвязывающий домен, содержащий связывающий домен против MUC16; и

(II) фармацевтически приемлемый носитель;

причем субъединица TCR и связывающий домен против MUC16 являются функционально связанными;

при этом TFP функционально взаимодействует с TCR при экспрессии в Т-клетке.

2. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой последовательность, кодирующая связывающий домен против MUC16, соединена с последовательностью, кодирующей внеклеточный домен TCR, с помощью кодирующей линкер последовательности.

3. Фармацевтическая композиция по п. 2, в которой линкер содержит $(G_4S)_n$, где G представляет собой глицин, S представляет собой серин и n является целым числом от 1 до 4.

4. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–3, в которой связывающий домен против MUC16 содержит

(i) последовательность CDR1 тяжелой цепи (HC) GRTVSSLF, GRAVSSLF или GDSLDGYV,

(ii) последовательность CDR2 HC ISRYSLYT или ISGDGSMR, и

(iii) последовательность CDR3 HC ASKLEYTSNDYDS или AADPPTWDY.

5. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–4, в которой связывающий домен против MUC16 содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:40.

6. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–5, причем фармацевтическая композиция по существу не содержит сыворотки.

7. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–6, в которой антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

8. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–6, в которой антигенсвязывающий домен представляет собой однодоменное антитело.

9. Фармацевтическая композиция по п. 8, в которой однодоменное антитело представляет собой домен V_H.

10. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–9, в которой кодируемый связывающий домен против MUC16 содержит связывающий домен против MUC16, и при этом Т-клетки обладают большей или более эффективной цитотоксической активностью, чем CD8+ или CD4+ Т-клетки, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий (a) связывающий домен против MUC16, функционально связанный с (b) по меньшей мере частью внеклеточного домена CD28, (c) трансмембранным доменом CD28, (d) по меньшей мере частью внутриклеточного домена CD28 и (e) внутриклеточным доменом CD3-дзета.

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–10, в которой кодируемая молекула TFP функционально взаимодействует с эндогенным комплексом TCR, по меньшей мере с одним эндогенным полипептидом TCR или с их комбинацией при экспрессии в Т-клетке.

12. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–11, в которой Т-клетка представляет собой первичную Т-клетку.

13. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–12, в которой Т-клетка представляет собой CD4+ Т-клетку.

14. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–13, в которой Т-клетка представляет собой CD8+ Т-клетку.

15. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–14, в которой Т-клетка дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1 и BTLA, причем по меньшей мере часть ингибирующей молекулы связана со вторым полипептидом, содержащим положительный сигнал из

внутриклеточного сигнального домена.

16. Фармацевтическая композиция по п. 15, в которой второй полипептид содержит костимулирующий домен и первичный сигнальный домен из белка, выбранного из группы, состоящей из CD28, CD27, ICOS, CD3ζ, 41-BB, OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160 и B7-H3.

17. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–16, в которой выработка IL-2 или IFNγ Т-клетками является повышенной в присутствии клетки, экспрессирующей антиген, который специфически взаимодействует со связывающим доменом против MUC16, по сравнению с Т-клеткой, не содержащей TFP.

18. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–17, в которой клетка является популяцией человеческих CD8+ или CD4+ Т-клеток, причем в отдельной Т-клетке популяции содержится по меньшей мере две молекулы TFP, или по меньшей мере две Т-клетки популяции вместе содержат по меньшей мере две молекулы TFP; причем по меньшей мере две молекулы TFP содержат связывающий домен против MUC16, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; и при этом по меньшей мере одна из по меньшей мере двух молекул TFP функционально взаимодействует с эндогенным комплексом TCR, по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR или их комбинацией.

19. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–18, в которой субъединица TCR получена только из CD3 эпсилон.

20. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–18, в которой субъединица TCR получена только из CD3 гамма.

21. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–18, в которой субъединица TCR получена только из CD3 дельта.

22. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–18, в которой внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR субъединицы TCR получены из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта.

23. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–18, в которой внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR субъединицы TCR получены из одной субъединицы комплекса TCR, причем одна субъединица является альфа-цепью TCR, бета-цепью TCR, гамма-цепью TCR, дельта-цепью TCR, CD3

эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта.

24. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–23, в которой Т-клетка проявляет повышенную цитотоксичность к клетке, экспрессирующей антиген, который специфически взаимодействует со связывающим доменом против MUC16, по сравнению с Т-клеткой, не содержащей TFP.

25. Способ обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, включающий введение млекопитающему эффективного количества популяции Т-клеток, трансдуцированных рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий
    (a) субъединицу TCR, содержащую
        (i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и
        (ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена TCR; и
    (b) домен антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, который представляет собой связывающий домен против MUC16;
    причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными,
    при этом TFP внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке, и
    при этом после лечения высвобождаются более низкие уровни цитокинов по сравнению с уровнями цитокинов у млекопитающего, получившего лечение CAR-Т-клетками, содержащими тот же домен антитела.

26. Способ по п. 25, в котором домен антитела представляет собой домен V_{HH}, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:40.

27. Способ по пп. 25 или 26, в котором клетка представляет собой аутологичную Т-клетку.

28. Способ по пп. 25 или 26, в котором клетка представляет собой алогенную Т-клетку.

29. Способ по любому одному из пп. 25–28, в котором субъект является человеком.

30. Способ лечения млекопитающего, имеющего заболевание, связанное с экспрессией MUC16, включающий введение млекопитающему эффективного количества популяции Т-клеток, трансдуцированных рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий
    (a) субъединицу TCR, содержащую

(i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и

(ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена TCR; и

(b) домен антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, который представляет собой связывающий домен против MUC16;

причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными,

при этом TFP внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке, и

при этом после лечения высвобождаются более низкие уровни цитокинов по сравнению с уровнями цитокинов у млекопитающего, получившего лечение CAR-T-клетками, содержащими тот же домен антитела.

31. Способ по п. 30, в котором домен антитела представляет собой домен V_{HH}, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:40.
32. Способ по пп. 30 или 31, в котором клетка представляет собой аутологичную Т-клетку.
33. Способ по пп. 30 или 31, в котором клетка представляет собой алогенную Т-клетку.
34. Способ по любому из пп. 25–33, в котором субъединица TCR TFP дополнительно содержит трансмембранный домен TCR.
35. Способ по п. 34, в котором внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR получены из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта.
36. Способ по п. 34, в котором внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR субъединицы TCR получены из одной субъединицы комплекса TCR, причем одна субъединица является альфа-цепью TCR, бета-цепью TCR, гамма-цепью TCR, дельта-цепью TCR, CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта.
37. Способ по любому из пп. 25–36, в котором внутриклеточный сигнальный домен TCR получен из CD3 эпсилон или CD3 гамма.
38. Способ по любому из пп. 30–33, в котором заболевание, связанное с экспрессией MUC16, выбрано из группы, состоящей из пролиферативного заболевания, рака, злокачественной опухоли, неонкологического показания, связанного с экспрессией MUC16.
39. Способ по любому из пп. 30–38, в котором заболевание представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из мезотелиомы, почечно-клеточной карциномы, рака желудка, рака молочной железы, рака легкого, рака яичника, рака предстательной

железы, рака толстой кишки, рака шейки матки, рака головного мозга, рака печени, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака мочевого пузыря, рака мочеточника, рака почки, рака эндометрия, рака пищевода, рака ЖКТ, карциномы вилочковой железы, холангиокарциномы и рака желудка, и любой их комбинации.

40. Способ по любому из пп. 30–38, в котором заболевание представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из мезотелиомы, папиллярной серозной аденокарциномы яичника, светлоклеточной карциномы яичника, смешанной карциномы яичника Мюллера, эндометриоидной слизеобразующей карциномы яичника, аденокарциномы поджелудочной железы, протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, серозной карциномы матки, аденокарциномы легкого, карциномы внепеченочного желчного протока, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищевода, колоректальной аденокарциномы, аденокарциномы молочной железы, заболевания, связанного с экспрессией MUC16, и любой их комбинации.
41. Способ по любому из пп. 30–40, в котором клетки, экспрессирующие молекулу TFP, вводятся в комбинации с агентом, который повышает эффективность клетки, экспрессирующей молекулу TFP.
42. Способ по любому из пп. 25–41, в котором для данного цитокина после лечения высвобождается по меньшей мере на 10% меньше данного цитокина по сравнению с количеством данного цитокина млекопитающего, получившего лечение CAR-T-клеткой, содержащей тот же самый домен антитела.
43. Способ по п. 42, в котором данный цитокин включает в себя один или более цитокинов, выбранных из группы, состоящей из IL-2, IFN-γ, IL-4, TNF-α, IL-6, IL-13, IL-5, IL-10, sCD137, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β и любой их комбинации.
44. Способ по любому из пп. 25–43, в котором рост опухоли у млекопитающего подавляется таким образом, что размер опухоли составляет не более 10%, не более 20%, не более 30%, не более 40%, не более 50%, или не более 60% от размера опухоли у млекопитающего, получившего лечение Т-клетками, которые не экспрессируют TFP, после не менее 8 дней лечения, причем млекопитающее, получившее лечение Т-клетками, экспрессирующими TFP, и млекопитающее, получившее лечение Т-клетками, которые не экспрессируют TFP, имеют одинаковый размер опухоли до начала лечения.
45. Способ по п. 44, в котором рост опухоли у млекопитающего полностью подавляется.
46. Способ по п. 45, в котором рост опухоли у млекопитающего полностью подавляется в течение по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 40 дней,

по меньшей мере 50 дней, по меньшей мере 60 дней, по меньшей мере 70 дней, по меньшей мере 80 дней, по меньшей мере 90 дней, по меньшей мере 100 дней или более.

47. Способ по любому из пп. 25–46, в котором популяция Т-клеток, трансдуцированных TFP, уничтожает сходное количество опухолевых клеток по сравнению с CAR-Т-клетками, содержащими аналогичный домен антитела.

48. Способ по любому из пп. 25–47, в котором популяция Т-клеток, трансдуцированных TFP, имеет отличающийся профиль экспрессии генов от CAR-Т-клеток, содержащих аналогичный домен антитела.

49. Способ по п. 48, в котором уровень экспрессии гена отличается в Т-клетках, трансдуцированных TFP, от уровня экспресии этого гена в CAR-Т-клетках, содержащих аналогичный домен антитела.

50. Способ по п. 49, в котором ген выполняет функцию презентации антигена, сигнализации TCR, гомеостаза, метаболизма, хемокиновой сигнализации, цитокиновой сигнализации, toll-подобной рецепторной сигнализации, сигнализации MMP и молекул адгезии или связанной с TNFR сигнализации.

51. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий

(a) субъединицу TCR, содержащую

(i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и

(ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон; и

(b) антигенсвязывающий домен, содержащий связывающий домен против MUC16;

причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными, и при этом TFP внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке.

52. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий

(a) субъединицу TCR, содержащую

(i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и

(ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 гамма; и

(b) антигенсвязывающий домен, содержащий связывающий домен против MUC16;

причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными, и при этом TFP внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке.

53. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий

(a) субъединицу TCR, содержащую

(i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и

(ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 дельта; и

(b) антигенсвязывающий домен, содержащий связывающий домен против MUC16;

причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными, и при этом TFP внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке.

54. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий

(a) субъединицу TCR, содержащую

(i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и

(ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена альфа-цепи TCR; и

(b) антигенсвязывающий домен, содержащий связывающий домен против MUC16;

причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными, и при этом TFP внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке.

55. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий

(a) субъединицу TCR, содержащую

(i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и

(ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена бета-цепи TCR; и

(b) антигенсвязывающий домен, содержащий связывающий домен против MUC16;

причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными, и при этом TFP внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке.

56. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–55, в которой домен антитела представляет собой домен человеческого или гуманизированного антитела.

57. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–56, в которой кодируемый антигенсвязывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности.

58. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п. 57, в которой кодируемая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 4.

59. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–58, в которой субъединица TCR содержит внеклеточный домен TCR.

60. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–59, в которой субъединица TCR содержит трансмембранный домен TCR.
61. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–60, в которой субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR.
62. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–61, в которой субъединица TCR содержит (i) внеклеточный домен 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.
63. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–62, в которой субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен, выбранный из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, или аминокислотную последовательность, имеющую в дополнение по меньшей мере одну модификацию.
64. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–63, в которой субъединица TCR содержит внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен, выбранный из функционального сигнального домена 4-1BB и/или функционального сигнального домена CD3 дзета, или аминокислотную последовательность, имеющую в дополнение по меньшей мере одну модификацию.
65. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–64, в которой домен антитела содержит фрагмент антитела.
66. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–65, в которой домен человеческого или гуманизированного антитела содержит scFv или домен V_H.
67. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–66, кодирующая
    (i) последовательность CDR1 тяжелой цепи (HC) GRTVSSLF, GRAVSSLF или GDSLDGYV,
    (ii) последовательность CDR2 HC ISRYSLYT или ISGDGSMR, и
    (iii) последовательность CDR3 HC ASKLEYTSNDYDS или AADPPTWDY.
68. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–67, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:40.
69. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–68, в которой

TFP включает в себя внеклеточный домен субъединицы TCR, которая содержит внеклеточный домен или его часть, белка, 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.

70. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–69, в которой кодируемый TFP включает в себя трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен белка, 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.
71. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–70, в которой кодируемый TFP включает в себя трансмембранный домен, который содержит 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.
72. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–71, дополнительно содержащая последовательность, кодирующую костимулирующий домен.
73. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п. 72, в которой 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.
74. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–73, в которой 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.
75. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–74, в которой выделенная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой мРНК.
76. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–75, в которой

TFP включает в себя иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) субъединицы TCR, которая содержит ITAM или его часть, белка, 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.

77. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п. 76, в которой ITAM замещает ITAM из CD3 гамма, CD3 дельта или CD3 эпсилон.
78. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п. 76, в которой 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.
79. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–78, причем нуклеиновая кислота содержит нуклеотидный аналог.
80. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п. 79, в которой нуклеотидный аналог выбран из группы, состоящей из 2’-O-метила, 2’-O-метоксиэтила (2’-O-MOE), 2’-O-аминопропила, 2’-дезокси, T-дезокси-2’-фтора, 2’-O-аминопропила (2’-O-AP), 2’-O-диметиламиноэтила (2’-O-DMAOE), 2’-O-диметиламинопропила (2’-O-DMAP), T-O-диметиламиноэтилоксиэтила (2’-O-DMAEOE), модифицированного 2’-O-N-метилацетамидо (2’-O-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.
81. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–80, дополнительно содержащая лидерную последовательность.
82. Рекомбинантная полипептидная молекула, кодируемая рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–81.
83. Рекомбинантная молекула TFP, содержащая связывающий домен против MUC16,

внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR.

84. Рекомбинантная молекула TFP, содержащая связывающий домен против MUC16, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR.
85. Рекомбинантная молекула TFP, содержащая связывающий домен против MUC16, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональной интеграции в эндогенный комплекс TCR.
86. Рекомбинантная молекула TFP по п. 83, содержащая антитело или фрагмент антитела, содержащий связывающий домен против MUC16, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR.
87. Рекомбинантная молекула TFP по любому из пп. 83–86, в которой связывающий домен против MUC16 представляет собой scFv, домен V_{HH} или V_H.
88. Рекомбинантная молекула TFP по любому из пп. 83–87, в которой связывающий домен против MUC16 содержит тяжелую цепь с 95–100% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:40, ее функциональным фрагментом или ее аминокислотной последовательностью, имеющими по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций.
89. Рекомбинантная молекула TFP по любому из пп. 83–88, содержащая внеклеточный домен TCR, который включает в себя внеклеточный домен или его часть, белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-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.
90. Рекомбинантная молекула TFP по любому из пп. 83–89, в которой связывающий домен против MUC16 соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности.
91. Рекомбинантная молекула TFP по любому из пп. 90, в которой линкерная область содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 4.
92. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую TFP по любому из пп. 83–91.

93. Нуклеиновая кислота по п. 92, причем нуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из ДНК и РНК.
94. Нуклеиновая кислота по п. 92 или 93, причем нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.
95. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 92–94, причем нуклеиновая кислота содержит нуклеотидный аналог.
96. Нуклеиновая кислота по п. 95, в которой нуклеотидный аналог выбран из группы, состоящей из 2'-O-метила, 2'-O-метоксиэтила (2'-O-MOE), 2'-O-аминопропила, 2'-дезокси, T-дезокси-2'-фтора, 2'-O-аминопропила (2'-O-AP), 2'-O-диметиламиноэтила (2'-O-DMAOE), 2'-O-диметиламинопропила (2'-O-DMAP), T-O-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-O-DMAEOE), модифицированного 2'-O-N-метилацетамидо (2'-O-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.
97. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 92–96, дополнительно содержащая промотор.
98. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 92–97, причем нуклеиновая кислота представляет собой транскрибированную *in vitro* нуклеиновую кислоту.
99. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 92–98, причем нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую поли(A)-хвост.
100. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 92–99, причем нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность 3'UTR.
101. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP по любому из пп. 83–100.
102. Вектор по п. 101, причем вектор выбран из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, вектора вируса саркомы Рауса (BCP) или ретровирусного вектора.
103. Вектор по пп. 101 или 102, дополнительно содержащий промотор.
104. Вектор по любому из пп. 101–103, причем вектор представляет собой транскрибируемый *in vitro* вектор.
105. Вектор по любому из пп. 101–104, в котором последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит поли(A)-хвост.
106. Вектор по любому из пп. 101–105, в котором последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит 3'UTR.
107. Клетка, содержащая рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из

пп. 51–81, полипептидную молекулу по п. 82, молекулу TFP по любому из пп. 83–91, нуклеиновую кислоту по любому из пп. 92–100, вектор по любому из пп. 101–106.

