

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202190288 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.04.16

(22) Дата подачи заявки  
2019.07.17

(51) Int. Cl. C07K 14/705 (2006.01)  
C07K 14/725 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)  
C12N 5/0783 (2010.01)  
A61K 35/17 (2014.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(54) СВЯЗЫВАЮЩИЙ Т-КЛЕТКУ С АНТИГЕНОМ АГЕНТ С РАЗЛИЧНОЙ ОПТИМИЗАЦИЕЙ КОНСТРУКЦИЙ

(31) 62/699,173; 62/703,037; 62/773,120;  
62/826,853; 62/828,879; 62/839,235;  
16/442,274; 62/874,426

(32) 2018.07.17; 2018.07.25; 2018.11.29;  
2019.03.29; 2019.04.03; 2019.04.26;  
2019.06.14; 2019.07.15

(33) US

(86) PCT/US2019/042297

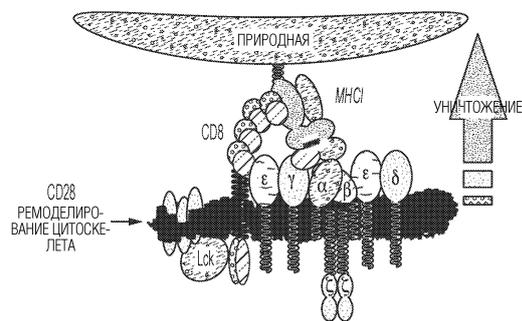
(87) WO 2020/018727 2020.01.23

(71) Заявитель:  
ТРИУМВИРА  
ИММЮНОЛОДЖИКС ЮЭсЭЙ,  
ИНК. (US); МАКМАСТЕРС  
ЮНИВЕРСИТИ (CA)

(72) Изобретатель:  
Брэмсон Джонатан Лорн, Хелсен  
Кристофер В., Хэммилл Джоанн  
Алисия, Мваваси Кеннет Энтони (CA)

(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к трифункциональной молекуле, содержащей (i) специфический для мишени лиганд, (ii) лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, и (iii) полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора. Настоящее изобретение относится к вариантам молекулы, включая варианты, для которых показана оптимизированная поверхностная экспрессия, эффективность трансдукции и эффекторная функциональность. Варианты включают, например, различные лиганды, связывающие CD3-эпсилон (например, ОКТ3, L2K, F6A, UCNT1 и гуманизированный UCNT1), различные передающие сигналы домены и различные линкеры между доменами.



A1

202190288

202190288

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566632EA/032

### СВЯЗЫВАЮЩИЙ Т-КЛЕТКУ С АНТИГЕНОМ АГЕНТ С РАЗЛИЧНОЙ ОПТИМИЗАЦИЕЙ КОНСТРУКЦИЙ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

**[0001]** По настоящей заявке испрашивается приоритет Предварительной заявки США No. 62/699173, поданной 17 июля 2018 г., Предварительной заявки США No. 62/703037, поданной 25 июля 2018 г., Предварительной заявки США No. 62/773120, поданной 29 ноября 2018 г., Предварительной заявки США No. 62/826853, поданной 29 марта 2019 г., Предварительной заявки США No. 62/828879, поданной 03 апреля 2019 г., Предварительной заявки США No. 62/839235, поданной 26 апреля 2019 г., Обычной заявки США No. 16/442274, поданной 14 июня 2019 г., и Предварительной заявки США No. 62/874426, поданной 15 июля 2019 г., полное содержание каждой из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

#### СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

**[0002]** Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был подан в электронной форме в формате ASCII и полное содержание которого, таким образом, приведено в качестве ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 17 июля 2019 г., названа 55247704601\_SL.txt и имеет размер 131072 байт.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0003]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к последовательностям нуклеиновой кислоты, кодирующим CD19-трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (CD19-TAC). В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CD19-трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (CD19-TAC), содержит: (а) первый полинуклеотид, кодирующий лиганд, избирательно связывающий антиген CD19. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CD19-трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (CD19-TAC), содержит: (b) второй полинуклеотид, кодирующий лиганд UCNT1, связывающий CD3. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CD19-трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (CD19-TAC), содержит: (с) третий полинуклеотид, кодирующий полипептид передающего сигналы домена TCR, содержащий цитозольный домен и трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления, компоненты, кодируемые первым, вторым и/или третьим полинуклеотидами, соединены любым подходящим образом, например, в любом подходящем порядке и/или с содержанием любых пригодных линкера(линкеров). В некоторых вариантах осуществления, компоненты, кодируемые (а), компоненты, кодируемые (b), и компоненты, кодируемые (с), слиты непосредственно друг с другом, или соединены посредством по меньшей мере одного линкера. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, избирательно связывающий антиген CD19, представляет собой

одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления, лиганд, избирательно связывающий антиген CD19, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCNT1 представляет собой одноцепочечное антитело. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCNT1 содержит мутацию Y182T (SEQ ID NO: 72). В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCNT1 представляет собой гуманизированный вариант лиганда UCNT1 (huUCNT1) (SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCNT1 представляет собой гуманизированный вариант UCNT1, содержащий мутацию Y177T (huUCNT1 (Y177T)) (SEQ ID NO: 46). В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCNT1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления, цитозольный домен представляет собой цитозольный домен CD4, и трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD4. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, компонент, кодируемый посредством (а), и компонент, кодируемый посредством (с), слиты с компонентом, кодируемым посредством (b). В некоторых вариантах осуществления, компонент, кодируемый посредством (b), и компонент, кодируемый посредством (с), слиты с компонентом, кодируемым посредством (а). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один линкер соединяет компонент, кодируемый посредством (а), с компонентом, кодируемым посредством (b). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один линкер представляет собой гибкий линкер G<sub>4</sub>S (SEQ ID NO: 73), большой домен белка, структуру длинной спирали или структуру короткой спирали. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один линкер содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12 (гибкий линкер G<sub>4</sub>S («G<sub>4</sub>S», описанный как SEQ ID NO: 73)), SEQ ID NO: 32 (большой домен белка), SEQ ID NO: 30 (структура длинной спирали) или SEQ ID NO: 28 (структура короткой спирали). В некоторых вариантах осуществления, CD3 происходит из комплекса TCR на клетке, экспрессирующей второй полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления,

связывание CD3 индуцирует активацию клетки, экспрессирующей второй полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует активирующий домен.

**[0004]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к векторным конструкциям, содержащим: (a) последовательность нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем описании (например, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CD19-TAC); и (b) промотор, функциональный в клетке млекопитающего.

**[0005]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к Т-клеткам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем описании (например, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CD19-TAC).

**[0006]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим Т-клетку, описанную в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

**[0007]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли, экспрессирующей CD19, у нуждающегося в этом индивидуума, включающим введение индивидууму фармацевтической композиции, описанной в настоящем описании. (например, фармацевтической композиции, содержащей Т-клетку, содержащую любую последовательность нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем описании, такую как любые последовательность или последовательности нуклеиновой кислоты, описанные в настоящем описании как кодирующие CD19-трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (CD19-TAC)). В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой В-клеточную лимфому, острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) или неходжкинскую лимфому. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическую композицию вводят трансартериально, подкожно, внутрикожно, внутрь опухоли, внутрь узлов, интрамедуллярно, внутримышечно, внутривенно или внутрибрюшинно.

**[0008]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится

к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (три-ТАС), содержащей: (а) первый полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд; (b) второй полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR; и (с) третий полинуклеотид, кодирующий полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора; где лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, выбран из ОКТЗ, F6A или L2K. В некоторых вариантах осуществления, компонент, кодируемый посредством (а), компонент, кодируемый посредством (b), и компонент, кодируемый посредством (с), слиты непосредственно друг с другом или соединены посредством по меньшей мере одного линкера. В некоторых вариантах осуществления, компонент, кодируемый посредством (а), и компонент, кодируемый посредством (b), непосредственно связаны и соединены с компонентом, кодируемым посредством (с), посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления, компонент, кодируемый посредством (b), и компонент, кодируемый посредством (с), непосредственно связаны и соединены с компонентом, кодируемым посредством (а), посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один линкер представляет собой гибкий линкер G<sub>4</sub>S (SEQ ID NO: 73), большой домен белка, структуру длинной спирали или структуру короткой спирали. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один линкер имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12 (гибкий линкер G<sub>4</sub>S («G<sub>4</sub>S», описанный как SEQ ID NO: 73)), SEQ ID NO: 32 (большой домен белка), SEQ ID NO: 30 (структура длинной спирали) или SEQ ID NO: 28 (структура короткой спирали). В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой ОКТЗ. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой F6A. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой L2K. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий

белок, ассоциированный с комплексом TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой CD3. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд избирательно связывает антиген опухоли. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой сконструированный полипептид с анкириновым повтором (DARPin) или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд избирательно связывает антиген CD19, антиген HER2 или антиген BCMA. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд, избирательно связывающий антиген HER-2, содержит антигенсвязывающий домен антитела, выбранного из трастузумаба, пертузумаба, лапатиниба, нератиниба, адо-трастузумаба эмтанзина, ганкотамаба, маргетуксимаба, тимигутузумаба и эртумаксомаба. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд, избирательно связывающий антиген BCMA, содержит антигенсвязывающий домен антитела, выбранного из белантамаба мафодотина и GSK2857916. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена T-клеточного рецептора содержит цитозольный домен и трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления, цитозольный домен представляет собой цитозольный домен CD4, и трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD4, или при этом цитозольный домен представляет собой цитозольный домен CD8, и трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD8. В некоторых вариантах осуществления, последовательности нуклеиновой кислоты дополнительно содержат лидерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления, CD3 происходит из комплекса TCR на клетке, экспрессирующей второй полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, связывание CD3 индуцирует активацию клетки, экспрессирующей второй полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, три-TAC содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по

меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60 или SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует активирующий домен.

**[0009]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (три-ТАС), содержащий: (а) первый полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд; (b) второй полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR; и (с) третий полинуклеотид, кодирующий полипептид передающего сигнала домена Т-клеточного рецептора; где последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит лидерную последовательность, и где компонент, кодируемый посредством (а), компонент, кодируемый посредством (b), и компонент, кодируемый посредством (с), слиты непосредственно друг с другом или соединены посредством по меньшей мере одного линкера. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд избирательно связывает антиген опухоли. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой сконструированный полипептид с анкириновым повтором (DARPin) или одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд избирательно связывает антиген CD19, антиген HER2 или антиген ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд, избирательно связывающий антиген HER-2, содержит антигенсвязывающий домен антитела, выбранного из трастузумаба, пертузумаба, лапатиниба, нератиниба, адо-трастузумаба эмтанзина, ганкотамаба, маргетуксимаба, тимигутузумаба и эртумаксомаба. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд, избирательно связывающий антиген ВСМА, содержит антигенсвязывающий домен антитела, выбранного из белантамаба мафодотина и GSK2857916. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 54. В

некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, выбран из UCNT1, UCNT1 (Y182T), huUCNT1, huUCNT1 (Y177T), OKT3, F6A или L2K. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой CD3. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигнала домена Т-клеточного рецептора содержит цитозольный домен и трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления, цитозольный домен представляет собой цитозольный домен CD4, и трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD4, или при этом цитозольный домен представляет собой цитозольный домен CD8, и трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD8. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления, компонент, кодируемый посредством (а), и компонент, кодируемый посредством (b), непосредственно связаны и соединены с компонентом, кодируемым посредством (с), посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления, компонент, кодируемый посредством (b), и компонент, кодируемый посредством (с), непосредственно связаны и соединены с компонентом, кодируемым посредством (а), посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один линкер представляет собой гибкий линкер G<sub>4</sub>S (SEQ ID NO: 73), большой домен белка, структуру длинной спирали или структуру короткой спирали. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один линкер имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12 (гибкий линкер G<sub>4</sub>S («G<sub>4</sub>S», описанный как SEQ ID NO: 73)), SEQ ID NO: 32 (большой домен белка), SEQ ID NO: 30 (структура длинной спирали) или SEQ ID NO: 28 (структура короткой спирали). В некоторых вариантах осуществления, CD3 происходит из комплекса TCR на клетке, экспрессирующей второй полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, связывание CD3 индуцирует активацию клетки, экспрессирующей второй полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере

95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60 или SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует активирующий домен.

**[0010]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к полипептидам, кодируемым посредством последовательности нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем описании.

**[0011]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к векторным конструкциям, содержащим: (а) последовательность нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем описании; и (б) промотор, функциональный в клетке млекопитающего.

**[0012]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к Т-клеткам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем описании.

**[0013]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим Т-клетку, описанную в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

**[0014]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом индивидуума, включающим введение индивидууму фармацевтической композиции, описанной в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой солидную злокачественную опухоль или жидкую злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак легкого, рак молочной железы, множественную миелому, глиобластому, рак желудка, рак яичника, рак желудка, колоректальный рак, рак уротелия, рак эндометрия, или рак ободочной кишки. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль содержит экспрессирующую CD19 клетку злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой В-клеточную лимфому, острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) или

неходжкинскую лимфому. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль содержит экспрессирующую HER-2 клетку злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак яичника или рак желудка. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль содержит экспрессирующую ВСМА клетку злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой лейкоз, лимфому или множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическую композицию вводят индивидууму трансартериально, подкожно, внутрикожно, внутрь опухоли, внутрь узлов, интрамедуллярно, внутримышечно, внутривенно или внутрибрюшинно. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция находится в форме единичной дозы. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция содержит приблизительно  $0,5-2 \times 10^9$  Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическую композицию вводят ежесуточно, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, раз в два месяца или ежегодно.

**[0015]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей CD19-трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (CD19-TAC), содержащий: (a) первый полинуклеотид, кодирующий лиганд, избирательно связывающий антиген CD19; (b) второй полинуклеотид, кодирующий гуманизированный вариант лиганда UCNT1 (huUCNT1), содержащий мутацию Y177T (huUCNT1 (Y177T)), связывающий CD3; и (c) третий полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий цитозольный домен CD4 и трансмембранный домен CD4; где лиганд, кодируемый посредством (a), лиганд, кодируемый посредством (b), и полипептид, кодируемый посредством (c), слиты непосредственно друг с другом, или соединены посредством по меньшей мере одного линкера. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует костимулирующий домен, активирующий домен или как костимулирующий домен, так и активирующий домен. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, избирательно связывающий антиген CD19, представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления, лиганд, избирательно связывающий антиген CD19, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, избирательно связывающий антиген CD19, содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCNT1 (Y177T) представляет собой одноцепочечное антитело. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCNT1 (Y177T) содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCNT1 (Y177T) содержит

аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один линкер представляет собой гибкий линкер G<sub>4</sub>S, большой домен белка, структуру длинной спирали или структуру короткой спирали. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один линкер содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один линкер содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления, CD3 экспрессирован на клетке, экспрессирующей второй полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит последовательность из SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 64. В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к векторным конструкциям, содержащим: (а) последовательность нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем описании; и (b) промотор, функциональный в клетке млекопитающего. В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим вектор, описанный в настоящем описании, и наполнитель. В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к полипептидам, кодируемым посредством последовательности нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем описании.

**[0016]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к последовательностям нуклеиновой кислоты, кодирующим HER2-трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (HER2-TAC), содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере

99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68 или SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует активирующий домен.

**[0017]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к последовательностям нуклеиновой кислоты, кодирующим ВСМА-трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (ВСМА-ТАС), содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления, ВСМА-ТАС содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, или SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует активирующий домен.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

**[0018]** Новые признаки изобретения конкретно указаны в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения можно получить со ссылкой на следующее подробное описание, в котором указаны иллюстративные варианты осуществления, в которых использованы принципы изобретения, и на сопутствующие чертежи, в которых:

**[0019]** Фиг. 1А представляет собой схему природной активации Т-клетки.

**[0020]** Фиг. 1В представляет собой схему основанной на САР активации Т-клетки.

**[0021]** Фиг. 1С представляет собой схему основанной на трифункциональном связывающем Т-клетку с антигеном агенте (три-ТАС) активации Т-клетки.

**[0022]** Фиг. 1D представляет собой схему природной активации Т-клетки.

**[0023]** Фиг. 1Е представляет собой схему основанной на САР активации Т-клетки.

**[0024]** фиг. 1F представляет собой схему основанной на три-ТАС активации Т-клетки.

**[0025]** Фиг. 2А представляет собой схему конфигурации три-ТАС с доменом УСНТ1 в центре между трансмембранным доменом (ТМ) и антигенсвязывающим доменом.