108. Клетка по п. 107, причем клетка представляет собой человеческую Т-клетку.

109. Клетка по п. 108, причем Т-клетка представляет собой CD8+ или CD4+ Т-клетку.

110. Клетка по любому из пп. 107–109, дополнительно содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанной со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена.

111. Клетка по п. 110, в которой ингибирующая молекула содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть PD1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и первичный сигнальный домен.

112. Человеческая CD8+ или CD4+ Т-клетка, содержащая по меньшей мере две молекулы TFP, при этом молекулы TFP содержат связывающий домен против MUC16, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR в человеческой CD8+ или CD4+ Т-клетке, на ней и/или на ее поверхности.

113. Белковый комплекс, содержащий:

i) молекулу TFP, содержащую связывающий домен против MUC16, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; и

ii) по меньшей мере одну эндогенную субъединицу TCR или эндогенный комплекс TCR.

114. Белковый комплекс по п. 113, в котором TCR содержит внеклеточный домен или его часть, белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта.

115. Белковый комплекс по пп. 113 или 114, в котором связывающий домен против MUC16 соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности.

116. Белковый комплекс по п. 115, в котором линкерная область содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 4.

117. Белковый комплекс, содержащий

(a) TFP, кодируемый рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты по любому из 51–81, и

(b) по меньшей мере одну эндогенную субъединицу TCR или эндогенный комплекс

TCR.

118. Белковый комплекс, содержащий:

i) молекулу TFP, содержащую связывающий домен против MUC16, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; и

ii) по меньшей мере одну эндогенную субъединицу TCR или эндогенный комплекс TCR.

119. Белковый комплекс по п. 118, в котором TCR содержит внеклеточный домен или его часть, белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта.

120. Белковый комплекс по пп. 118 или 119, в котором связывающий домен против MUC16 соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности.

121. Белковый комплекс по п. 120, в котором линкерная область содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 4.

122. Человеческая CD8+ или CD4+ Т-клетка, содержащая по меньшей мере два различных белка TFP на белковый комплекс по любому из пп. 113–121.

123. Человеческая CD8+ или CD4+ Т-клетка, содержащая по меньшей мере две различные молекулы TFP, кодируемые выделенной молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–81.

124. Популяция человеческих CD8+ или CD4+ Т-клеток, причем Т-клетки популяции отдельно или в совокупности содержат по меньшей мере две молекулы TFP, при этом молекулы TFP содержат связывающий домен против MUC16, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR в человеческой CD8+ или CD4+ Т-клетке, на ней и/или на ее поверхности.

125. Популяция человеческих CD8+ или CD4+ Т-клеток, причем Т-клетки популяции отдельно или в совокупности содержат по меньшей мере две молекулы TFP, кодируемые рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–81.

126. Способ получения клетки, включающий трансдуцирование Т-клетки рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–81, нуклеиновой кислотой по любому из пп. 92–100 или вектором по любому из пп. 101–106.

127. Способ получения популяции РНК-сконструированных клеток, включающий введение транскрибированной *in vitro* РНК или синтетической РНК в клетку, причем РНК

содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу TFP по любому из пп. 83–91.

128. Способ обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, включающий введение млекопитающему эффективного количества рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–81, полипептидной молекулы по п. 82, клетки, экспрессирующей полипептидную молекулу по п. 82, молекулу TFP по любому из пп. 83–91, нуклеиновой кислоты по любому из пп. 92–100, вектора по любому из пп. 101–106 или клетки по любому из пп. 107–112 и 122–126.
129. Способ по п. 128, в котором клетка представляет собой аутологическую Т-клетку.
130. Способ по п. 128, в котором клетка представляет собой аллогенную Т-клетку.
131. Способ по любому одному из пп. 128–130, в котором субъект является человеком.
132. Способ лечения млекопитающего, имеющего заболевание, связанное с экспрессией MUC16, включающий введение млекопитающему эффективного количества выделенной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–81, полипептидной молекулы по п. 82, клетки, экспрессирующей полипептидную молекулу по п. 82, молекулы TFP по любому из пп. 83–91, нуклеиновой кислоты по любому из пп. 92–100, вектора по любому из пп. 101–106 или клетки по любому из пп. 107–112 и 122–125.
133. Способ по п. 132, в котором заболевание, связанное с экспрессией MUC16, выбрано из группы, состоящей из пролиферативного заболевания, рака, злокачественной опухоли, миелодисплазии, миелодиспластического синдрома, предлейкоза, неонкологического показания, связанного с экспрессией MUC16.
134. Способ по п. 132, в котором заболевание представляет собой рак поджелудочной железы, рак яичника, рак молочной железы или любую их комбинацию.
135. Способ по п. 132, в котором клетки, экспрессирующие молекулу TFP, вводятся в комбинации с агентом, который повышает эффективность клетки, экспрессирующей молекулу TFP.
136. Способ по любому из пп. 132–135, в котором у млекопитающего высвобождается меньше цитокинов по сравнению с млекопитающим, которому вводят эффективное количество Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) против MUC16.
137. Способ по любому из пп. 132–136, в котором клетки, экспрессирующие молекулу TFP, вводятся в комбинации с агентом, который облегчает один или более побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей молекулу TFP.
138. Способ по любому из пп. 132–137, в котором клетки, экспрессирующие молекулу TFP, вводятся в комбинации с агентом, который лечит заболевание, связанное с MUC16.
139. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–81,

полипептидная молекула по п. 82, клетка, экспрессирующая полипептидную молекулу по п. 82, рекомбинантный TFP по любому из пп. 83–91, нуклеиновая кислота по любому из пп. 92–100, вектор по любому из пп. 101–106, комплекс по любому из пп. 113–121 или клетка по любому из пп. 107–112 и 122–125 для применения в качестве лекарственного средства.

140. Способ лечения млекопитающего, имеющего заболевание, связанное с экспрессией MUC16, включающий введение млекопитающему эффективного количества рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51–81, полипептидной молекулы по п. 82, клетки, экспрессирующей полипептидную молекулу по п. 82, рекомбинантной молекулы TFP по любому из пп. 83–91, нуклеиновой кислоты по любому из пп. 92–100, вектора по любому из пп. 101–106 или клетки по любому из пп. 107–112 и 122–125, причем у млекопитающего высвобождается меньше цитокинов по сравнению с млекопитающим, которому вводят эффективное количество Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) против MUC16.

141. Фармацевтическая композиция, содержащая

(I) Т-клетку субъекта-человека, причем Т-клетка содержит рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий

(a) субъединицу TCR, содержащую

(i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR,

(ii) трансмембранный домен TCR и

(iii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена; и

(b) антигенсвязывающий домен, содержащий связывающий домен против IL13Rα2; и

(II) фармацевтически приемлемый носитель;

причем субъединица TCR и связывающий домен против IL13Rα2 являются функционально связанными;

при этом TFP функционально взаимодействует с TCR при экспрессии в Т-клетке.

142. Фармацевтическая композиция по п. 141, в которой внеклеточный TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR субъединицы TCR получены из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, CD3 эпсилон, CD3 дельта или CD3 гамма.

143. Фармацевтическая композиция по п. 141, в которой внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR субъединицы TCR получены из одной субъединицы комплекса TCR, причем одна субъединица является альфа-цепью TCR, бета-цепью TCR, гамма-цепью TCR, дельта-цепью TCR, CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта.

144. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141–143, в которой Т-клетка проявляет повышенную цитотоксичность к клетке, экспрессирующей антиген, который специфически взаимодействует со связывающим доменом против IL13Rα2, по сравнению с Т-клеткой, не содержащей TFP.

145. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141–144, в которой последовательность, кодирующая связывающий домен против IL13Rα2, соединена с последовательностью, кодирующей внеклеточный домен TCR, с помощью кодирующей линкер последовательности.

146. Фармацевтическая композиция по п. 145, в которой линкер содержит $(G_4S)_n$, где G представляет собой глицин, S представляет собой серин и n является целым числом от 1 до 4.

147. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141–146, в которой связывающий домен против IL13Rα2 содержит

(i) последовательность CDR1 тяжелой цепи (HC) GFTSDYYI или GFASDDYI,

(ii) последовательность CDR2 HC ISSKYANT или ISSRYANT, и

(iii) последовательность CDR3 HC AADTRRYTCPDIATMHRNFDS или AMDSRRVTCPEISTMHRNFDS.

148. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141–147, в которой связывающий домен против IL13Rα2 содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности последовательности SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:71 или SEQ ID NO:76.

149. Фармацевтическая композиция по п. 148, в которой идентичность последовательности определяется с применением алгоритма BLAST с размером слова 6, матрицей BLOSUM62, штрафом за открытие 11 и штрафом за продление 1.

150. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141–148, причем фармацевтическая композиция по существу не содержит сыворотки.

151. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141–150, в которой антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

152. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141–150, в которой антигенсвязывающий домен представляет собой однодоменное антитело.

153. Фармацевтическая композиция по п. 152, в которой однодоменное антитело представляет собой домен V_H.

154. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141–153, в которой кодируемый связывающий домен против IL13Rα2 содержит связывающий домен против IL13Rα2, и при этом Т-клетки обладают большей или более эффективной цитотоксической активностью, чем CD8+ или CD4+ Т-клетки, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий (a) связывающий домен против IL13Rα2, функционально связанный с (b) по меньшей мере частью внеклеточного домена CD28, (c) трансмембранным доменом CD28, (d) по меньшей мере частью внутриклеточного домена CD28 и (e) внутриклеточным доменом CD3-дзета.

155. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141–154, в которой кодируемая молекула TFP функционально взаимодействует с эндогенным комплексом TCR, по меньшей мере с одним эндогенным полипептидом TCR или с их комбинацией при экспрессии в Т-клетке.

156. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141–155, в которой Т-клетка представляет собой первичную Т-клетку.

157. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141–156, в которой Т-клетка представляет собой CD4+ Т-клетку человека.

158. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141–156, в которой Т-клетка представляет собой CD8+ Т-клетку.

159. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141–158, в которой Т-клетка дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1 и BTLA, причем по меньшей мере часть ингибирующей молекулы связана со вторым полипептидом, содержащим положительный сигнал из внутриклеточного сигнального домена.

160. Фармацевтическая композиция по п. 159, в которой второй полипептид содержит

костимулирующий домен и первичный сигнальный домен из белка, выбранного из группы, состоящей из CD28, CD27, ICOS, CD3ζ, 41-BB, OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160 и B7-H3.

161. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141–160, в которой выработка IL-2 или IFNγ Т-клетками является повышенной в присутствии клетки, экспрессирующей антиген, который специфически взаимодействует со связывающим доменом против IL13Rα2, по сравнению с Т-клеткой, не содержащей TFP.

162. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141–161, в которой клетка является популяцией человеческих CD8+ или CD4+ Т-клеток, причем в отдельной Т-клетке популяции содержится по меньшей мере две молекулы TFP, или по меньшей мере две Т-клетки популяции вместе содержат по меньшей мере две молекулы TFP; причем по меньшей мере две молекулы TFP содержат связывающий домен против IL13Rα2, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; и при этом по меньшей мере одна из по меньшей мере двух молекул TFP функционально взаимодействует с эндогенным комплексом TCR, по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR или их комбинацией.

163. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141–162, в которой субъединица TCR получена только из CD3 эпсилон.

164. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141–162, в которой субъединица TCR получена только из CD3 гамма.

165. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 141–162, в которой субъединица TCR получена только из CD3 дельта.

166. Способ обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, включающий введение млекопитающему эффективного количества популяции Т-клеток, трансдуцированных рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий

(a) субъединицу TCR, содержащую

(i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и

(ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена TCR; и

(b) домен антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, который представляет собой связывающий домен против IL13Rα2;

причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными,

при этом TFP внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке, и

при этом после лечения высвобождаются более низкие уровни цитокинов по сравнению с уровнями цитокинов у млекопитающего, получившего лечение CAR-Т-клетками, содержащими тот же домен антитела.

167. Способ по п. 166, в котором домен антитела представляет собой домен V_{HH}, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:71 или SEQ ID NO:76.

168. Способ по п. 167, в которой идентичность последовательности определяется с применением алгоритма BLAST с размером слова 6, матрицей BLOSUM62, штрафом за открытие 11 и штрафом за продление 1.

169. Способ по любому из пп. 166–168, в котором Т-клетка представляет собой аутологическую Т-клетку человека.

170. Способ по любому из пп. 166–168, в котором Т-клетка представляет собой аллогенную Т-клетку.

171. Способ по любому одному из пп. 166–170, в котором субъект является человеком.

172. Способ лечения млекопитающего, имеющего заболевание, связанное с экспрессией IL13Rα2, включающий введение млекопитающему эффективного количества популяции Т-клеток, трансдуцированных рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий

(a) субъединицу TCR, содержащую

(i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и

(ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена TCR; и

(b) домен антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, который представляет собой связывающий домен против IL13Rα2;

причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными,

при этом TFP внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке, и

при этом после лечения высвобождаются более низкие уровни цитокинов по сравнению с уровнями цитокинов у млекопитающего, получившего лечение CAR-Т-клетками, содержащими тот же домен антитела.

173. Способ по п. 172, в котором домен антитела представляет собой домен V_{HH}, имеющий

по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:71 или SEQ ID NO:76.

174. Способ по п. 173, в которой идентичность последовательности определяется с применением алгоритма BLAST с размером слова 6, матрицей BLOSUM62, штрафом за открытие 11 и штрафом за продление 1.

175. Способ по любому из пп. 172–174, в котором Т-клетка представляет собой аутологическую Т-клетку человека.

176. Способ по любому из пп. 172–174, в котором Т-клетка представляет собой аллогенную Т-клетку.

177. Способ по любому из пп. 166–176, в котором субъединица TCR TFP дополнительно содержит трансмембранный домен TCR.

178. Способ по п. 177, в котором внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR получены из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта.

179. Способ по п. 177, в котором внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR субъединицы TCR получены из одной субъединицы комплекса TCR, причем одна субъединица является альфа-цепью TCR, бета-цепью TCR, гамма-цепью TCR, дельта-цепью TCR, CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта.

180. Способ по любому из пп. 166–179, в котором внутриклеточный сигнальный домен TCR получен из CD3 эпсилон или CD3 гамма.

181. Способ по любому из пп. 172–180, в котором заболевание, связанное с экспрессией IL13Rα2, выбрано из группы, состоящей из пролиферативного заболевания, рака, злокачественной опухоли, неонкологического показания, связанного с экспрессией IL13Rα2.

182. Способ по любому из пп. 172–181, в котором заболевание представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из глиобластомы, мезотелиомы, почечно-клеточной карциномы, рака желудка, рака молочной железы, рака легкого, рака яичника, рака предстательной железы, рака толстой кишки, рака шейки матки, рака головного мозга, рака печени, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака мочевого пузыря, рака мочеточника, рака почки, рака эндометрия, рака пищевода, рака ЖКТ, карциномы вилочковой железы, холангиокарциномы и рака желудка, и любой их комбинации.

183. Способ по любому из пп. 172–181, в котором заболевание представляет собой рак,

выбранный из группы, состоящей из глиобластомы, мезотелиомы, папиллярной серозной аденокарциномы яичника, светлоклеточной карциномы яичника, смешанной карциномы яичника Мюллера, эндометриоидной слизеобразующей карциномы яичника, аденокарциномы поджелудочной железы, протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, серозной карциномы матки, аденокарциномы легкого, карциномы внепеченочного желчного протока, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищевода, колоректальной аденокарциномы, аденокарциномы молочной железы, заболевания, связанного с экспрессией IL13Rα2, и любой их комбинации.

184. Способ по любому из пп. 166–183, в котором клетки, экспрессирующие молекулу TFP, вводятся в комбинации с агентом, который повышает эффективность клетки, экспрессирующей молекулу TFP.

185. Способ по любому из пп. 166–184, в котором для данного цитокина после лечения высвобождается по меньшей мере на 10% меньше данного цитокина по сравнению с количеством данного цитокина млекопитающего, получившего лечение CAR-T-клеткой, содержащей тот же самый домен антитела.

186. Способ по п. 185, в котором данный цитокин включает в себя один или более цитокинов, выбранных из группы, состоящей из IL-2, IFN-γ, IL-4, TNF-α, IL-6, IL-13, IL-5, IL-10, sCD137, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β и любой их комбинации.

187. Способ по любому из пп. 166–186, в котором рост опухоли у млекопитающего подавляется таким образом, что размер опухоли составляет не более 10%, не более 20%, не более 30%, не более 40%, не более 50%, или не более 60% от размера опухоли у млекопитающего, получившего лечение Т-клетками, которые не экспрессируют TFP, после не менее 8 дней лечения, причем млекопитающее, получившее лечение Т-клетками, экспрессирующими TFP, и млекопитающее, получившее лечение Т-клетками, которые не экспрессируют TFP, имеют одинаковый размер опухоли до начала лечения.

188. Способ по п. 187, в котором рост опухоли у млекопитающего полностью подавляется.

189. Способ по п. 188, в котором рост опухоли у млекопитающего полностью подавляется в течение по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 40 дней, по меньшей мере 50 дней, по меньшей мере 60 дней, по меньшей мере 70 дней, по меньшей мере 80 дней, по меньшей мере 90 дней, по меньшей мере 100 дней или более.

190. Способ по любому из пп. 166–189, в котором популяция Т-клеток, трансдуцированных TFP, уничтожает сходное количество опухолевых клеток по сравнению с CAR-T-

клетками, содержащими аналогичный домен антитела.

191. Способ по любому из пп. 166–190, в котором популяция Т-клеток, трансдуцированных TFP, имеет отличающийся профиль экспрессии генов от CAR-Т-клеток, содержащих аналогичный домен антитела.

192. Способ по п. 191, в котором уровень экспрессии гена отличается в Т-клетках, трансдуцированных TFP, от уровня экспресии этого гена в CAR-Т-клетках, содержащих аналогичный домен антитела.

193. Способ по п. 192, в котором ген выполняет функцию презентации антигена, сигнализации TCR, гомеостаза, метаболизма, хемокиновой сигнализации, цитокиновой сигнализации, toll-подобной рецепторной сигнализации, сигнализации MMP и молекул адгезии или связанной с TNFR сигнализации.

194. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий

(a) субъединицу TCR, содержащую

(i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и

(ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон; и

(b) антигенсвязывающий домен, содержащий связывающий домен против IL13Rα2;

причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными, и при этом TFP внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке.

195. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий

(a) субъединицу TCR, содержащую

(i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и

(ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 гамма; и

(b) антигенсвязывающий домен, содержащий связывающий домен против IL13Rα2;

причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными, и при этом TFP внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке.

196. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий

(a) субъединицу TCR, содержащую

(i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и

(ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 дельта; и

(b) антигенсвязывающий домен, содержащий связывающий домен против IL13Rα2; причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными, и при этом TFP внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке.

197. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий

(a) субъединицу TCR, содержащую

(i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и

(ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена TCR альфа; и

(b) антигенсвязывающий домен, содержащий связывающий домен против IL13Rα2; причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными, и при этом TFP внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке.

198. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий

(a) субъединицу TCR, содержащую

(i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и

(ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена TCR бета; и

(b) антигенсвязывающий домен, содержащий связывающий домен против IL13Rα2; причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными, и при этом TFP внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке.

199. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–198, в которой домен антитела представляет собой домен человеческого или гуманизированного антитела.

200. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–199, в которой кодируемый антигенсвязывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности.

201. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п. 200, в которой кодируемая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 4.

202. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–201, в которой субъединица TCR содержит внеклеточный домен TCR.

203. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–202, в которой субъединица TCR содержит трансмембранный домен TCR.

204. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–203, в которой субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR.

205. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–204, в которой субъединица TCR содержит (i) внеклеточный домен 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.
206. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–205, в которой субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен, выбранный из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, или аминокислотную последовательность, имеющую в дополнение по меньшей мере одну модификацию.
207. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–206, в которой субъединица TCR содержит внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен, выбранный из функционального сигнального домена 4-1BB и/или функционального сигнального домена CD3 дзета, или аминокислотную последовательность, имеющую в дополнение по меньшей мере одну модификацию.
208. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–207, в которой домен антитела содержит фрагмент антитела.
209. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–208, в которой домен человеческого или гуманизированного антитела содержит scFv или домен V_H.
210. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–209, кодирующая
    (i) последовательность CDR1 тяжелой цепи (HC) GFTSDYYI или GFASDDYI,
    (ii) последовательность CDR2 HC ISSKYANT или ISSRYANT, и
    (iii) последовательность CDR3 HC AADTRRYTCPDIATMHRNFDS или AMDSRRVTCPEISTMHRNFDS.
211. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–210, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:71 или SEQ ID NO:76.
212. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п. 211, у которой идентичность последовательности определяется с применением алгоритма BLAST с размером слова 6, матрицей BLOSUM62, штрафом за открытие 11 и штрафом за продление 1.
213. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–212, в которой

TFP включает в себя внеклеточный домен субъединицы TCR, которая содержит внеклеточный домен или его часть, белка, 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.

214. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–213, в которой кодируемый TFP включает в себя трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен белка, 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.

215. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–214, в которой кодируемый TFP включает в себя трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-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.

216. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–215, дополнительно содержащая последовательность, кодирующую костимулирующий домен.

217. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п. 216, в которой костимулирующий домен содержит функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a la/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137), и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

218. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–217, в которой 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.

219. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–218, в которой выделенная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой мРНК.

220. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–219, в которой

TFP включает в себя иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) субъединицы TCR, которая содержит ITAM или его часть, белка, 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.

221. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п. 220, в которой ITAM замещает ITAM из CD3 гамма, CD3 дельта или CD3 эпсилон.

222. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п. 221, в которой 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.

223. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–222, причем нуклеиновая кислота содержит нуклеотидный аналог.

224. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п. 223, в которой нуклеотидный аналог выбран из группы, состоящей из 2’-O-метила, 2’-O-метоксиэтила (2’-O-MOE), 2’-O-аминопропила, 2’-дезокси, T-дезокси-2’-фтора, 2’-O-аминопропила (2’-O-AP), 2’-O-диметиламиноэтила (2’-O-DMAOE), 2’-O-диметиламинопропила (2’-O-DMAP), T-O-диметиламиноэтилоксиэтила (2’-O-DMAEOE), модифицированного 2’-O-N-метилацетамидо (2’-O-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.

225. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–224, дополнительно содержащая лидерную последовательность.

226. Рекомбинантная полипептидная молекула, кодируемая рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–225.

227. Рекомбинантная молекула TFP, содержащая связывающий домен против IL13Rα2,

внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR.

228. Рекомбинантная молекула TFP, содержащая связывающий домен против IL13Rα2, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR.

229. Рекомбинантная молекула TFP, содержащая связывающий домен против IL13Rα2, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональной интеграции в эндогенный комплекс TCR.

230. Рекомбинантная молекула TFP по п. 227, содержащая антитело или фрагмент антитела, содержащий связывающий домен против IL13Rα2, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR.

231. Рекомбинантная молекула TFP по любому из пп. 227–230, в которой связывающий домен против IL13Rα2 представляет собой scFv, домен V_{HH} или V_H.

232. Рекомбинантная молекула TFP по любому из пп. 227–231, в которой связывающий домен против IL13Rα2 содержит тяжелую цепь с 95–100% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:71 или SEQ ID NO:76, ее функциональным фрагментом или ее аминокислотной последовательностью, имеющими по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций.

233. Рекомбинантная молекула TFP по п. 232, у которой идентичность последовательности определяется с применением алгоритма BLAST с размером слова 6, матрицей BLOSUM62, штрафом за открытие 11 и штрафом за продление 1.

234. Рекомбинантная молекула TFP по любому из пп. 227–233, содержащая внеклеточный домен TCR, который включает в себя внеклеточный домен или его часть, белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-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.

235. Рекомбинантная молекула TFP по любому из пп. 227–234, в которой связывающий домен против IL13Rα2 соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности.

236. Рекомбинантная молекула TFP по любому из пп. 235, в которой линкерная область

содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 4.

237. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую TFP по любому из пп. 227–236.

238. Нуклеиновая кислота по п. 237, причем нуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из ДНК и РНК.

239. Нуклеиновая кислота по пп. 237 или 238, причем нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.

240. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 237–239, причем нуклеиновая кислота содержит нуклеотидный аналог.

241. Нуклеиновая кислота по п. 240, в которой нуклеотидный аналог выбран из группы, состоящей из 2'-O-метила, 2'-O-метоксиэтила (2'-O-MOE), 2'-O-аминопропила, 2'-дезокси, T-дезокси-2'-фтора, 2'-O-аминопропила (2'-O-AP), 2'-O-диметиламиноэтила (2'-O-DMAOE), 2'-O-диметиламинопропила (2'-O-DMAP), T-O-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-O-DMAEOE), модифицированного 2'-O-N-метилацетамидо (2'-O-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.

242. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 237–241, дополнительно содержащая промотор.

243. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 237–242, причем нуклеиновая кислота представляет собой транскрибированную *in vitro* нуклеиновую кислоту.

244. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 237–243, причем нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую поли(A)-хвост.

245. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 237–244, причем нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность 3'UTR.

246. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP по любому из пп. 227–236.

247. Вектор по п. 246, причем вектор выбран из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, вектора вируса саркомы Рауса (ВСР) или ретровирусного вектора.

248. Вектор по пп. 246 или 247, дополнительно содержащий промотор.

249. Вектор по любому из пп. 246–248, причем вектор представляет собой транскрибируемый *in vitro* вектор.

250. Вектор по любому из пп. 246–249, в котором последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит поли(A)-хвост.

251. Вектор по любому из пп. 246–250, в котором последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит 3'UTR.

252. Клетка, содержащая рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–225, полипептидную молекулу по п. 226, молекулу TFP по любому из пп. 227–236, нуклеиновую кислоту по любому из пп. 237–245, вектор по любому из пп. 246–251.

253. Клетка по п. 252, причем клетка представляет собой человеческую Т-клетку.

254. Клетка по п. 253, причем Т-клетка представляет собой CD8+ или CD4+ Т-клетку.

255. Клетка по любому из пп. 252–254, дополнительно содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанной со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена.

256. Клетка по п. 255, в которой ингибирующая молекула содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть PD1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и первичный сигнальный домен.

257. Человеческая CD8+ или CD4+ Т-клетка, содержащая по меньшей мере две молекулы TFP, при этом молекулы TFP содержат связывающий домен против IL13Rα2, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR в человеческой CD8+ или CD4+ Т-клетке, на ней и/или на ее поверхности.

258. Белковый комплекс, содержащий:

i) молекулу TFP, содержащую связывающий домен против IL13Rα2, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; и

ii) по меньшей мере одну эндогенную субъединицу TCR или эндогенный комплекс TCR.

259. Белковый комплекс по п. 258, в котором TCR содержит внеклеточный домен или его часть, белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта.

260. Белковый комплекс по пп. 258 или 259, в котором связывающий домен против IL13Rα2 соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности.

261. Белковый комплекс по п. 260, в котором линкерная область содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 4.

262. Белковый комплекс, содержащий

(a) TFP, кодируемый рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты по любому из 194–225, и

(b) по меньшей мере одну эндогенную субъединицу TCR или эндогенный комплекс TCR.

263. Белковый комплекс, содержащий:

iii) молекулу TFP, содержащую связывающий домен против IL13Rα2, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; и

iv)по меньшей мере одну эндогенную субъединицу TCR или эндогенный комплекс TCR.

264. Белковый комплекс по п. 263, в котором TCR содержит внеклеточный домен или его часть, белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта.

265. Белковый комплекс по пп. 263 или 264, в котором связывающий домен против IL13Rα2 соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности.

266. Белковый комплекс по п. 265, в котором линкерная область содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 4.

267. Человеческая CD8+ или CD4+ Т-клетка, содержащая по меньшей мере два различных белка TFP на белковый комплекс по любому из пп. 258–266.

268. Человеческая CD8+ или CD4+ Т-клетка, содержащая по меньшей мере две различные молекулы TFP, кодируемые рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–225.

269. Популяция человеческих CD8+ или CD4+ Т-клеток, причем Т-клетки популяции отдельно или в совокупности содержат по меньшей мере две молекулы TFP, при этом молекулы TFP содержат связывающий домен против IL13Rα2, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR в человеческой CD8+ или CD4+ Т-клетке, на ней и/или на ее поверхности.

270. Популяция человеческих CD8+ или CD4+ Т-клеток, причем Т-клетки популяции отдельно или в совокупности содержат по меньшей мере две молекулы TFP, кодируемые рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–225.

271. Способ получения клетки, включающий трансдуцирование Т-клетки рекомбинантной

молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–225, нуклеиновой кислотой по любому из пп. 237–245 или вектором по любому из пп. 246–251.

272. Способ получения популяции РНК-сконструированных клеток, включающий в себя введение транскрибированной *in vitro* РНК или синтетической РНК в клетку, причем РНК содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу TFP по любому из пп. 227–236.

273. Способ обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, включающий введение млекопитающему эффективного количества рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–225, полипептидной молекулы по п. 226, клетки, экспрессирующей полипептидную молекулу по п. 226, рекомбинантной молекулы TFP по любому из пп. 227–236, нуклеиновой кислоты по любому из пп. 237–245, вектора по любому из пп. 246–251 или клетки по любому из пп. 252–257 и 267–270.

274. Способ по п. 273, в котором клетка представляет собой аутологическую Т-клетку.

275. Способ по п. 273, в котором клетка представляет собой аллогенную Т-клетку.

276. Способ по любому одному из пп. 273–275, в котором субъект является человеком.

277. Способ лечения млекопитающего, имеющего заболевание, связанное с экспрессией IL13Rα2, включающий введение млекопитающему эффективного количества выделенной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–225, полипептидной молекулы по п. 226, клетки, экспрессирующей полипептидную молекулу по п. 226, рекомбинантной молекулы TFP по любому из пп. 227–236, нуклеиновой кислоты по любому из пп. 237–245, вектора по любому из пп. 246–251 или клетки по любому из пп. 252–257 и 267–270.

278. Способ по п. 277, в котором заболевание, связанное с экспрессией IL13Rα2, выбрано из группы, состоящей из пролиферативного заболевания, рака, злокачественной опухоли, миелодисплазии, миелодиспластического синдрома, предлейкоза, неонкологического показания, связанного с экспрессией IL13Rα2.

279. Способ по п. 277, в котором заболевание представляет собой рак поджелудочной железы, рак яичника, рак молочной железы или любую их комбинацию.

280. Способ по п. 277, в котором клетки, экспрессирующие молекулу TFP, вводятся в комбинации с агентом, который повышает эффективность клетки, экспрессирующей молекулу TFP.

281. Способ по любому из пп. 277–280, в котором у млекопитающего высвобождается меньше цитокинов по сравнению с млекопитающим, которому вводят эффективное количество Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) против

IL13Rα2.

282. Способ по любому из пп. 277–281, в котором клетки, экспрессирующие молекулу TFP, вводятся в комбинации с агентом, который облегчает один или более побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей молекулу TFP.

283. Способ по любому из пп. 277–282, в котором клетки, экспрессирующие молекулу TFP, вводятся в комбинации с агентом, который лечит заболевание, связанное с IL13Rα2.

284. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–225, полипептидная молекула по п. 226, клетка, экспрессирующая полипептидную молекулу по п. 226, рекомбинантный TFP по любому из пп. 227–236, нуклеиновая кислота по любому из пп. 237–245, вектор по любому из пп. 246–251, комплекс по любому из пп. 258–266 или клетка по любому из пп. 252–257 и 267–270 для применения в качестве лекарственного средства.

285. Способ лечения млекопитающего, имеющего заболевание, связанное с экспрессией IL13Rα2, включающий введение млекопитающему эффективного количества рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–225, полипептидной молекулы по п. 226, клетки, экспрессирующей полипептидную молекулу по п. 226, рекомбинантной молекулы TFP по любому из пп. 227–236, нуклеиновой кислоты по любому из пп. 237–245, вектора по любому из пп. 246–251 или клетки по любому из пп. 252–257 и 267–270, причем у млекопитающего высвобождается меньше цитокинов по сравнению с млекопитающим, которому вводят эффективное количество Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) против IL13Rα2.

286. Способ лечения млекопитающего, имеющего солидную опухоль, которая содержит экспрессирующие IL13Rα2 клетки, включающий введение млекопитающему эффективного количества рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 194–225, полипептидной молекулы по п. 226, клетки, экспрессирующей полипептидную молекулу по п. 226, рекомбинантной молекулы TFP по любому из пп. 227–236, нуклеиновой кислоты по любому из пп. 237–245, вектора по любому из пп. 246–251 или клетки по любому из пп. 252–257 и 267–270, при этом уменьшается объем опухоли или подавляется рост опухоли.