**[0026]** фиг. 2В представляет собой схему конфигурации три-ТАС, в которой домен УСНТ1 находится на N-конце, за ним следуют антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен.

**[0027]** фиг. 2С представляет собой схему молекулы три-ТАС с типичным

антигенсвязывающим доменом и доменом UCNT1.

[0028] **фиг. 3А** представляет собой схему молекулы три-ТАС с типичным антигенсвязывающим доменом.

[0029] **фиг. 3В** представляет собой схему три-ТАС с антигенсвязывающим доменом DARPIn против HER-2.

[0030] **Фиг. 3С** представляет собой схему три-ТАС с антигенсвязывающим доменом scFv против CD19.

[0031] **Фиг. 3D** представляет собой схему три-ТАС с антигенсвязывающим доменом scFv против ВСМА.

[0032] **Фиг. 3Е** представляет собой схему молекулы три-ТАС с антигенсвязывающим доменом DARPIn против HER-2.

[0033] **Фиг. 3F** представляет собой схему молекулы три-ТАС с антигенсвязывающим доменом scFv против ВСМА.

[0034] **Фиг. 4А-фиг. 4D** иллюстрируют Т-клетки, модифицированные с использованием три-ТАС или CAR на основе CD28, нацеленных против HER-2 с использованием DARPIn. **Фиг. 4А** иллюстрирует поверхностную экспрессию три-ТАС и CAR, по сравнению с Т-клетками, не экспрессирующими химерного рецептора. **Фиг. 4В** иллюстрирует рост трех популяций клеток. **Фиг. 4С - фиг. 4D** иллюстрируют процент модифицированных клеток, положительных по различным маркерам активации Т-клетки, после стимуляции антигеном.

[0035] **Фиг. 5** иллюстрирует модель структуры белка CD19-ТАС.

[0036] **Фиг. 6А - фиг. 6J** иллюстрируют поверхностную экспрессию рецептора и активацию различных контрольных DARPIn против HER-2-три-ТАС. Т-клетки были модифицированы с использованием варианта три-ТАС, лишённого нацеливающего элемента (-DARPIn), варианта три-ТАС, лишённого UCNT1 (-UCNT1), или полноразмерного три-ТАС. **Фиг. 6А, фиг. 6D, фиг. 6G** иллюстрируют трансдукцию Т-клетки и способность связывания Her2 (слева); **фиг. 6В, фиг. 6Е, фиг. 6H** - дегрануляцию (в середине), и **фиг. 6С, фиг. 6F, фиг. 6I** - продукцию цитокинов (справа). **Фиг. 6J** иллюстрирует, что только полноразмерный DARPIn против HER-2-три-ТАС является способным вызывать цитотоксический ответ.

[0037] **Фиг. 7А - фиг. 7С** иллюстрируют противоопухолевую активность, токсичность и продукцию цитокинов для Т-клеток, модифицированных с использованием либо DARPIn против HER-2-три-ТАС, либо DARPIn против HER-2-CAR на основе CD28. Мышей, несущих развившиеся опухоли OVCAR-3, подвергали лечению с использованием Т-клеток, модифицированных с использованием DARPIn против HER-2-три-ТАС или DARPIn против HER-2-CAR. **Фиг. 7А** иллюстрирует изменение роста опухоли, относительно суток инфузии Т-клеток (сутки 35). **Фиг. 7В** иллюстрирует изменение массы, показатель токсичности, у тех же самых мышей. **Фиг. 7С** иллюстрирует концентрации цитокинов в сыворотке мышей на сутки 7 после инфузии Т-клеток.

[0038] **Фиг. 8А - фиг. 8H** иллюстрируют три-ТАС, сконструированные с

различными альтернативами домену привлечения UCNT1 scFv-CD3. **Фиг. 8А** обеспечивает схематическое представление конструкций рецептора ТАС с использованием DARPIn против HER-2, в паре либо с UCNT1, либо с ОКТ3 scFv против CD3. **фиг. 8В** иллюстрирует поверхностную экспрессию HER-2-ТАС для CD8+ NGFR+ (слева) или CD4+ NGFR+ Т-клеток (справа). **Фиг. 8С, фиг. 8С1** иллюстрируют продукцию цитокинов специфическими для HER-2 ТАС-Т-клетками, стимулированными положительными по антигену клетками опухоли SK-OV-3. **Фиг. 8D** иллюстрирует уничтожение клеток опухоли SK-OV-3 посредством Т-клеток с HER-2-ТАС и контрольным вектором (вектором, несущим только tNGFR). Т-клетки с контрольным вектором (круги) сравнивают со специфическими для HER-2 ТАС-Т-клетками, несущими UCNT1 (квадраты) или ОКТ3 (треугольники). **Фиг. 8Е** обеспечивает схематическое представление конструкций рецептора ТАС с использованием scFv против CD19, в паре с huUCNT1, F6A, или L2K scFv против CD3. **Фиг. 8F** иллюстрирует поверхностную экспрессию CD19-ТАС для CD8+ NGFR+ (слева) или CD4+ NGFR+ Т-клеток (справа). **Фиг. 8G, фиг. 8G1** иллюстрируют продукцию цитокинов специфическими для CD19 ТАС-Т-клетками, стимулированными положительными по антигену клетками опухоли Raji. Продуцирующие цитокины клетки сравнивают из числа ТАС-Т-клеток, несущих huUCNT1 (квадраты), F6A (треугольники), или L2K (ромбы). **Фиг. 8H** иллюстрирует уничтожение клеток опухоли NALM-6 посредством Т-клеток с CD19-ТАС и контрольным вектором (вектором, несущим только tNGFR). Т-клетки с контрольным вектором (круги) сравнивают со специфическими для CD19 ТАС-Т-клетками, несущими huUCNT1 (квадраты), F6A (треугольники) или L2K (ромбы).

**[0039] Фиг. 9А - фиг. 9H** иллюстрирует эффект различных scFv против CD3 на поверхностную экспрессию TCR. **Фиг. 9А, фиг. 9Е** иллюстрируют поверхностную экспрессию TCR для Т-клеток, модифицированных с использованием контрольного вектора (tNGFR), UCNT1 или вариантов ОКТ3 ТАС. **Фиг. 9В, фиг. 9F** показывают, что Т-клетки, модифицированные с использованием ОКТ3-ТАС, имеют значимо уменьшенную поверхностную экспрессию TCR, по сравнению с UCNT1-ТАС. **Фиг. 9С, фиг. 9G** иллюстрируют поверхностную экспрессию TCR для Т-клеток, модифицированных с использованием контрольного вектора (tNGFR), вариантов ТАС huUCNT1, F6A или L2K. **Фиг. 9D, фиг. 9H** показывает, что Т-клетки, модифицированные с использованием L2K ТАС, имеют значимо уменьшенную поверхностную экспрессию TCR, по сравнению с huUCNT1-ТАС.

**[0040] Фиг. 10А - фиг. 10В** иллюстрируют варианты домена соединителя. Домен, соединяющий антигенсвязывающий домен с доменом привлечения TCR, называют доменом соединителя. На **фиг. 10А** представлена схема вариантов ТАС с различными доменами соединителя: (i) гибкий соединитель, (ii) соединитель с большим доменом (сконструированный из доменов 3 и 4, происходящих из внеклеточного домена CD4), (iii) соединитель с длинной спиралью и (iv) соединитель с короткой спиралью. На **фиг. 10В** представлена иллюстративная аминокислотная последовательность доменов,

представленных на **фиг. 10А**. (SEQ ID NO 69, 28, 30 и 32, соответственно, в порядке упоминания)

**[0041] Фиг. 11А - фиг. 11Е** иллюстрируют иллюстративные параметры *in vitro* CD19-ТАС, сконструированного с различными вариантами соединителя. **Фиг. 11А** иллюстрирует поверхностную экспрессию варианта ТАС в CD4 и CD8 клетках. **Фиг. 11В** иллюстрирует поверхностную экспрессию ТАС, содержащего гибкие соединители, по сравнению с ТАС, содержащим соединители со спиралью или с большим доменом. **Фиг. 11С** иллюстрирует общую трансдукцию ТАС, содержащего альтернативные соединители, по сравнению с гибким соединителем. **Фиг. 11D, фиг. 11Е** иллюстрируют относительную реакционную способность клеток по отношению к положительным по антигену клеткам Raji.