287. Способ обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, включающий введение млекопитающему эффективного количества популяции Т-клеток, трансдуцированных рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий

(a) субъединицу TCR, содержащую

(i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и

(ii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена; и

(b) домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, который представляет собой связывающий домен против мезотелина; причем субъединица TCR и домен антитела являются функционально связанными, причем TFP внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке, и при этом популяция Т-клеток предпочтительно уничтожает опухолевые клетки с более высокой экспрессией мезотелина по сравнению с опухолевыми клетками с более низкой экспрессией мезотелина.

288. Способ по п 287, в котором субъединица TCR дополнительно содержит трансмембранный домен TCR.

289. Способ по пп. 287 или 288, в котором внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR получены из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта.

290. Способ по пп. 287 или 288, в котором внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR субъединицы TCR получены из одной субъединицы комплекса TCR, причем одна субъединица является альфа-цепью TCR, бета-цепью TCR, гамма-цепью TCR, дельта-цепью TCR, CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта.

291. Способ по любому из пп. 287–290, в котором внутриклеточный сигнальный домен TCR получен из CD3 эпсилон или CD3 гамма.

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

Клон 1 IL13Ra2

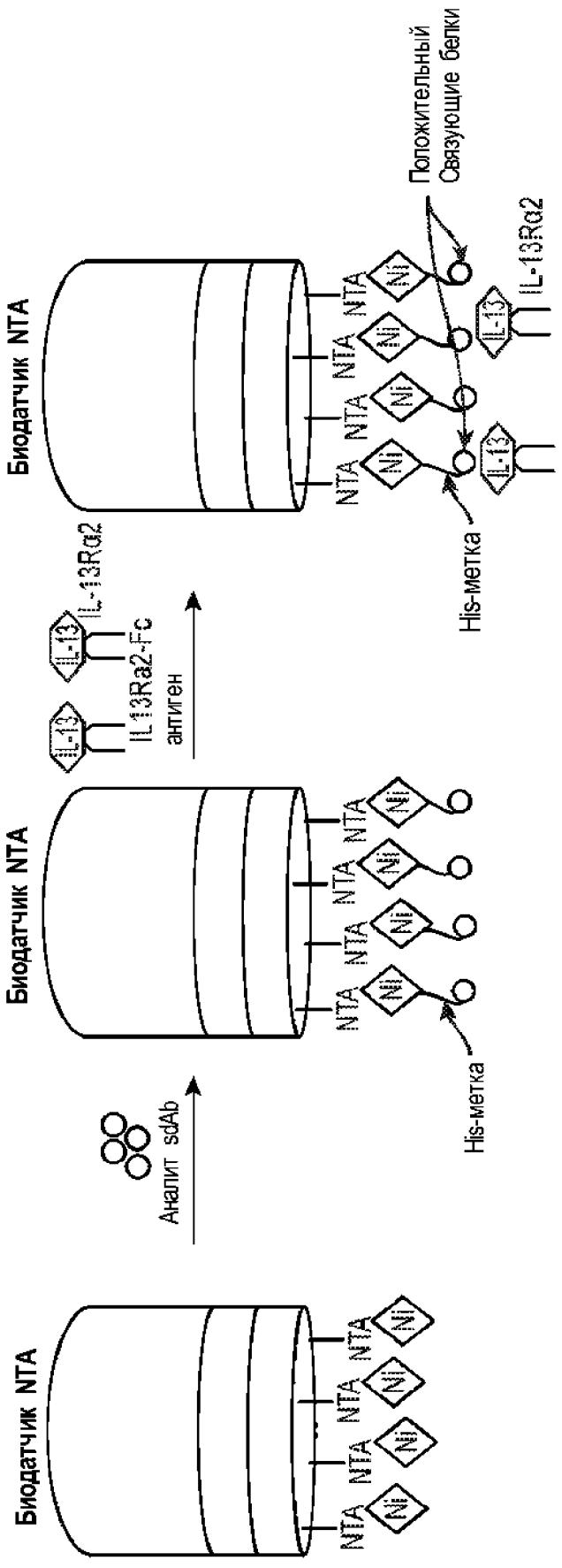
```
DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYYIIGWFRQAPGKEREGVSCISSKYANTNYADSVKGRFTQSRGAAKNTVYLQMNALKPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIATMHRNFDSWGQGTQVTVSS - исходная
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYYIMGWVRQAPGKGLEWVSCISSKYANTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIATMHRNFDSWGQGTLVTVSS - v10
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYYIMGWFRQAPGKGLEWVSCISSKYANTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIATMHRNFDSWGQGTLVTVSS - v9
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYYIMGWFRQAPGKGLEGVSCISSKYANTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIATMHRNFDSWGQGTLVTVSS - v8
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYYIMGWFRQAPGKGLEGVSCISSKYANTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIATMHRNFDSWGQGTQVTVSS - v7
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYYIMGWFRQAPGKGLEGVSCISSKYANTNYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIATMHRNFDSWGQGTQVTVSS - v6
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYYIMGWFRQAPGKGLEGVSCISSKYANTNYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIATMHRNFDSWGQGTQVTVSS - v5
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYYIMGWFRQAPGKGLEGVSCISSKYANTNYADSVKGRFTISRGNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIATMHRNFDSWGQGTQVTVSS - v4
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYYIMGWFRQAPGKGLEGVSCISSKYANTNYADSVKGRFTISRGNAKNTLYLQMNALRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIATMHRNFDSWGQGTQVTVSS - v4
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYYIMGWFRQAPGKGLEGVSCISSKYANTNYADSVKGRFTISRGNAKNTVYLQMNALRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIATMHRNFDSWGQGTQVTVSS - v3
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYYIMGWFRQAPGKGLEGVSCISSKYANTNYADSVKGRFTQSRGNAKNTVYLQMNALRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIATMHRNFDSWGQGTQVTVSS - v2
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYYIMGWFRQAPGKELEGVSCISSKYANTNYADSVKGRFTQSRGNAKNTVYLQMNALRPEDTAVYYCAADTRRYTCPDIATMHRNFDSWGQGTQVTVSS - v1
```

Клон 2 IL13Ra2

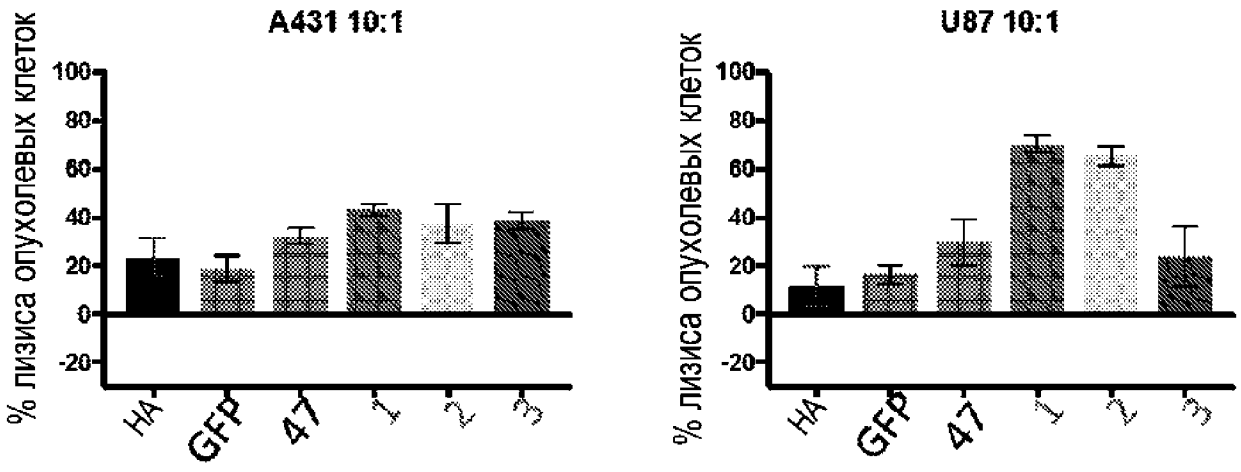
```
DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFASDDYIIGWFRQAPGKEREGVSCISSRYANTVYTDSVKGRFRISRGTAKNTVYLQMSALKPEDTAVYYCAMDSRRVTCPEISTMHRNFDSWGQGTQVTVSS - исходная
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFASDDYIMGWVRQAPGKGLEWVSCISSRYANTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAMDSRRVTCPEISTMHRNFDSWGQGTLVTVSS - v10
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFASDDYIMGWFRQAPGKGLEWVSCISSRYANTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAMDSRRVTCPEISTMHRNFDSWGQGTLVTVSS - v9
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFASDDYIMGWFRQAPGKGLEGVSCISSRYANTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAMDSRRVTCPEISTMHRNFDSWGQGTLVTVSS - v8
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFASDDYIMGWFRQAPGKGLEGVSCISSRYANTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAMDSRRVTCPEISTMHRNFDSWGQGTQVTVSS - v7
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFASDDYIMGWFRQAPGKGLEGVSCISSRYANTVYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAMDSRRVTCPEISTMHRNFDSWGQGTQVTVSS - v6
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFASDDYIMGWFRQAPGKGLEGVSCISSRYANTVYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAMDSRRVTCPEISTMHRNFDSWGQGTQVTVSS - v5
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFASDDYIMGWFRQAPGKGLEGVSCISSRYANTVYADSVKGRFTISRGNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAMDSRRVTCPEISTMHRNFDSWGQGTQVTVSS - v4
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFASDDYIMGWFRQAPGKGLEGVSCISSRYANTVYADSVKGRFTISRGNAKNTVYLQMSSLRPEDTAVYYCAMDSRRVTCPEISTMHRNFDSWGQGTQVTVSS - v3
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFASDDYIMGWFRQAPGKGLEGVSCISSRYANTVYADSVKGRFTISRGNAKNTVYLQMSALRPEDTAVYYCAMDSRRVTCPEISTMHRNFDSWGQGTQVTVSS - v2
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFASDDYIMGWFRQAPGKGLEGVSCISSRYANTVYADSVKGRFRISRGNAKNTVYLQMSALRPEDTAVYYCAMDSRRVTCPEISTMHRNFDSWGQGTQVTVSS - v1
```

CDR выделены черным курсивом
Константные каркасные области показаны серым цветом
Гуманизирующие мутации в константных областях показаны черным жирным шрифтом

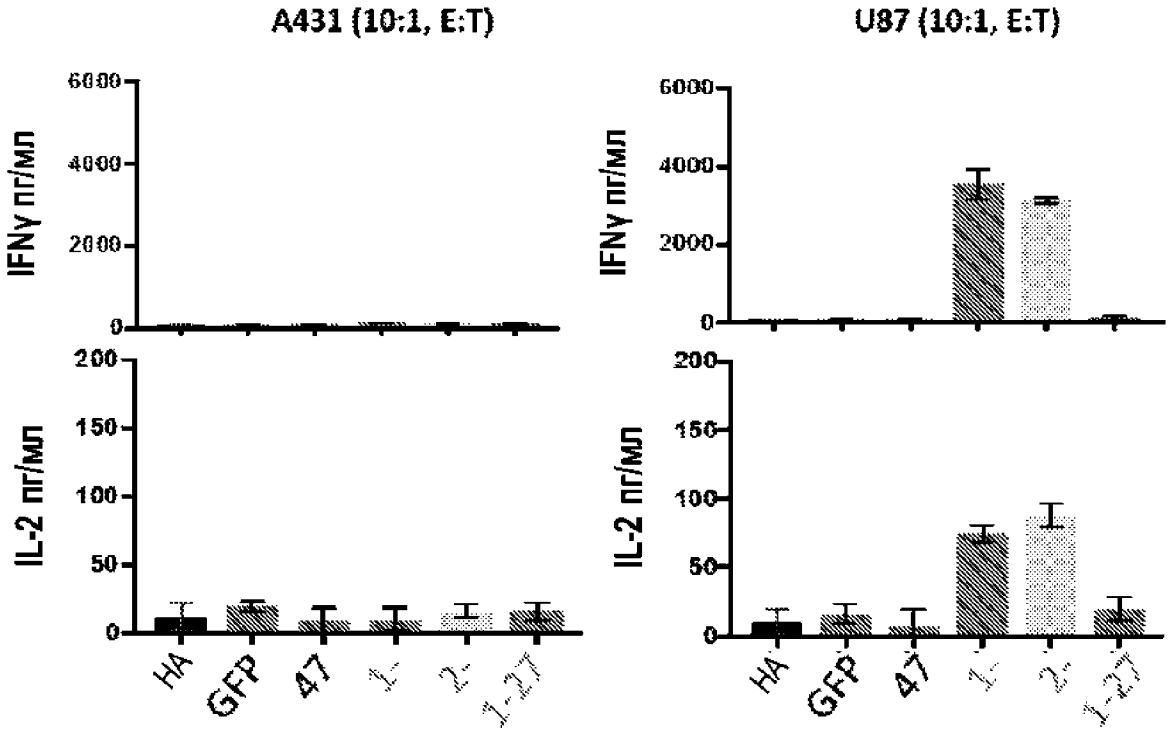
ФИГ. 1


Биодатчик NTA
Анализ sdAb
His-метка
IL-13
IL13Ra2-Fc
антиген
IL-13Rα2
Положительный
Связующие белки

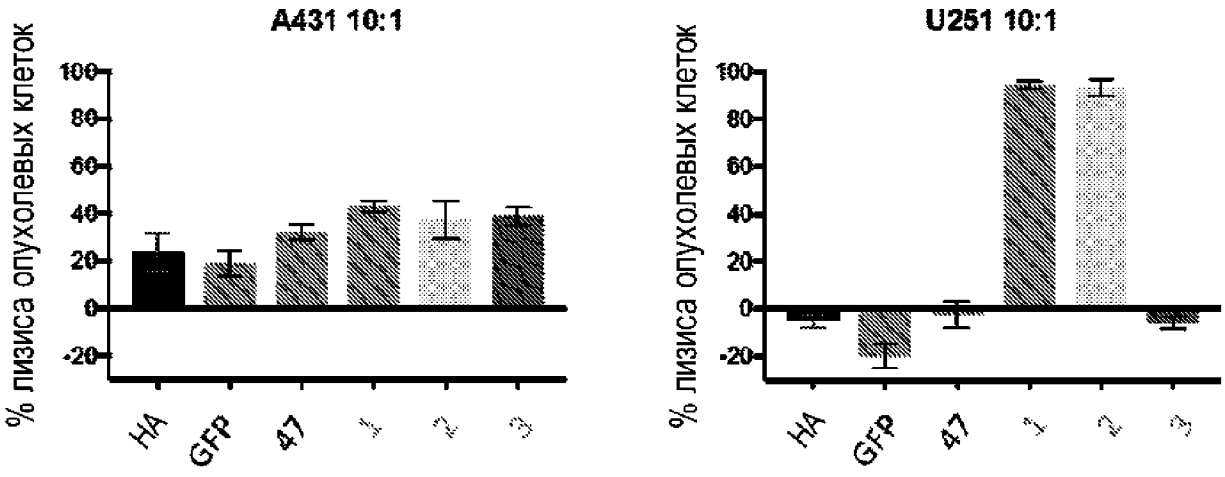
ФИГ. 2


A431 10:1
% лизиса опухолевых клеток
100
80
60
40
20
0
-20
HA
GFP
47
1
2
3
U87 10:1
% лизиса опухолевых клеток
100
80
60
40
20
0
-20
HA
GFP
47
1
2
3

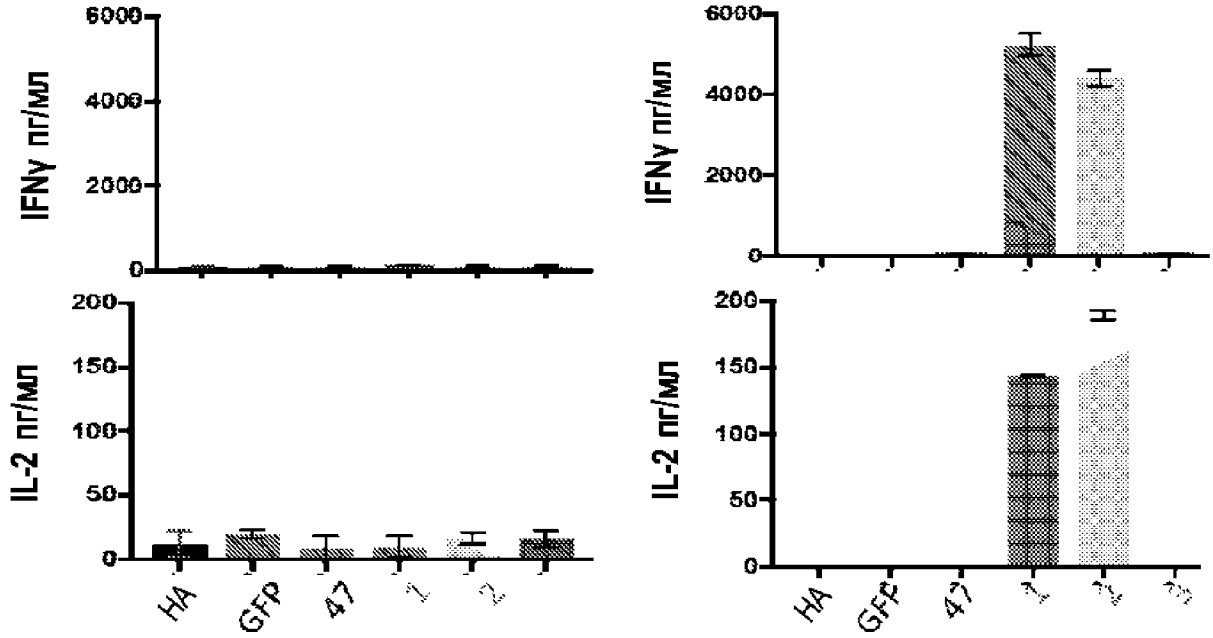
ФИГ. 3А


A431 (10:1, E:T)
IFNγ пг/мл
6000
4000
2000
0
IL-2 пг/мл
200
150
100
50
0
HA
GFP
47
1-
2-
1-27
U87 (10:1, E:T)
IFNγ пг/мл
6000
4000
2000
0
IL-2 пг/мл
200
150
100
50
0
HA
GFP
47
1-
2-
1-27

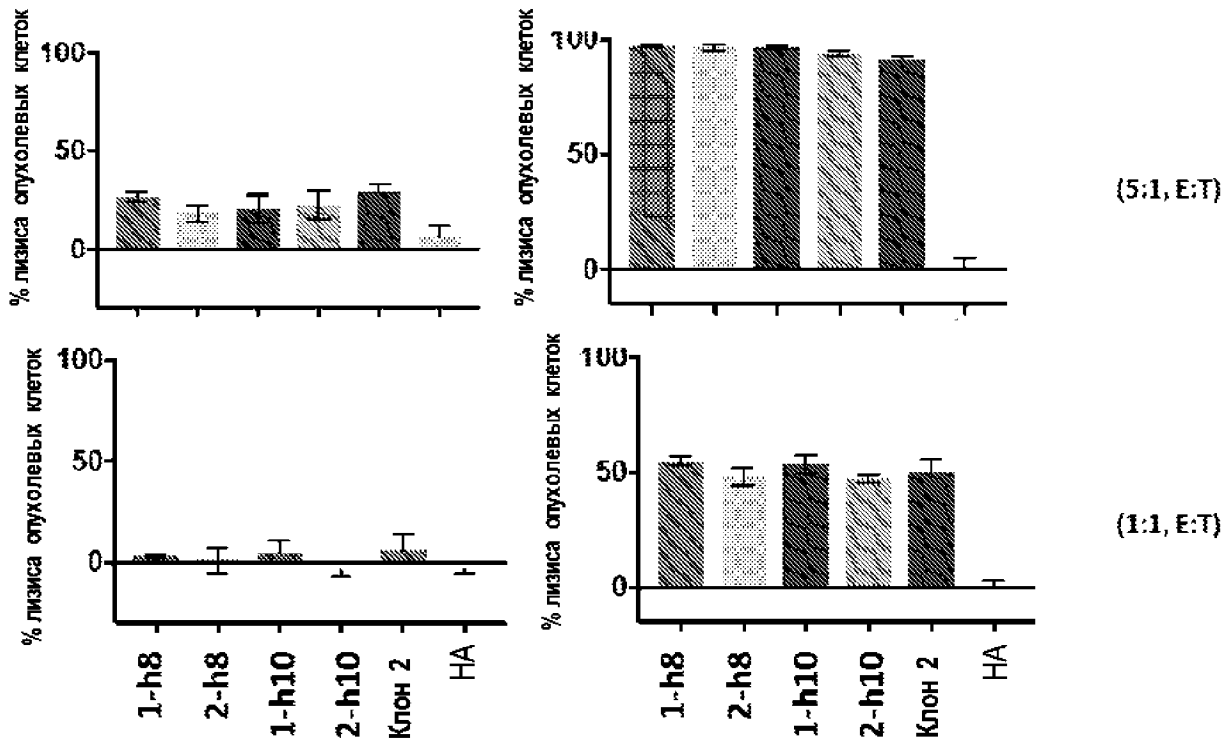
ФИГ. 3В


A431 10:1
U251 10:1
% лизиса опухолевых клеток
100
80
60
40
20
0
-20
HA
GFP
47
1
2
3

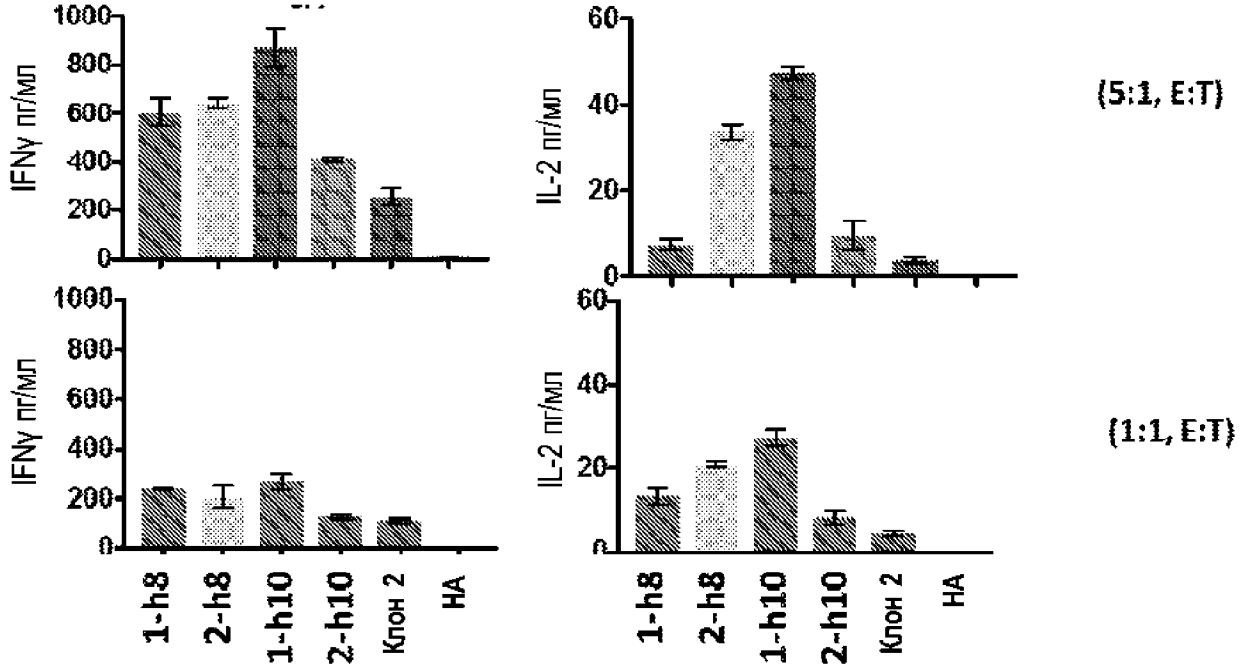
ФИГ. 3C


IFNγ пг/мл
6000
4000
2000
0
IL-2 пг/мл
200
150
100
50
0
HA
GFP
47
1
2
H

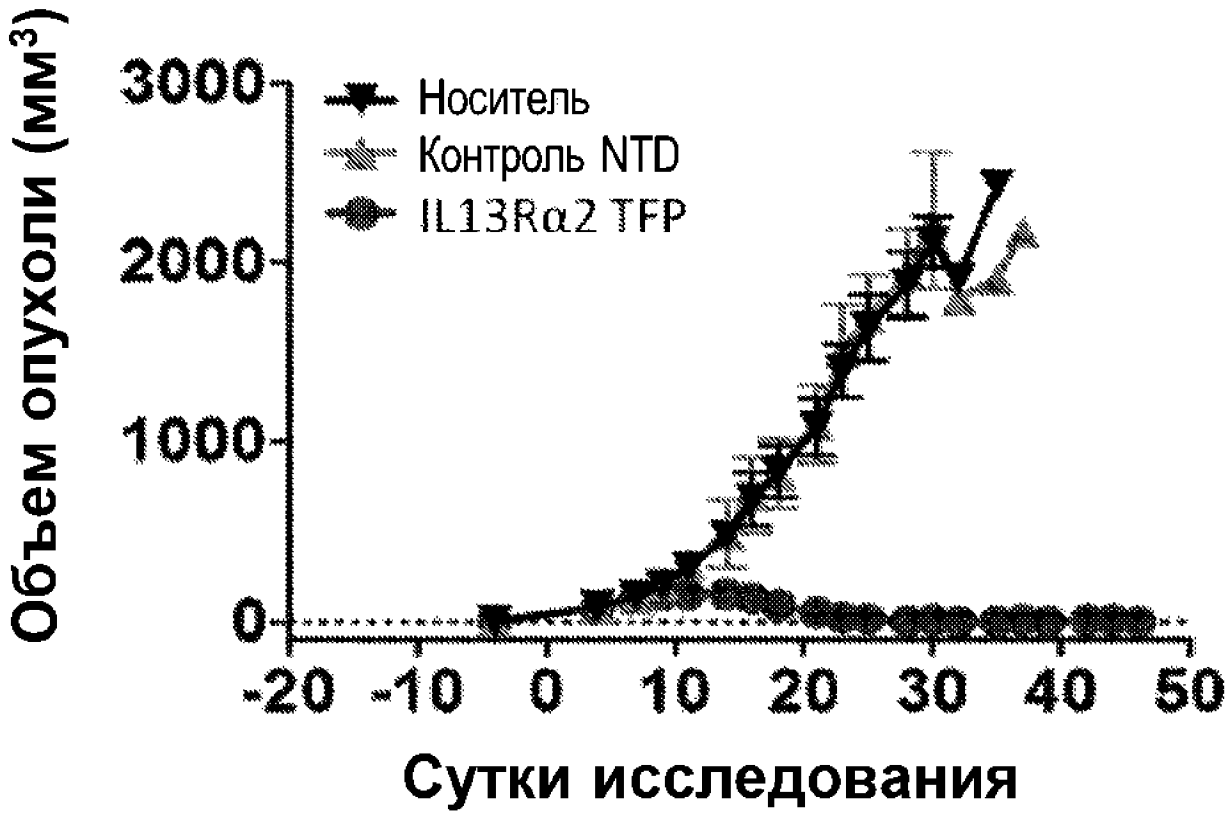
ФИГ. 3D


% лизиса опухолевых клеток
100
50
0
(5:1, E:T)
(1:1, E:T)
1-h8
2-h8
1-h10
2-h10
Клон 2
НА

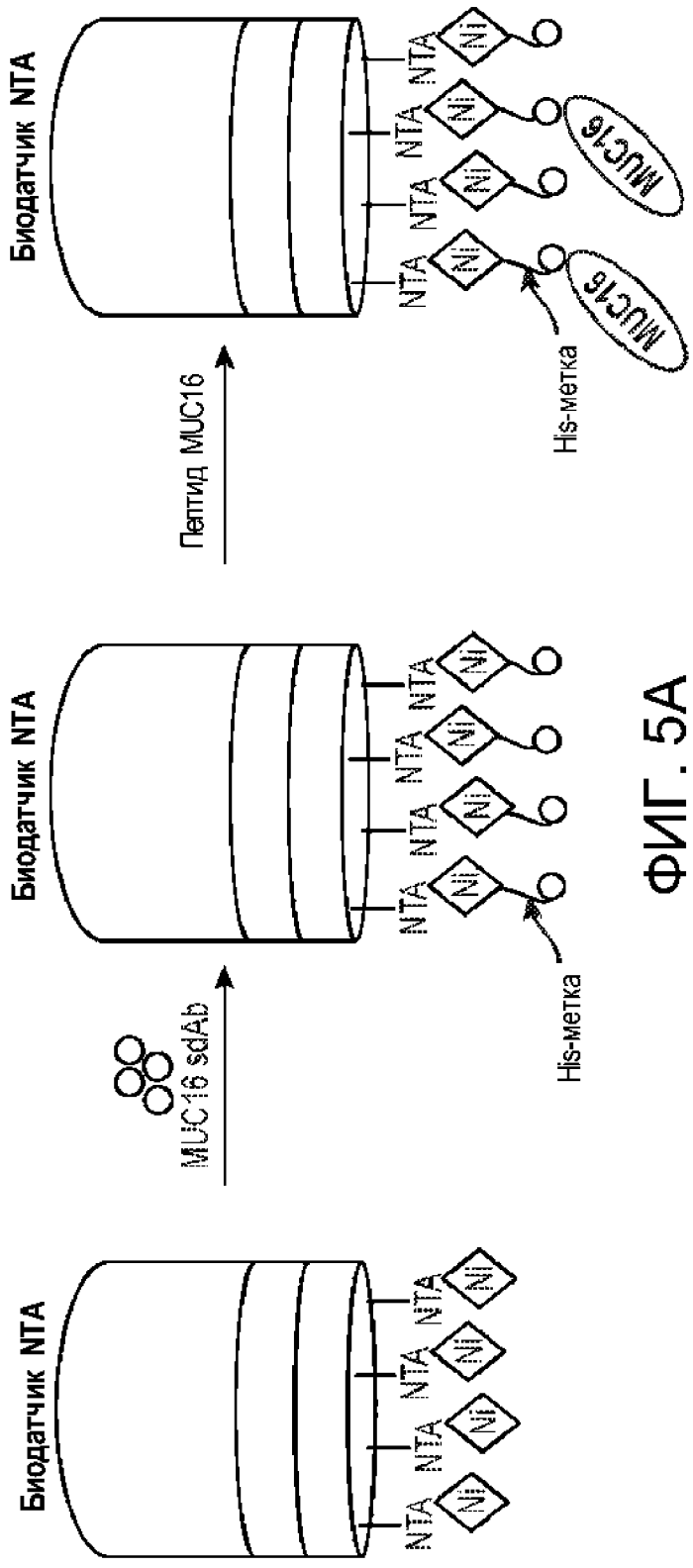
ФИГ. 3E


IFNγ пг/мл
1000
800
600
400
200
0
IL-2 пг/мл
60
40
20
0
(5:1, E:T)
(1:1, E:T)
1-h8
2-h8
1-h10
2-h10
Клон 2
НА

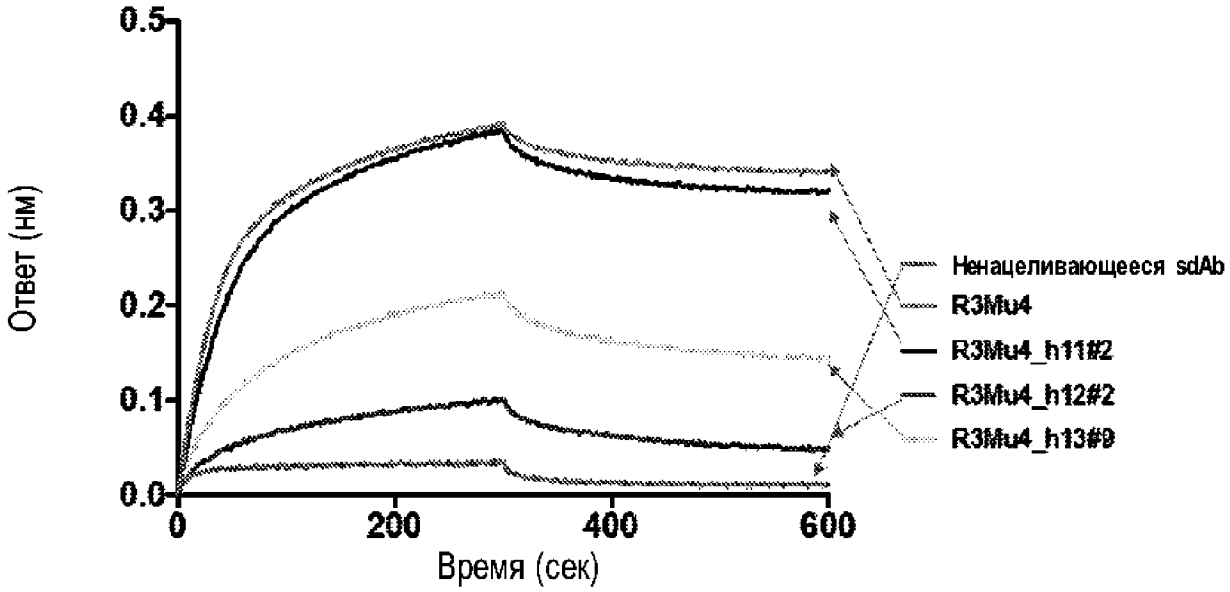
ФИГ. 3F


Объем опухоли (мм3)
3000
2000
1000
0
Носитель
Контроль NTD
IL13Rα2 TFP
-20
-10
0
10
20
30
40
50
Сутки исследования