**[0042] Фиг. 12А** иллюстрирует цитотоксичность *in vitro* вариантов ВСМА три-ТАС, сконструированных с использованием различных соединителей. **Фиг. 12В** иллюстрирует контроль опухоли *in vivo* для вариантов ВСМА-три-ТАС, сконструированных с использованием гибкого соединителя, по сравнению с соединителем с короткой спиралью.

**[0043] Фиг. 13А - фиг. 13С** иллюстрируют свойства CD8 $\alpha$ -три-ТАС-scFv против HER-2 и CD8 $\alpha$ -три-ТАС-DARPin против HER-2. **Фиг. 13А, фиг. 13С** иллюстрируют поверхностную экспрессию. **Фиг. 13В** иллюстрирует продукцию цитокинов.

**[0044] На фиг. 14А - фиг. 14D** представлены схемы вариантов CD8-три-ТАС. DARPin против HER-2 используют в качестве иллюстративного антигенсвязывающего домена, и домен привлечения UCHL1 CD3 используют в качестве иллюстративного домена привлечения. **Фиг. 14А** иллюстрирует три-ТАС, содержащий трансмембранный и цитозольный домен CD4 (слева), и сравнимые области гетеродимера CD8 $\alpha$ /CD8 $\beta$  (справа). Ключевые области для функциональности корцептора (богатый аргинином домен и мотив СХСР) выделены. **Фиг. 14В** представляет собой схему CD8 $\alpha$ -три-ТАС, содержащего мутацию цистеина до серина, для обеспечения распространения мономерного рецептора, и цитозольный домен CD8 $\alpha$ . **Фиг. 14С** представляет собой схему CD8 $\alpha$ +R $\beta$  три-ТАС, содержащего мутацию цистеина до серина, для обеспечения распространения мономерного рецептора, и химерный цитозольный домен CD8 $\alpha$ , где богатая аргинином область CD8 $\alpha$  заменена на богатую аргинином область CD8 $\beta$ . **Фиг. 14D** представляет собой схему CD8 $\beta$ +Lck-три-ТАС, содержащего мутацию цистеина до серина, для обеспечения распространения мономерного рецептора, и химерный цитозольный домен CD8 $\beta$ , где домен СХСР CD8 $\alpha$ , содержащий связывающий Lck мотив, добавлен к С-концу цитозольного домена CD8 $\beta$ .

**[0045] Фиг. 15А - фиг. 15Е** иллюстрируют характеризацию *in vitro* вариантов CD8-три-ТАС, по сравнению с прототипическим три-ТАС, содержащим области CD4. **Фиг. 15А-фиг. 15В** иллюстрируют поверхностную экспрессию вариантов CD8-три-ТАС, по сравнению с прототипическим три-ТАС. **Фиг. 15С** иллюстрирует цитотоксичность *in vitro* вариантов CD8-три-ТАС при совместном культивировании с LOX IMVI (отрицательными

по HER-2), или A549, SKOV3, SKBR3 или MVA MB 231 (положительными по HER-2). **Фиг. 15D** иллюстрирует деление клеток для Т-клеток, модифицированных с использованием либо вариантов CD8-три-ТАС, либо прототипического три-ТАС. **Фиг. 15E** иллюстрирует поверхностную экспрессию TCR для модифицированных Т-клеток, содержащих варианты CD8-три-ТАС или прототипический три-ТАС.

[0046] **Фиг. 16** иллюстрирует различные три-ТАС.

[0047] **Фиг. 17** иллюстрирует вставку ТАС-CD19 в лентивирусный вектор pCCL. **Фиг. 17** иллюстрирует различные домены ТАС-CD19 (лидер CD8a, FMC63 scFv, метку Мус, мутант Y177T huUCHT1 и укороченный якорный домен корцептора CD4).

[0048] **Фиг. 18** иллюстрирует эффективность *in vivo* ТАС-CD19, полученного от различных доноров.

[0049] **Фиг. 19А-фиг. 19С** иллюстрирует пример цитотоксичности *in vitro* ТАС-CD19 против линий опухолей. **Фиг. 19А** NALM-6 (острый лимфобластный лейкоз), **фиг. 19В** Јеко-1 (лимфома из клеток мантийной зоны) и **фиг. 19С** Raji (лимфома Беркитта).

[0050] **Фиг. 19D** иллюстрирует схему 3 различных моделей *in vivo* на мышах NRG.

[0051] **Фиг. 19Е - фиг. 19G** иллюстрируют эффективность *in vivo* CD19-ТАС для NALM-6 (острый лимфобластный лейкоз) **фиг. 19Е**, Јеко-1 (лимфома из клеток мантийной зоны) **фиг. 19F** и Raji (лимфома Беркитта) **фиг. 19G**.

[0052] **Фиг. 20А** иллюстрирует разработку эксперимента для подвергнутых лечению посредством ТАС-CD19 мышей с опухолью NALM-6. После успешного лечения мышей затем повторно заражали клетками опухолей либо NALM-6 (положительными по CD19), либо KMS11 (отрицательными по CD19).

[0053] **Фиг. 20В** иллюстрирует эффективность *in vivo* для мышей, подвергнутых лечению с использованием ТАС-CD19.

[0054] **Фиг. 21А** иллюстрирует дизайн эксперимента для оценки режима дозирования и влияния дозирования на эффективность и размножение клеток.

[0055] **Фиг. 21В** иллюстрирует выживаемость *in vivo* несущих NALM-6 мышей, подвергнутых лечению с использованием либо однократной, либо дробной дозы ТАС-CD19.

[0056] **Фиг. 22А - фиг. 22В** иллюстрируют разработку эксперимента и данные, применительно к размножению *in vivo* ТАС-CD19 после введения дробной дозы. **Фиг. 22А** иллюстрирует способ отбора, используемый для идентификации Т-клеток в крови мыши. **Фиг. 22В** иллюстрирует результаты *in vivo* для размножения Т-клеток в крови.

[0057] **Фиг. 23А - фиг. 23С** иллюстрируют длительные исследования *in vivo* ТАС-CD19 у мышей. **Фиг. 23А** иллюстрирует способ эксперимента для несущих NALM-6 мышей, подвергнутых лечению с использованием различного контроля и ТАС-CD19 на двух уровнях дозирования. **Фиг. 23В** иллюстрирует эффективность *in vivo* для контрольных групп, по сравнению с группами лечения ТАС-CD19 на двух уровнях дозирования. **Фиг. 23С** иллюстрирует длительную выживаемость мышей, подвергнутых лечению низкой дозой ТАС-CD19.

[0058] **Фиг. 24** иллюстрирует результаты анализа клинической химии для мышей, подвергнутых лечению с использованием трансдуцированных TAC-CD19 или нетрансдуцированных T-клеток.

[0059] **Фиг. 25** иллюстрирует высвобождение цитокинов в крови мышей после лечения с использованием TAC-CD19 или нетрансдуцированных T-клеток.

[0060] **Фиг. 26А - фиг. 26С** иллюстрирует эффективность ВСМА-TAC в различных конфигурациях. **Фиг. 26А** иллюстрирует дизайн эксперимента. **Фиг. 26В** иллюстрирует различные контрольные и тестируемые вещества. **Фиг. 26С** иллюстрирует эффективность *in vivo* различных конструкций TAC. Фиг. 26А - фиг. 26С описывают «G<sub>4</sub>S» как SEQ ID NO: 73.

[0061] **Фиг. 27** иллюстрирует, что TAC осуществляют пролиферацию, когда сталкиваются с антигеном на клетках, но не когда антиген представлен на искусственных бусинах; но CAR осуществляют пролиферацию, независимо от того, представлены ли антигены на бусинах или клетках.

[0062] **Фиг. 28А - фиг. 28В** иллюстрируют, что модифицированные посредством TAC T-клетки размножаются *in vivo* и обеспечивают длительную защиту, показывая персистенцию клеток в модели миеломы. **Фиг. 28А - фиг. 28В** иллюстрируют, что ВСМА-TAC-T-клетки приводят к отторжению опухоли множественной миеломы в модели ксенотрансплантата KMS-11, сконструированной с использованием NanoLuc (KMS 11-NanoLuc) (ВСМА<sup>нол</sup>). После приживления опухоли, мышей подвергали лечению с использованием ВСМА-TAC-T-клеток (несущих люциферазу светляка). TAC-T-клетки значительно размножились после введения. Это коррелирует с регрессией опухоли. Подвергнутые лечению мыши являлись устойчивыми к повторному заражению опухолью, что указывает на длительную персистенцию TAC-T-клеток.

[0063] **Фиг. 29** иллюстрирует высвобождение цитокинов человека в крови мышей после лечения с использованием TAC-CD19 или нетрансдуцированных T-клеток.

[0064] На **фиг. 30** показаны иллюстративные гистограммы поверхностной экспрессии рецептора TAC на CD4 и CD8 модифицированных T-клетках. Клетки были модифицированы с использованием muIgG-HER2-TAC (промотор EF1 $\alpha$ ), huIgG-HER2-TAC (промотор MSCV) и muIgG-HER2-TAC (промотор MSCV). После модификации, T-клетки окрашивали с использованием специфического для TAC реагента и измеряли с использованием проточной цитометрии. Для всех конструкций показаны сравнимые уровни поверхностной экспрессии, где управляемая EF1 $\alpha$  экспрессия являлась более высокой, по сравнению с конструкциями с MSCV.

[0065] **Фиг. 31** иллюстрирует относительный процент T-клеток, экспрессирующих TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  или IL-2, после совместного культивирования с клетками либо OVCAR3 (положительными по HER2 positive), либо LOX IMVI (отрицательными по HER2). T-клетки были модифицированы с использованием muIgG-HER2-TAC (промотор EF1 $\alpha$ ), конструкции TAC, лишенной связывающего HER2 домена ( $\Delta$ связывающий домен TAC; промотор EF1 $\alpha$ ), huIgG-HER2-TAC (промотор MSCV) или muIgG HER2 TAC (промотор

MSCV). При совместном культивировании с LOX-IMVI (HER2<sup>отр</sup>), для контроля Δсвязывающий домен TAC и клеток с HER2-TAC не показано значительной экспрессии цитокинов. Для всех сконструированных конструкций HER2-TAC при совместном культивировании с OVCAR3(HER2<sup>пол</sup>) показана сходная способность к продукции цитокинов, в то время как для контрольных T-клеток, сконструированных с Δсвязывающий домен TAC, не показано значительной продукции цитокинов.

**[0066]** **Фиг. 32** иллюстрирует эффективность *in vivo* модифицированных посредством TAC T-клеток в модели солидной опухоли OVCAR3. T-клетки были модифицированы с использованием Δсвязывающий домен TAC (промотор EF1α), muIgG-HER2-TAC (промотор EF1α), huIgG-HER2-TAC (промотор MSCV) или muIgG-HER2-TAC (промотор MSCV). Мышам инокулировали подкожно опухоли OVCAR3 (положительные по HER-2). Их выращивали до размера приблизительно 100 мм<sup>3</sup>. Затем мышей подвергали лечению с использованием дробной дозы всего 6 миллионов модифицированных с использованием HER2-TAC, или контрольных T-клеток с Δсвязывающий домен TAC, с интервалом 48 час, посредством инъекции в хвостовую вену. Прогрессирование опухоли отслеживали посредством измерений раз в две недели. Для Δсвязывающий домен TAC не показано контроля опухоли или регрессии опухоли. Для всех модифицированных с использованием HER2-TAC T-клеток показано значительно уменьшенное прогрессирования опухоли, включая регрессию опухоли, по сравнению с контрольными мышами. Все модифицированные с использованием HER2-TAC T-клетки имели сходную противоопухолевую активность.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

**[0067]** Злокачественная опухоль представляет собой основную проблему здравоохранения, с ожидаемой диагностикой более чем 150000 случаев злокачественных опухолей, только в Канаде. В то время как пациентов с заболеванием на ранних стадиях иногда эффективно лечат посредством общепринятых видов терапии (хирургии, радиации, химиотерапии), мало возможностей являются доступными для пациентов с заболеванием на поздних стадиях, и эти возможности, как правило, имеют паллиативный характер.

**[0068]** Активная иммунотерапия ориентирована на использование иммунной системы пациента для клиренса опухолей и предлагает возможность для пациентов, для которых общепринятые виды терапии оказались неудачными. Как правило, это лечение включает инфузию пациентам больших количеств специфических для опухоли T-клеток. Доказано, что этот способ является успешным в ранней фазе клинических исследований для ряда заболеваний, включая меланому, миелому, лейкоз, лимфому и синовиальную саркому. В качестве конкретного примера, в нескольких клинических исследованиях показано, что иммунотерапия T-клетками является излечивающей у пациентов с меланомой на поздних стадиях, подтверждая полезность этого способа. Кроме того, пациентов, страдающих хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL) и острым лимфобластным лейкозом (ALL), также эффективно лечили и излечивали с помощью

иммунотерапии Т-клетками.

**[0069]** Ключевой проблемой, стоящей перед клиническим применением адоптивной Т-клеточной терапии является источник Т-клеток. Как правило, Т-клетки, выделенные от несущего опухоль пациента, выращивают до больших количеств *ex vivo* и вводят обратно пациенту для индукции надежного противоопухолевого иммунного ответа. Специфичности для опухоли достигают посредством любого из: (i) выделения природных специфических для опухоли Т-клеток от пациента; или (ii) модификации множества Т-клеток из периферической крови для экспрессии специфических для опухоли рецепторов. Природные специфические для опухоли Т-клетки являются редкими, и выделение таких клеток в терапевтических количествах от пациентов с злокачественными опухолями является трудоемким и дорогостоящим способом. В отличие от этого, становится более эффективной модификация легко доступных периферических Т-клеток с использованием специфических для опухоли рецепторов, посредством генетической манипуляции. Для этого процесса модификации разработаны способы, которые являются клинически осуществимыми, и в нескольких клинических исследованиях показана целесообразность и эффективность генетически модифицированных Т-клеток для лечения злокачественной опухоли.

**[0070]** До настоящего времени, большинство видов терапии модифицированными Т-клетками, включающие генетическую модификацию Т-клеток, приводили к: (i) усиленной экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR); или (ii) химерного рецептора антигена (CAR), специфического для антигенных мишеней на опухоли. До настоящего времени, химерные рецепторы антигенов, использованные для модификации Т-клеток, состояли из: (i) нацеливающего домена, обычно одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv); (ii) трансмембранного домена; и (iii) цитозольного домена, содержащего передающие сигналы элементы из Т-клеточного рецептора и ассоциированных белков. Такие химерные рецепторы антигенов также обозначены как «Т-тельце» или «химерный иммунный рецептор» (CIR), однако, в настоящее время, большинство исследователей используют термин «CAR». Одним преимуществом способа CAR является то, что он позволяет нацеливать любые иммунциты пациента против любой желательной мишени независимо от главного комплекса гистосовместимости (МНС) образом. Это является привлекательным, поскольку представление МНС часто является дефектным в клетках опухолей.

**[0071]** CAR рассматривают в модульных терминах, и ученые потратили значительное время на исследование влияния различных цитоплазматических передающих сигналы доменов на функцию CAR. Общепринятые CAR, как правило, разделяют два главных компонента: (i) цитоплазматический домен CD3-дзета, содержащий иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM), критические для активации Т-клетки; и (ii) компоненты костимулирующих рецепторов, запускающие важные пути выживания, такие как путь Akt.

**[0072]** В CAR первого поколения используют один передающий сигналы домен

либо из CD3 $\zeta$ , либо из Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ . В CAR второго поколения объединяют передающий сигналы домен из CD3 $\zeta$  с цитоплазматическим доменом костимулирующих рецепторов из семейства рецепторов либо CD28, либо TNFR. В большинстве модифицированных посредством CAR Т-клеток, тестируемых в настоящее время в клинике, используют CAR второго поколения, в которых CD3 $\zeta$  соединен с цитоплазматическим доменом либо из CD28, либо из CD137. Для этих CAR второго поколения показана противоопухолевая активность для положительных по CD19 опухолей. В CAR третьего поколения объединены множество костимулирующих доменов, но существует опасение, что CAR третьего поколения могут терять специфичность для антигена.