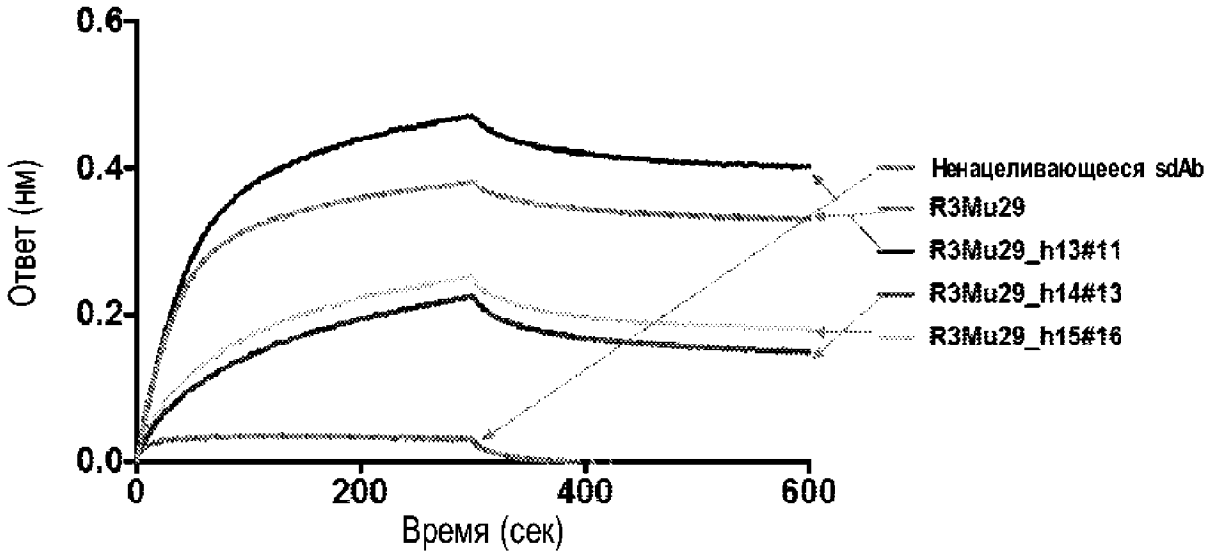
ФИГ. 4


Биодатчик NTA
MUC16 sdAb
Пептид MUC16
His-метка
Ni
NTA
MUC16

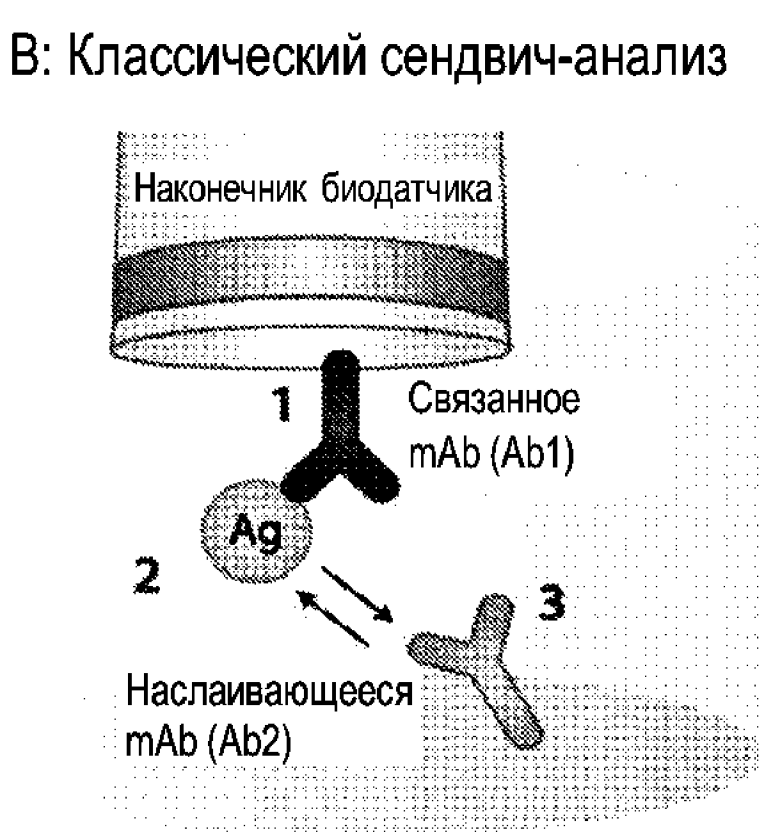
ФИГ. 5А


0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Ответ (нм)
0
200
400
600
Время (сек)
Ненацеливающееся sdAb
R3Mu4
R3Mu4_h11#2
R3Mu4_h12#2
R3Mu4_h13#9

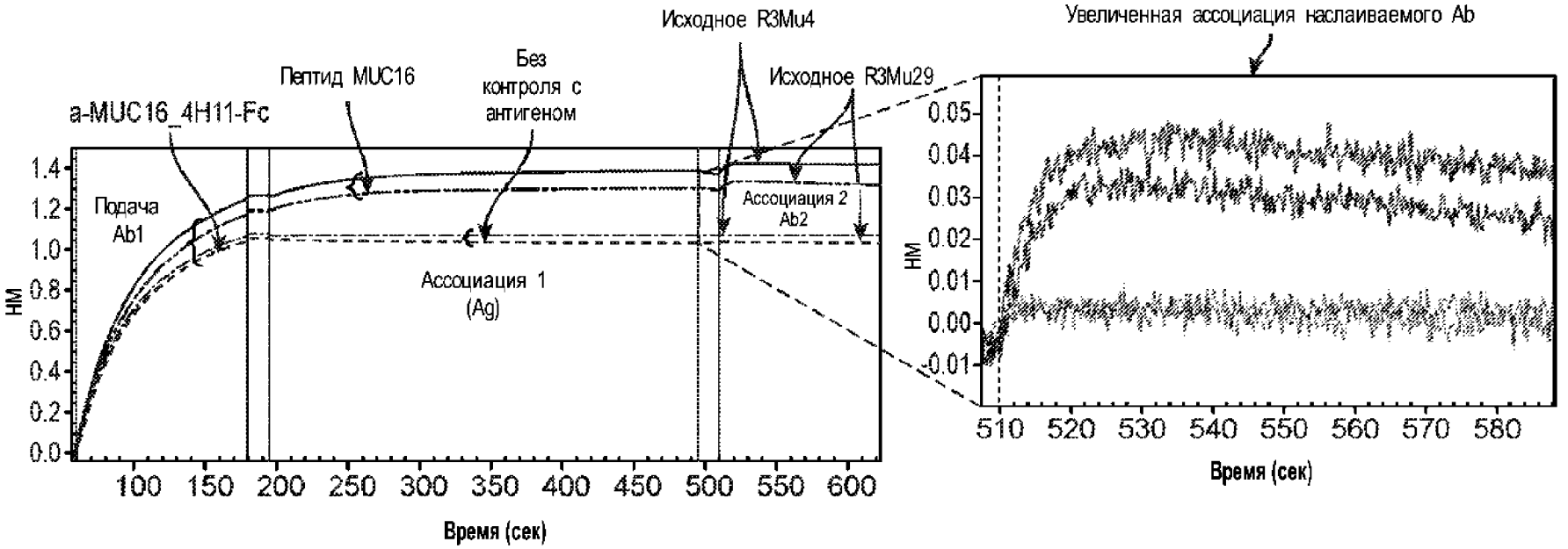
ФИГ. 5B


0.6
0.4
0.2
0.0
Ответ (нм)
0
200
400
600
Время (сек)
Ненацеливающееся sdAb
R3Mu29
R3Mu29_h13#11
R3Mu29_h14#13
R3Mu29_h15#16

ФИГ. 5C


B: Классический сендвич-анализ
Наконечник биодатчика
1
Связанное
mAb (Ab1)
Ag
2
3
Наслаивающееся
mAb (Ab2)

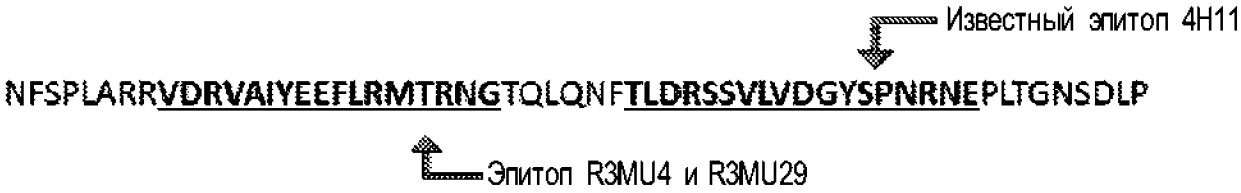
ФИГ. 6A



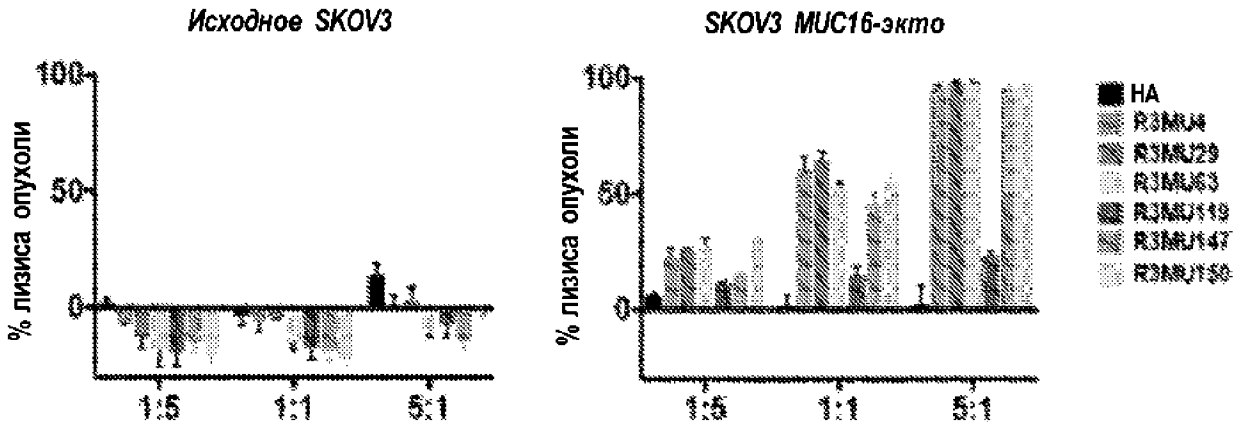
ФИГ. 6B

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

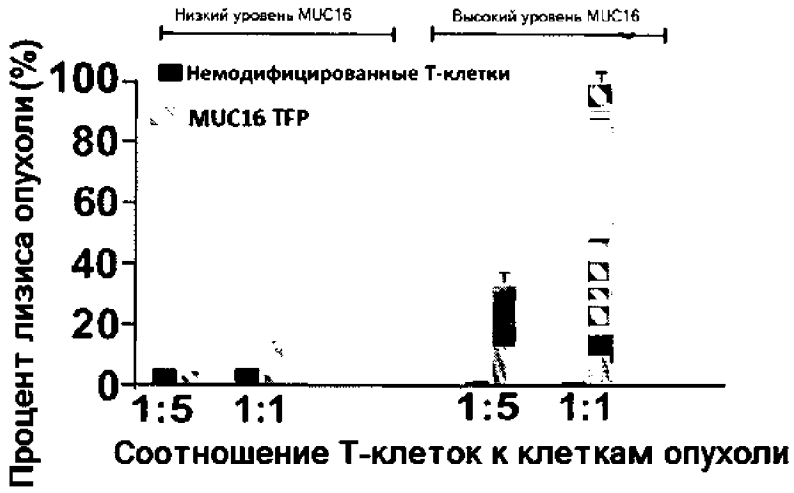
Эктодомен пептида MUC16



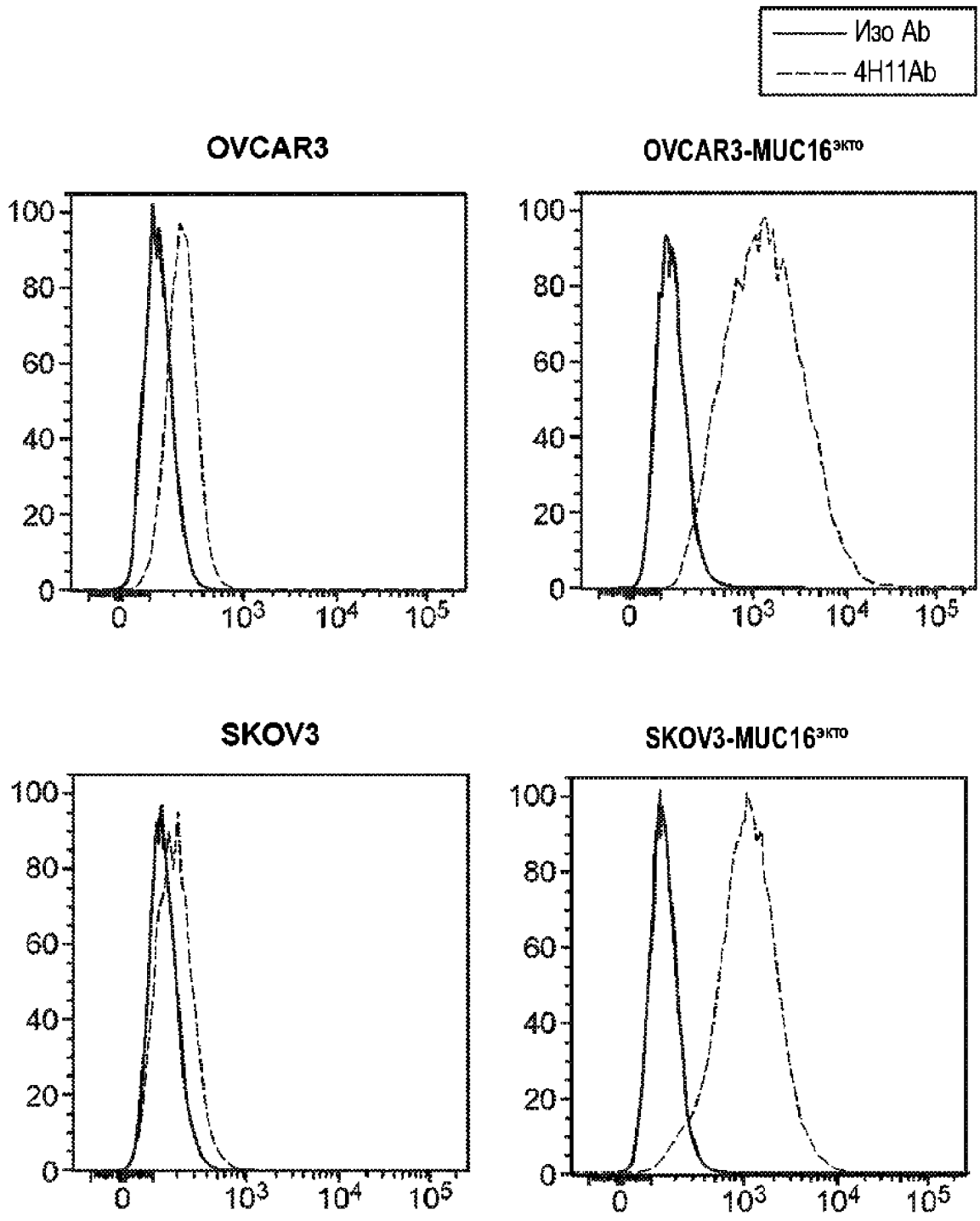
ФИГ. 6C


Исходное SKOV3
SKOV3 MUC16-экто
% лизиса опухоли
100
50
0
1:5
1:1
5:1
HA
R3MU4
R3MU29
R3MU63
R3MU119
R3MU147
R3MU150

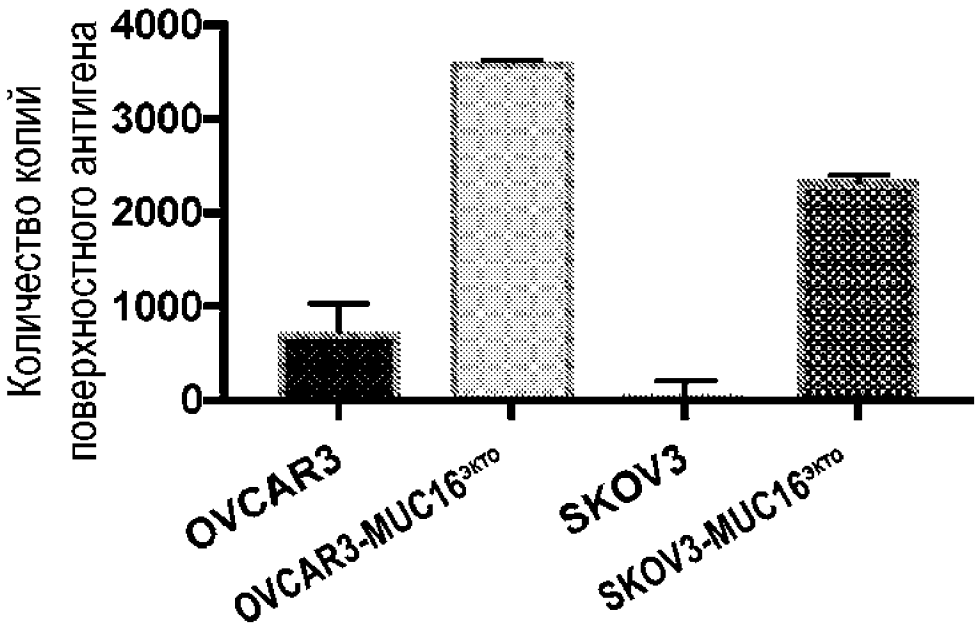
ФИГ. 7


Низкий уровень MUC16
Высокий уровень MUC16
Немодифицированные Т-клетки
MUC16 TFP
Процент лизиса опухоли (%)
100
80
60
40
20
0
1:5
1:1
1:5
1:1
Соотношение Т-клеток к клеткам опухоли