**[0073]** В то время как показано, что модифицированные посредством CAR Т-клетки являются многообещающими в клиническом применении, они основаны на синтетическом способе замены природного сигнала активации, обеспечиваемого Т-клеточным рецептором (TCR). Поскольку этот синтетический рецептор не доставляет все передающие сигналы компоненты, ассоциированные с TCR (например, ITAM на CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ ), остается неясным, оптимально ли Т-клетки активируются посредством CAR, или каким образом активация CAR влияет на дифференцировку Т-клетки (например, прогрессирование до клетки памяти). Кроме того, поскольку передающие сигналы домены CAR оторваны от своих природных регуляторных партнеров, по самому характеру структуры CAR, существует присущий им риск того, что CAR могут приводить к низкому уровню конститутивной активации, что может приводить к неспецифической токсичности. Таким образом, синтетический характер прототипического CAR может нарушать канонические механизмы, ограничивающие активацию TCR, и может лежать в основе тяжелой токсичности, часто ассоциированной с общепринятыми CAR-Т-клетками.

**[0074]** Принимая во внимание эти ограничения, является предпочтительным перенацеливать Т-клетки для атаки на опухоли посредством их природного TCR. С этой целью, создан класс рекомбинантных белков, названных «привлекающими Т-клетки биспецифическими активаторами» (BiTE). Эти белки используют фрагменты биспецифических антител для перекрестного связывания Т-клеточных рецепторов TCR с антигенами-мишенями. Это приводит к эффективной активации Т-клеток, запускающей цитотоксичность. Подобным образом, получены биспецифические антитела, достигающие этой цели, и некоторые ученые просто связывали антитела против CD3 со специфическими для опухоли антителами с использованием химической связи. В то время как для этих биспецифических белков показана некоторая активность *in vitro*, получение в соответствии с GMP, короткие биологические периоды времени полужизни и ограниченная биодоступность представляют значительные проблемы для успешного использования этих молекул в лечении злокачественных опухолей. Кроме того, эти молекулы также не могут надлежащим образом воспроизводить передачу сигналов природного TCR, поскольку они не привлекают корецепторы TCR (CD8 и CD4).

**[0075]** В свете вышесказанного, остается необходимость в химерных рецепторах с увеличенной активностью и безопасностью.

**[0076]** Разработан альтернативный химерный рецептор, названный трифункциональным связывающим Т-клетку с антигеном (три-ТАС или ТАС) рецептором, который использует отличные биологические механизмы для нацеливания Т-клеток для атаки на опухоли. В то время как CAR представляет собой полностью синтетический рецептор, сшивающий вместе компоненты передающего сигналы комплекса Т-клеточного рецептора (TCR), рецептор ТАС перенацеливает TCR на мишени опухолей и воспроизводит передающую сигналы структуру природного TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, ТАС, описанные в настоящем описании, активируют природную передачу сигналов главного комплекса гистосовместимости (МНС) через Т-клеточный рецептор (TCR), в то же время сохраняя нерестрицированное по МНС нацеливание. Кроме того, ТАС, описанные в настоящем описании, привлекают Т-клеточный рецептор (TCR) в комбинации со стимуляцией корецептором. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления, для три-ТАС, описанных в настоящем описании, показана увеличенная активность и безопасность.

#### **Конкретная терминология**

**[0077]** Термин «Т-клетка», в рамках изобретения, относится к типу лимфоцита, играющему центральную роль в опосредованном клетками. Т-клетки, также обозначенные как Т-лимфоциты, отличаются от других лимфоцитов, таких как В-клетки и клетки естественные киллеры, по присутствию Т-клеточного рецептора (TCR) на поверхности клетки. Существует несколько подгрупп Т-клеток с отличными функциями, включая, но без ограничения, Т-клетки-помощники, цитотоксические Т-клетки, Т-клетки памяти, регуляторные Т-клетки и Т-клетки естественные киллеры.

**[0078]** Термин «связывающий Т-клетку с антигеном агент» или ТАС использован взаимозаменяемо с «трифункциональным связывающим Т-клетку с антигеном агентом» или три-ТАС, и обозначает сконструированную конструкцию нуклеиновой кислоты или полипептида, которая, при экспрессии на Т-клетке, способствует облегчению нацеливания Т-клетки на конкретный антиген. В некоторых вариантах осуществления, ТАС содержит (а) специфический для мишени лиганд, (b) лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом Т-клеточного рецептора (TCR), и (c) передающий сигналы домен Т-клеточного рецептора.

**[0079]** Термин «полинуклеотид» и/или «последовательность нуклеиновой кислоты», и/или «нуклеиновая кислота», в рамках изобретения, относится к последовательности мономеров нуклеозидов или нуклеотидов, состоящей из оснований, сахаров и межсахарных (каркасных) связей. Термин включает также модифицированные или замещенные последовательности, содержащие не встречающиеся в природе мономеры или их части. Последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут представлять собой последовательности дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или последовательности рибонуклеиновой кислоты (РНК), и могут включать природные основания, включая аденин, гуанин, цитозин, тимидин и урацил. Последовательности могут также содержать модифицированные основания. Примеры

таких модифицированных оснований включают аза- и дезааденин, гуанин, цитозин, тимидин и урацил; и ксантин и гипоксантин. Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению можно выделять из биологических организмов, получать лабораторными способами генетической рекомбинации, или получать посредством химического синтеза или других известных способов получения нуклеиновых кислот.

**[0080]** Термин «выделенный полинуклеотид» или «выделенная последовательность нуклеиновой кислоты», в рамках изобретения, относится к нуклеиновой кислоте, в основном свободной от клеточного материала или культуральной среды при получении способами рекомбинантной ДНК, или химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе. Выделенная нуклеиновая кислота является также в основном свободной от последовательностей, которые в природе фланкируют нуклеиновую кислоту (т.е. последовательностей, локализованных на 5'- и 3'-концах нуклеиновой кислоты), из которой происходит эта нуклеиновая кислота. Термин «нуклеиновая кислота» предназначен для включения ДНК и РНК, и является либо двухцепочечной, либо одноцепочечной, и представляют собой смысловую или антисмысловую цепь. Кроме того, термин «нуклеиновая кислота» включает комплементарные последовательности нуклеиновой кислоты.

**[0081]** Термин «рекомбинантная нуклеиновая кислота» или «сконструированная нуклеиновая кислота», в рамках изобретения, относится к нуклеиновой кислоте или полинуклеотиду, не обнаруженному в биологическом организме. Например, рекомбинантные нуклеиновые кислоты можно получать лабораторными способами генетической рекомбинации (такими как молекулярное клонирование) для получения последовательностей, в ином случае не обнаруживаемых в природе. Рекомбинантные нуклеиновые кислоты можно также получать посредством химического синтеза или других известных способов получения нуклеиновых кислот.

**[0082]** Термин «полипептид» или «белок», в рамках изобретения, описывает цепь из аминокислот. Полипептид или белок по настоящему изобретению представляет собой пептид, который обычно описывает цепь из аминокислот. Термин белок, в рамках изобретения, описывает также большую молекулу, содержащую одну или несколько цепей из аминокислот и, в некоторых вариантах осуществления, представляет собой фрагмент или домен белка или полноразмерный белок. Кроме того, в рамках изобретения, термин белок относится либо к линейной цепи из аминокислот, либо к цепи из аминокислот, процессированной и свернутой в функциональный белок. Структуру белка разделяют на четыре различных уровня: (1) первичная структура - относящаяся к последовательности аминокислот в полипептидной цепи, (2) вторичная структура - относящаяся к регулярным локальным подструктурам цепи остова полипептида, таким как  $\alpha$ -спираль и  $\beta$ -листы, (3) третичная структура - относящаяся к трехмерной структуре мономерных и мультимерных молекул белка, и (4) четвертичная структура - относящаяся к трехмерной структуре, включающей агрегацию двух или более индивидуальных полипептидных цепей, действующих как одна функциональная единица. Белки, по

настоящему изобретению, в некоторых вариантах осуществления, получают посредством выделения и очистки белков из клеток, в которых они продуцированы естественным образом, посредством ферментного (например, протеолитического) расщепления, и/или рекомбинантным способом посредством экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей белки или фрагменты по настоящему изобретению. Белки и/или фрагменты по настоящему изобретению, в некоторых вариантах осуществления, получают посредством химического синтеза или других известных способов получения белков и фрагментов.

**[0083]** Термин «выделенный полипептид» относится к полипептиду, в основном свободному от клеточного материала или культуральной среды при получении способами рекомбинантной ДНК, или химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе.

**[0084]** Термин «антитело», в рамках изобретения, предназначен для включения моноклональных антител, поликлональных антител, одноцепочечных антител, химерных антител и слитых с антителами белков. Антитело может происходить из рекомбинантных источников и/или быть продуцировано в трансгенных животных. Термин «фрагмент антитела», в рамках изобретения предназначен для включения, без ограничений, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, dsFv, ds-scFv, димеров, миниантител, диател и их мультимеров, мультиспецифических фрагментов антител и доменных антител.

**[0085]** Термин «вектор», в рамках изобретения, относится к полинуклеотиду, используемому для доставки нуклеиновой кислоты во внутреннее пространство клетки. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой экспрессирующий вектор, содержащий последовательности для контроля экспрессии (например, промотор), функционально связанные с нуклеиновой кислотой, подлежащей экспрессии в клетке. Векторы, известные в данной области, включают, но без ограничения, плазмиды, фаги, космиды и вирусы.

**[0086]** Термин «антиген опухоли» или «опухолеассоциированный антиген», в рамках изобретения, относится к антигенному веществу, продуцируемому в клетках опухолей, которое запускает иммунный ответ у хозяина (например, когда оно представлено посредством комплексов МНС). В некоторых вариантах осуществления, антиген опухоли находится на поверхности клетки опухоли.

**[0087]** Термин «Т-клеточный рецептор» или TCR, в рамках изобретения, относится к комплексу интегральных мембранных белков, который участвует в активации Т-клеток в ответ на связывание антигена. TCR представляет собой связанный дисульфидными связями заякоренный в мембране гетеродимер, в норме состоящий из высоко варьируемых цепей альфа ( $\alpha$ ) и бета ( $\beta$ ), экспрессированных как часть комплекса с инвариантными молекулами цепей CD3 (кластера дифференцировки 3). Т-клетки, экспрессирующие этот рецептор, обозначены как  $\alpha:\beta$  (или  $\alpha\beta$ ) Т-клетки, хотя незначительная часть Т-клеток экспрессируют альтернативный рецептор, сформированный варьируемыми цепями гамма ( $\gamma$ ) и дельта ( $\delta$ ), они обозначены как  $\gamma\delta$  Т-клетки. CD3 представляет собой белковый комплекс, состоящий из четырех отдельных

цепей. У млекопитающих, комплекс содержит цепь CD3 $\gamma$ , цепь CD3 $\delta$ , две цепи CD3 $\epsilon$  и две цепи CD3 $\zeta$ .

**[0088]** в рамках изобретения, термин «трансмембранный и цитозольный домен» относится к полипептиду, который содержит трансмембранный домен и цитозольный домен белка, ассоциированного с комплексом Т-клеточного рецептора (TCR). В некоторых вариантах осуществления, такой трансмембранный и цитозольный домен может включать, но без ограничения, домены белка, которые (a) ассоциированы с липидным рафтом и/или (b) связывают Lck.

**[0089]** «Корецептор TCR» в рамках изобретения, относится к молекуле, которая помогает Т-клеточному рецептору (TCR) в коммуникации с антигенпредставляющей клеткой и которую можно рассматривать как часть первого сигнала, приводящего к активации TCR. Примеры корецепторов TCR включают, но без ограничения, CD4, LAG3 и CD8.

**[0090]** «Костимулятор TCR» в рамках изобретения, относится к молекуле, которая усиливает ответ Т-клетки на антиген и которую можно рассматривать как второй сигнал, приводящий к активации TCR. Примеры костимуляторов TCR включают, но без ограничения, ICOS, CD27, CD28, 4-1BB (CD 137), OX40 (CD134), CD30, CD40, ассоциированный с функцией лимфоцитов антиген 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, специфически связывающий CD83.

**[0091]** «Коингибитор TCR» или «рецептор контрольной точки», в рамках изобретения, относится к молекуле, которая ингибирует ответ Т-клетки на антиген. Примеры коингибиторов TCR включают, но без ограничения, PD-1, TIM3, LAG-3, TIGIT, VTLA, CD160 и CD37.

**[0092]** Термины «реципиент», «индивидуум», «субъект», «хозяин» и «пациент» использованы в настоящем описании взаимозаменяемо, и в некоторых вариантах осуществления, относятся к любому субъекту-млекопитающему, для которого диагностика, лечение или терапия являются желательными, в частности, к человеку. «Млекопитающее», для целей лечения, относится к любому животному, классифицированному как млекопитающее, включая человека, домашних и сельскохозяйственных животных, и лабораторных животных, животных в зоопарке, спортивных животных или животных-компаньонов, таких как собаки, лошади, кошки, коровы, овцы, козы, свиньи, мыши, крысы, кролики, морские свинки, обезьяны и т.д. В некоторых вариантах осуществления, млекопитающее представляет собой человека. Ни один из этих терминов не требует наблюдения медицинского персонала.

**[0093]** в рамках изобретения, термины «лечение», «обработка», и т.п., в некоторых вариантах осуществления, относятся к введению средства или осуществлению способа, с целью получения эффекта. Эффект может являться профилактическим в отношении полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома, и/или может являться терапевтическим в отношении вызова частичного или полного излечения заболевания и/или симптомов заболевания. «Лечение», в рамках изобретения, может

включать лечение заболевания или нарушения (например, злокачественной опухоли) у млекопитающего, в частности, у человека, и включает: (а) предотвращение возникновения заболевания или симптома заболевания у субъекта, который может иметь предрасположенность к заболеванию, но еще не диагностирован как имеющий его (например, включая заболевания, которые могут быть ассоциированы с или вызваны первичным заболеванием; (b) ингибирование заболевания, т.е., арест его развития; и (с) облегчение заболевания, т.е., вызов регрессии заболевания. Лечение может относиться к любым показателям успеха лечения или облегчения, или предотвращения злокачественной опухоли, включая любой объективный или субъективный параметр, такой как ослабление; ремиссия; уменьшение симптомов; или доведение состояния заболевания до более переносимого для пациента; замедление скорости дегенерации или ухудшения; или доведение конечной точки дегенерации до менее истощающей. Лечение или облегчение симптомов основано на одном или нескольких объективных или субъективных параметрах; включая результаты обследования терапевтом. Соответственно, термин «лечение» включает введение соединений или средств по настоящему изобретению для предотвращения, задержки, облегчения, ареста или ингибирования развития симптомов или состояний, ассоциированных с заболеваниями (например, злокачественными опухолями). Термин «терапевтический эффект» относится к уменьшению, прекращению, или предотвращению заболевания, симптомов заболевания или побочных эффектов заболевания у субъекта.

**[0094]** В рамках изобретения, формы единственного числа включают объекты ссылки множественного числа, если контекст явно не требует иного. Таким образом, например, ссылка на «антитело» включает множество антител, и ссылка на «антитела», в некоторых вариантах осуществления, включает несколько антител и т.д.

**[0095]** В рамках изобретения, все числовые значения или числовые диапазоны включают целые числа внутри таких диапазонов или включающие такие диапазоны, и доли значений или целых чисел внутри диапазонов или включающие диапазоны, если контекст явно не требует иного. Таким образом, например, ссылка на диапазон 90-100% включает 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%, 96%, 97% и т.д., так же как 91,1%, 91,2%, 91,3%, 91,4%, 91,5% и т.д., 92,1%, 92,2%, 92,3%, 92,4%, 92,5% и т.д., и т.д. В другом примере, ссылка на диапазон 1-5000 раз включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 раз и т.д., так же как 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5 раза и т.д., 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5 раз и т.д., и т.п.

**[0096]** «Приблизительное» количество, в рамках изобретения, относится к диапазону, включающему количество и лежащему в диапазоне от на 10% ниже этого количества до на 10% выше этого количества. «Приблизительный» диапазон относится к 10% ниже нижнего предела диапазона, простираясь до 10% выше верхнего предела диапазона.

**[0097]** «Процент (%) идентичности» относится к степени, в которой две последовательности (нуклеотидов или аминокислот) имеют одинаковый остаток в тех же

самых положениях при выравнивании. Например, «аминокислотная последовательность является на X% идентичной SEQ ID NO: Y» обозначает % идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: Y и уточняет, что X% остатков в аминокислотной последовательности являются идентичными остаткам из последовательности, описанной в SEQ ID NO: Y. Как правило, компьютерные программы используют для таких расчетов. Иллюстративные программы, сравнивающие и выравнивающие пары последовательностей, включают ALIGN (Myers and Miller, 1988), FASTA (Pearson and Lipman, 1988; Pearson, 1990) и gapped BLAST (Altschul et al., 1997), BLASTP, BLASTN или GCG (Devereux et al., 1984).