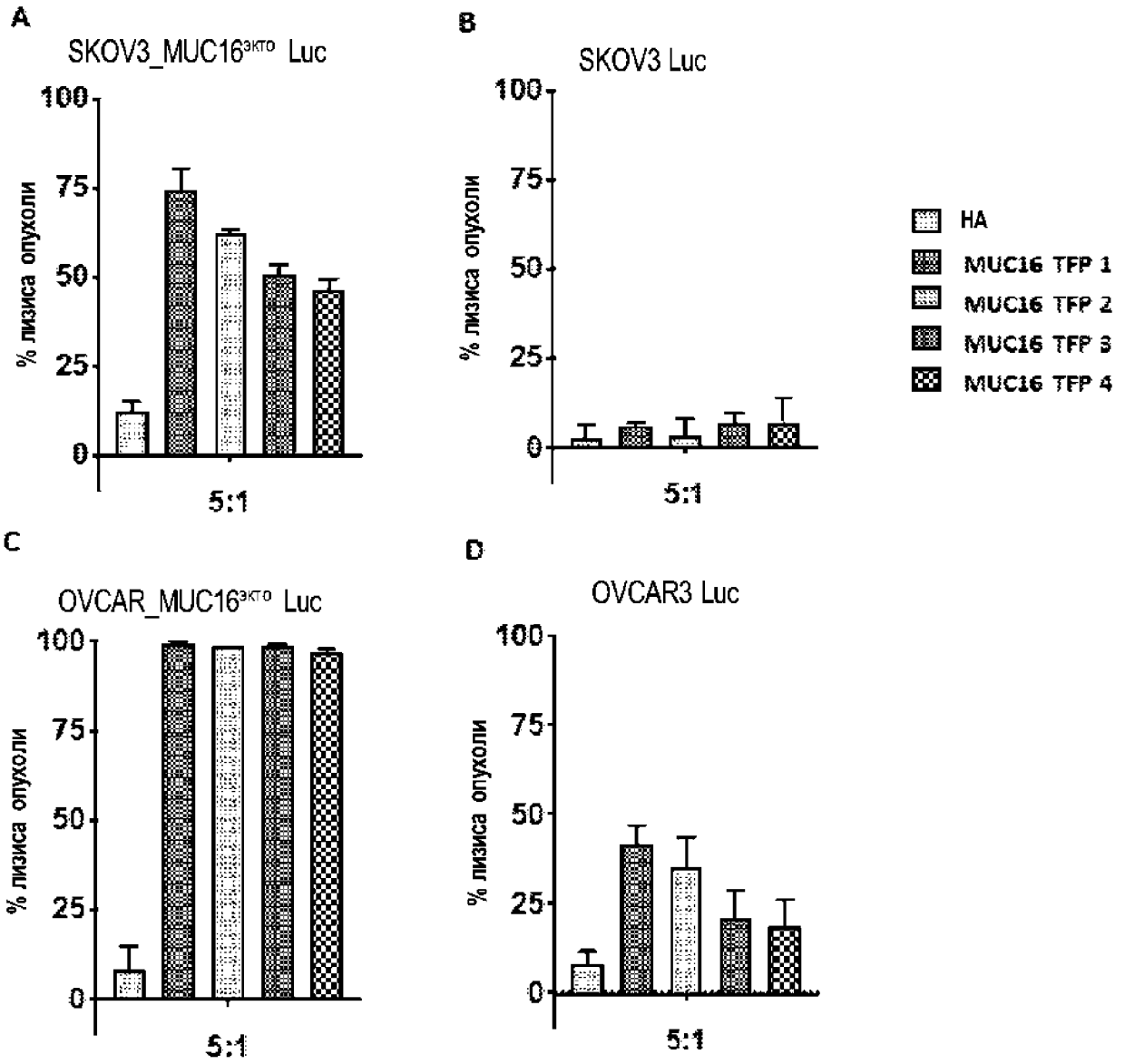
ФИГ. 8


Изо Ab
4H11Ab
OVCAR3
OVCAR3-MUC16ЭКТО
SKOV3
SKOV3-MUC16ЭКТО
100
80
60
40
20
0
0
10^3
10^4
10^5

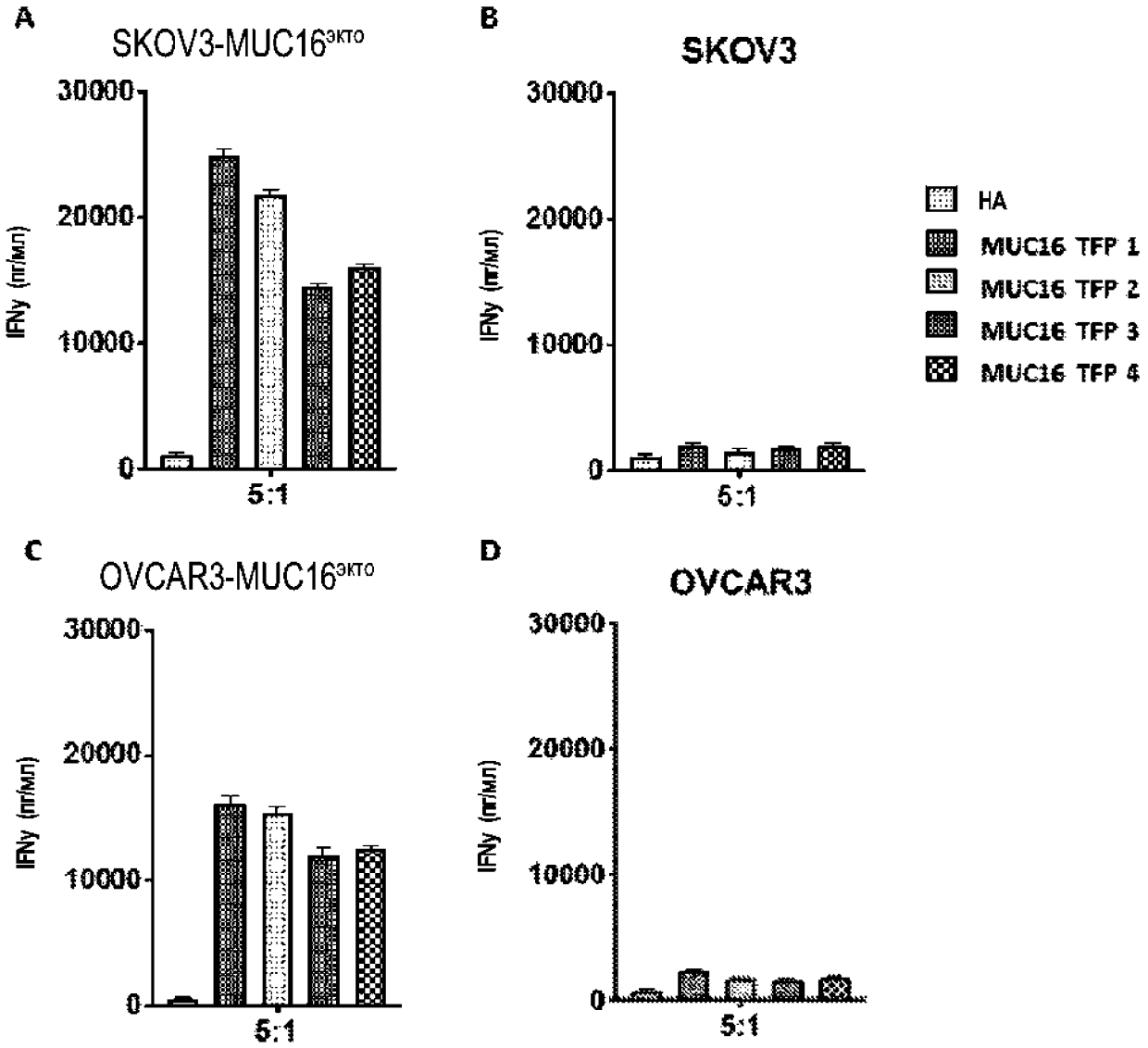
ФИГ. 9А


Количество копий поверхностного антигена
4000
3000
2000
1000
0
OVCAR3
OVCAR3-MUC16Экто
SKOV3
SKOV3-MUC16Экто

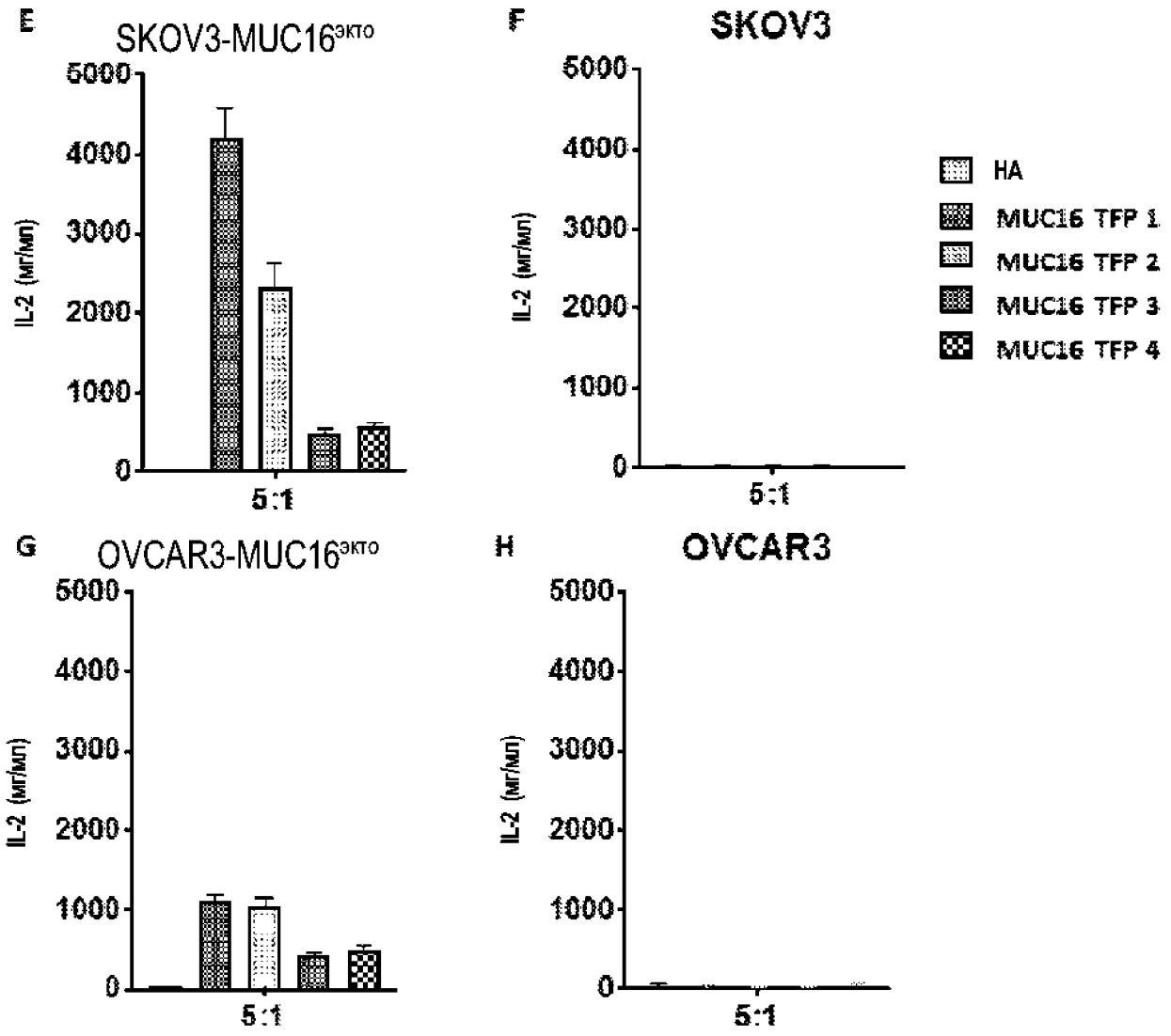
ФИГ. 9В


A
SKOV3_MUC16экто Luc
% лизиса опухоли
100
75
50
25
0
5:1
B
SKOV3 Luc
% лизиса опухоли
100
75
50
25
0
5:1
HA
MUC16 TFP 1
MUC16 TFP 2
MUC16 TFP 3
MUC16 TFP 4
C
OVCAR_MUC16экто Luc
% лизиса опухоли
100
75
50
25
0
5:1
D
OVCAR3 Luc
% лизиса опухоли
100
75
50
25
0
5:1

ФИГ. 10A-D


A
SKOV3-MUC16ЭКТО
IFNγ (пг/мл)
30000
20000
10000
0
5:1
B
SKOV3
IFNγ (пг/мл)
30000
20000
10000
0
5:1
HA
MUC16 TFP 1
MUC16 TFP 2
MUC16 TFP 3
MUC16 TFP 4
C
OVCAR3-MUC16ЭКТО
IFNγ (пг/мл)
30000
20000
10000
0
5:1
D
OVCAR3
IFNγ (пг/мл)
30000
20000
10000
0
5:1

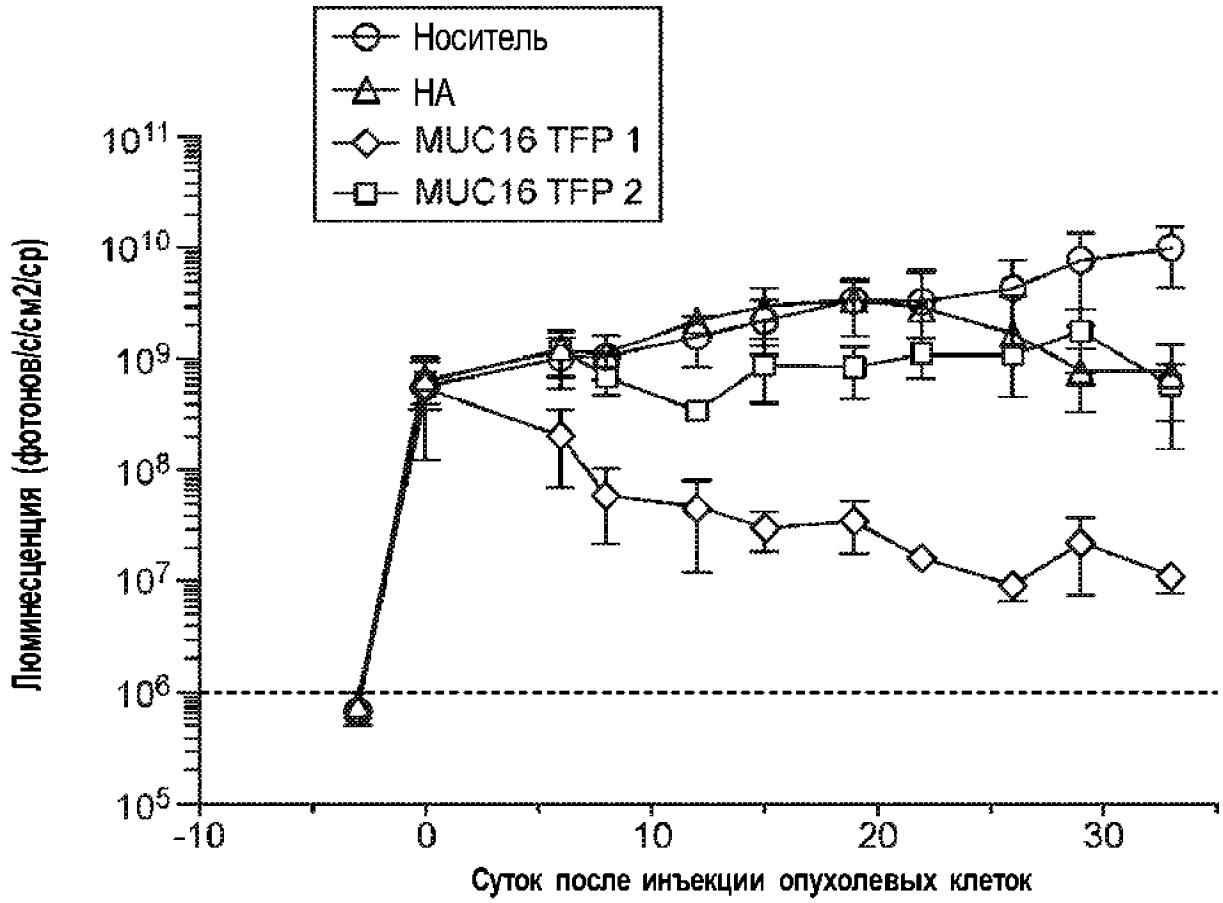
ФИГ. 11A-D


E
SKOV3-MUC16экто
IL-2 (мг/мл)
5000
4000
3000
2000
1000
0
5:1
F
SKOV3
IL-2 (мг/мл)
5000
4000
3000
2000
1000
0
5:1
HA
MUC16 TFP 1
MUC16 TFP 2
MUC16 TFP 3
MUC16 TFP 4
G
OVCAR3-MUC16экто
IL-2 (мг/мл)
5000
4000
3000
2000
1000
0
5:1
H
OVCAR3
IL-2 (мг/мл)
5000
4000
3000
2000
1000
0
5:1

ФИГ. 11E-H

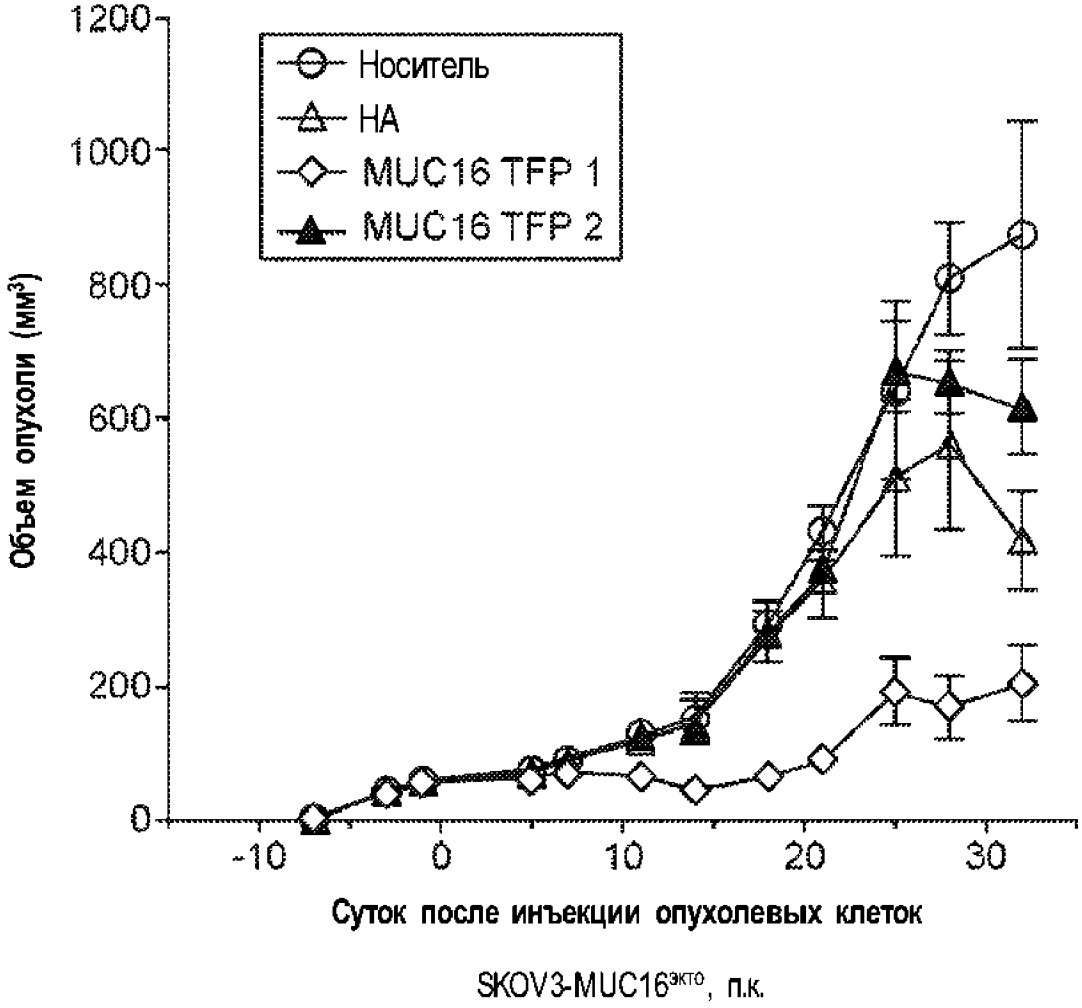
ФИГ. 12

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

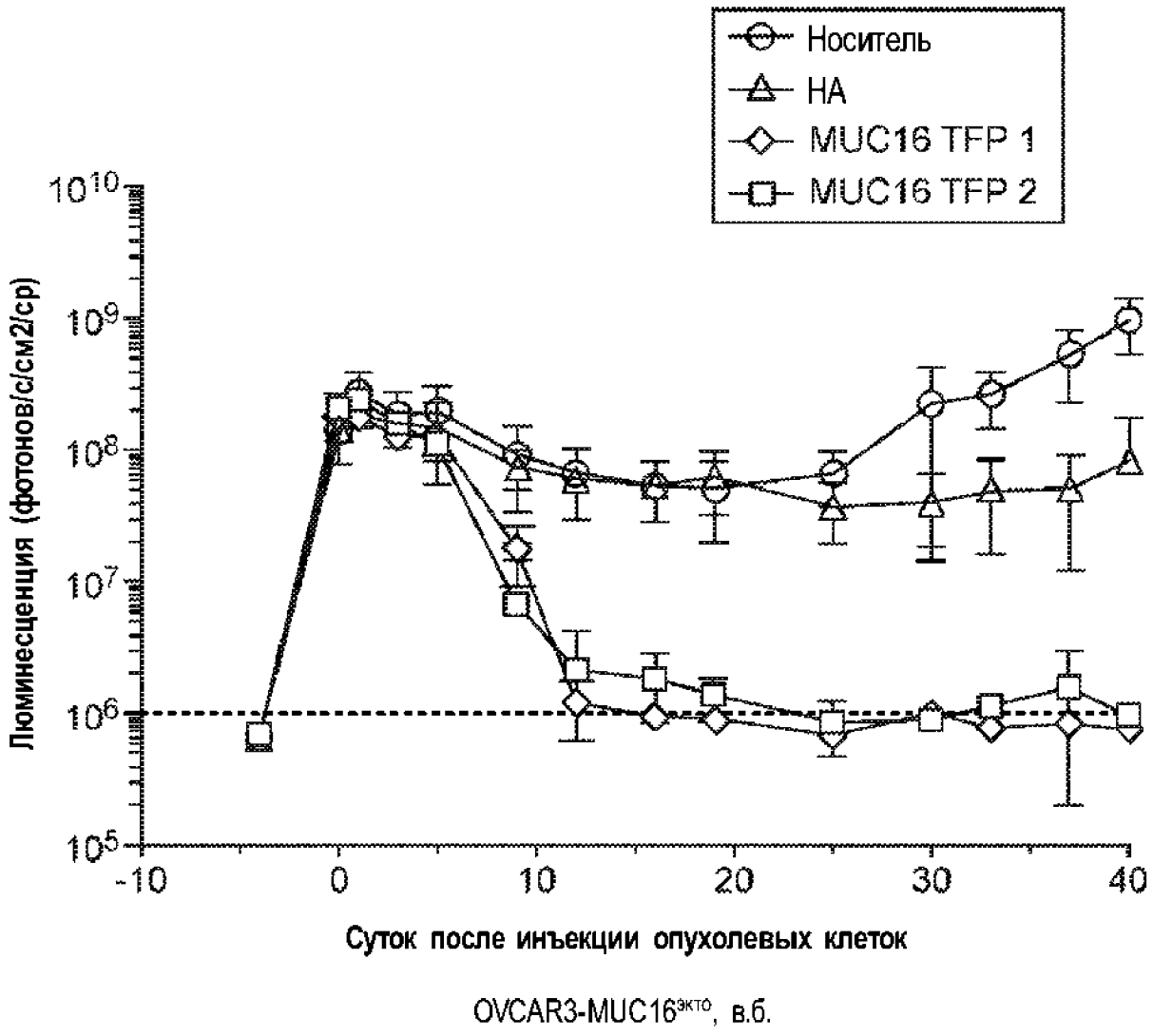


SKOV3-MUC16^{экто}, в.б.

ФИГ. 13А

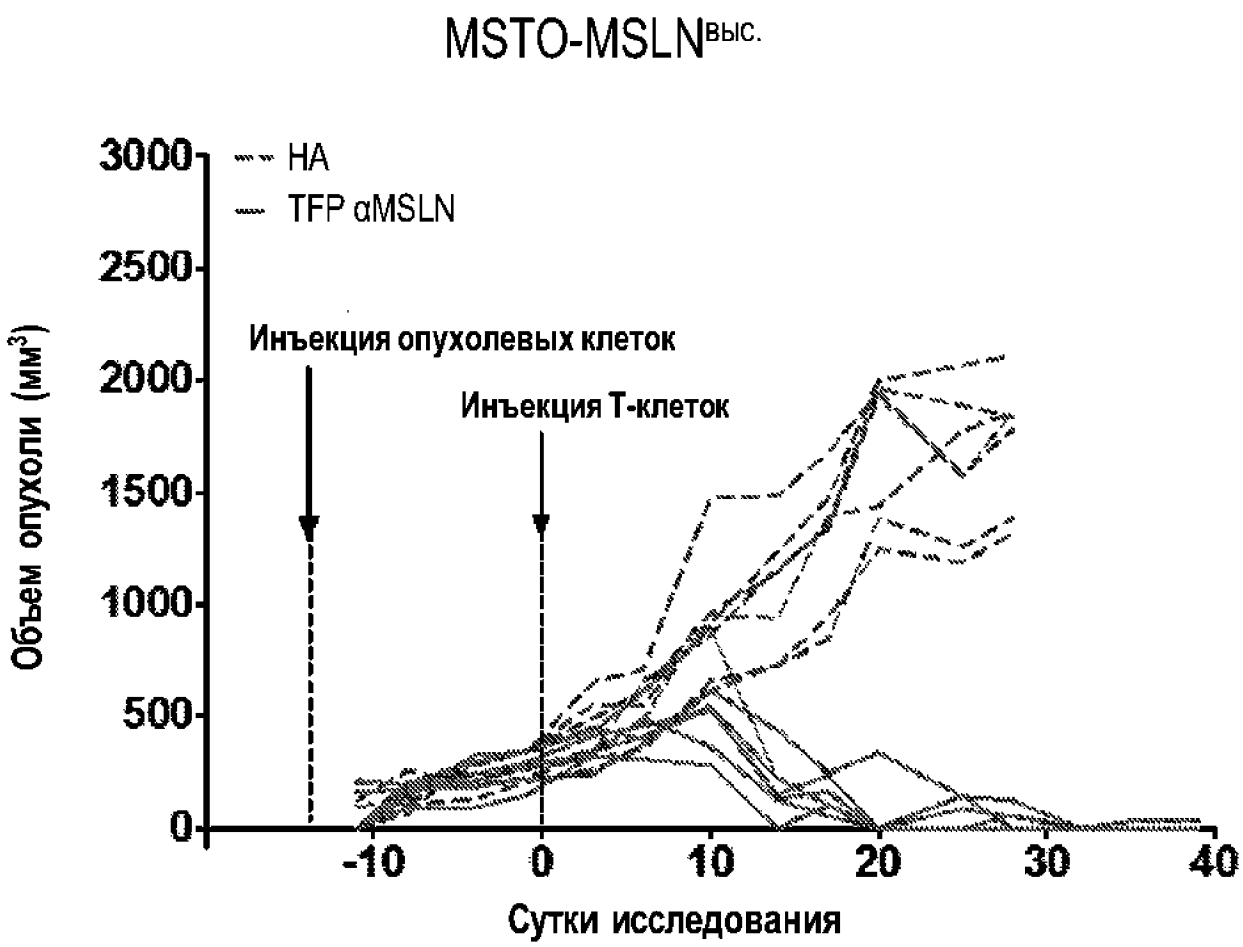

1200
1000
800
600
400
200
0
Объем опухоли (мм³)
Носитель
HA
MUC16 TFP 1
MUC16 TFP 2
-10
0
10
20
30
Суток после инъекции опухолевых клеток
SKOV3-MUC16экто, п.к.

ФИГ. 13B

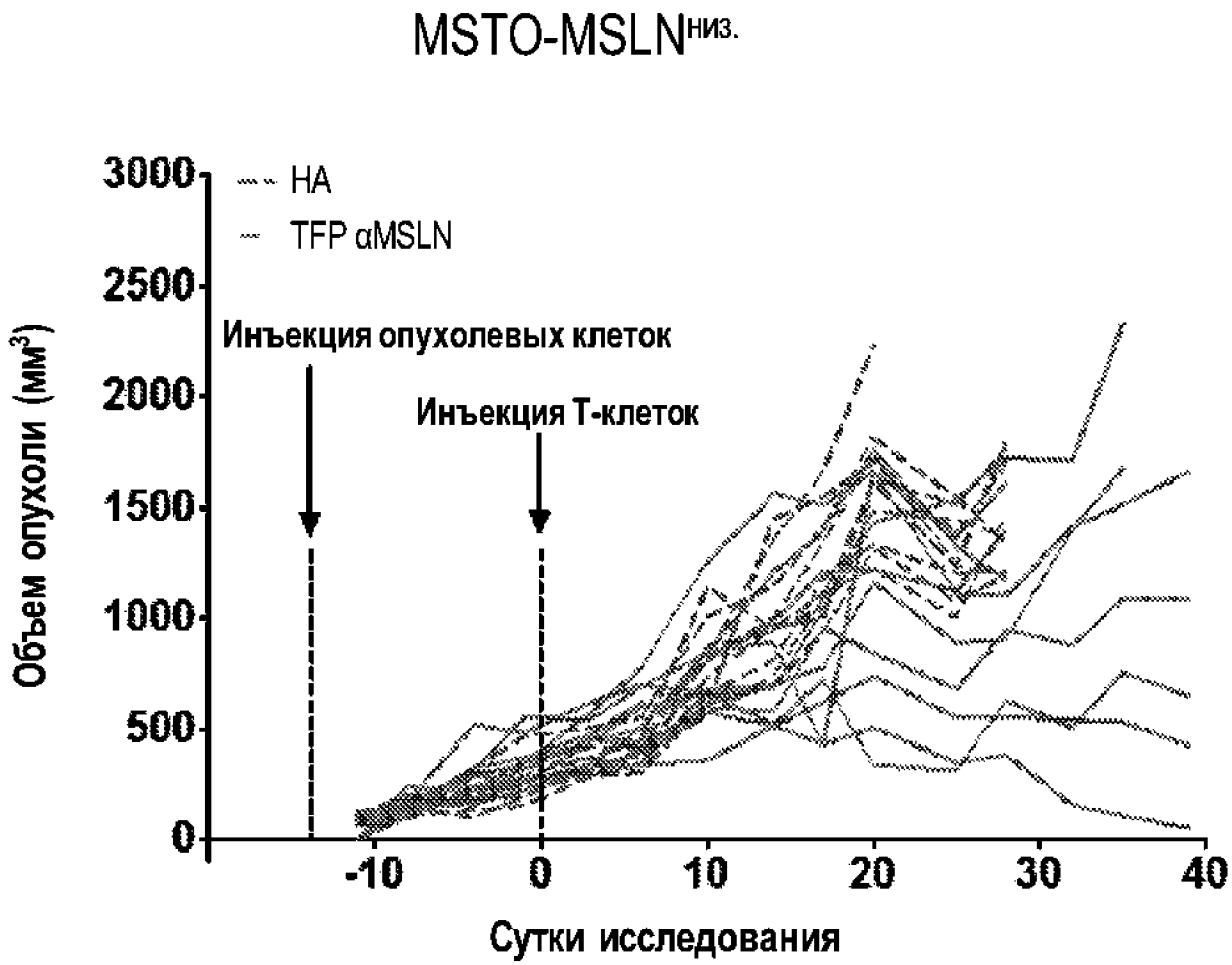


OVCAR3-MUC16$^{\text{экто}}$, в.б.

ФИГ. 13C


MSTO-MSLN выс.
HA
TFP αMSLN
Инъекция опухолевых клеток
Инъекция Т-клеток
Объем опухоли (мм3)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-10
0
10
20
30
40
Сутки исследования

ФИГ. 14А


MSTO-MSLN низ.
HA
TFP αMSLN
Инъекция опухолевых клеток
Инъекция Т-клеток
Объем опухоли (мм3)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-10
0
10
20
30
40
Сутки исследования

ФИГ. 14В