**[0098]** в рамках изобретения, термин «избирательное связывание» относится к более высокой аффинности, с которой молекула (например, белок, такой как связывающий мишень лиганд ТАС) связывается со своей молекулой-мишенью (например, антигеном-мишенью, таким как HER-2, BCMA или CD19), по сравнению с другими молекулами.

#### **Связывающий Т-клетку с антигеном агент (три-ТАС или ТАС)**

**[0099]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (три-ТАС). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты, кодирующие три-ТАС, содержат: (а) первый полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд; (b) второй полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий комплекс TCR; и (с) третий полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен и цитозольный домен. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты, кодирующие три-ТАС, не кодируют костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты, кодирующие три-ТАС, не кодируют коактивирующий домен.

#### **Специфический для мишени лиганд**

**[0100]** Специфический для мишени лиганд, также обозначенный как антигенсвязывающий домен, относится к любому веществу или молекуле, связывающимся, напрямую или опосредованно, с клеткой-мишенью. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд связывается с антигеном на клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой клетку, ассоциированную с состоянием заболевания, включая, но без ограничения, злокачественную опухоль, гематологическое злокачественное новообразование, крупноклеточную В-клеточную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности или крупноклеточную В-клеточную лимфому, возникающую из фолликулярной лимфомы. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой клетку опухоли. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд связывается с антигеном опухоли или опухолеассоциированным антигеном на клетке опухоли. В некоторых вариантах

осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген опухоли. В некоторых вариантах осуществления, антиген опухоли, когда является белковым, представляет собой последовательность из 8 или более аминокислот, вплоть до полноразмерного белка. В некоторых вариантах осуществления, антиген опухоли представляет собой любое количество аминокислот между 8 и полноразмерным белком, которое содержит по меньшей мере один антигенный фрагмент полноразмерного белка, представленный на главном комплексе гистосовместимости (МНС). Примеры антигенов опухолей включают, но без ограничения, CD19, HER-2 (erbB-2), антиген созревания В-клеток (BCMA), альфа-фетопротеин (AFP), карциноэмбриональный антиген (CEA), CA-125, MUC-1, эпителиальный антиген опухоли (ETA), тирозиназу, ассоциированную с меланомой антиген (MAGE), простатспецифический антиген (PSA), ассоциированный с глиомой антиген,  $\beta$ -субъединицу хорионического гонадотропина человека, тиреоглобулин, RAGE-1, MN-CA IX, обратную транскриптазу теломеразы человека, RU1, RU2 (AS), карбоксилэстеразу кишечника, mut hsp70-2, M-CSF, простазу, PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, простеин, PSMA, сурвивин и теломеразу, антиген-1 опухоли карциномы предстательной железы (PSTA-1), ELF2M, эластазу нейтрофилов, CD22, инсулиновый фактор роста (IGF)-I, IGF-II, рецептор IGF-I и мезотелин.

**[0101]** В некоторых вариантах осуществления, специфические для мишени лиганды включают, но без ограничения, антитела и их фрагменты, например, одноцепочечные антитела, такие как одно-цепочечные антитела (scFv), однодоменные антитела, пептиды, пептидомиметики, белки, гликопротеины или протеогликаны, которые связываются с клеткой и/или антигеном - мишенью. В некоторых вариантах осуществления, специфические для мишени лиганды включают, но без ограничения, сконструированные с анкириновым повтором белки (DARPin), лектины, ноттины, центририны, антикарины или природные лиганды для антигена опухоли, такие как факторы роста, субстраты ферментов, рецепторы или связывающие белки. В некоторых вариантах осуществления, специфические для мишени лиганды включают небелковые соединения, которые связываются с клетками и/или антигенами -мишенями, включая, но без ограничения, углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты или малые молекулы. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой сконструированный анкириновый повтор (DARPin), нацеленный на специфическую клетку и/или антиген. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (ScFv), нацеленный на специфическую клетку и/или антиген.

**[0102]** В некоторых вариантах осуществления, антиген опухоли представляет собой антиген HER-2. В некоторых вариантах осуществления, специфический для HER-2 лиганд содержит антигенсвязывающий домен антитела, выбранного из трастузумаба, пертузумаба, лапатиниба, нератиниба, адо-трастузумаба эмтанзина, ганкотамаба, маргетуксимаба, тимигутузумаба и эртумаксамаба. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой DARPin,

избирательно связывающий антиген HER-2 (erbB-2). В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой DARPIn, специфически связывающий антиген HER-2 (erbB-2). В некоторых вариантах осуществления, DARPIn, нацеленный на HER-2 (erb-2), содержит SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8.

**[0103]** В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 7.

**[0104]** В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 8.

**[0105]** В некоторых вариантах осуществления, антиген опухоли представляет собой антиген BCMA. В некоторых вариантах осуществления, специфический для BCMA

лиганд содержит антигенсвязывающий домен антитела, выбранного из белантамаба мафодотина, и GSK2857916. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой scFv, избирательно связывающий BCMA. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой scFv, специфически связывающий BCMA. В некоторых вариантах осуществления, scFv, связывающий BCMA, содержит SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

**[0106]** В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 33.

**[0107]** В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 34.

**[0108]** В некоторых вариантах осуществления, антиген опухоли представляет собой



связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, содержит вещество, связывающееся, напрямую или опосредованно, с белком из TCR. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, содержит вещество, избирательно связывающееся с белком из TCR. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, содержит вещество, специфически связывающееся с белком из TCR. Белки, ассоциированные с TCR, включают, но без ограничения, цепь альфа ( $\alpha$ ) TCR, цепь бета ( $\beta$ ) TCR, цепь гамма ( $\gamma$ ) TCR, цепь дельта ( $\delta$ ) TCR, цепь CD3 $\gamma$ , цепь CD3 $\delta$  и цепи CD3 $\epsilon$ . В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой антитело против цепи альфа ( $\alpha$ ) TCR, цепи бета ( $\beta$ ) TCR, цепи гамма ( $\gamma$ ) TCR, цепи дельта ( $\delta$ ) TCR, цепи CD3 $\gamma$ , цепи CD3 $\delta$  и/или цепи CD3 $\epsilon$ . В некоторых вариантах осуществления, белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой CD3. В некоторых вариантах осуществления, белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой CD3 $\epsilon$ . Примеры антител против CD3, включают, но без ограничения. В некоторых вариантах осуществления, антитело, связывающее CD3, представляет собой одноцепочечное антитело, например, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий TCR, представляет собой антитело против CD3, или его фрагмент, такие как муромонаб, отелизизумаб, теплизумаб, висилизумаб, CD3-12, MEM-57, 4D10A6, CD3D или TR66.

**[0112]** В некоторых вариантах осуществления, CD3 происходит из комплекса TCR на клетке, экспрессирующей второй полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, связывание CD3 индуцирует активацию клетки, экспрессирующей второй полинуклеотид.

**[0113]** В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, представляет собой UCNT1 или его вариант. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, представляет собой UCNT1 (SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или его гомологи). В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCNT1 связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCNT1 избирательно связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCNT1 специфически связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCNT1 связывает CD3 $\epsilon$ . В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCNT1 избирательно связывает CD3 $\epsilon$ . В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCNT1 специфически связывает CD3 $\epsilon$ . В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCNT1 кодирован посредством SEQ ID NO 13. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCNT1 содержит SEQ ID NO 14. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCNT1 является мутантным. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCNT1 содержит мутацию Y182T (также обозначенный как UCNT1 (Y182T)) (SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72). В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCNT1 (Y182T) связывает CD3. В некоторых вариантах

осуществления, лиганд UCНТ1 (Y182T) избирательно связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCНТ1 (Y182T) специфически связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCНТ1 (Y182T) связывает CD3ε. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCНТ1 (Y182T) избирательно связывает CD3ε. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCНТ1 (Y182T) специфически связывает CD3ε. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCНТ1 (Y182T) кодирован посредством SEQ ID NO 71. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCНТ1 (Y182T) содержит SEQ ID NO 72. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, представляет собой гуманизированный UCНТ1 (huUCНТ1). В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, представляет собой huUCНТ1 (SEQ ID NO 43, SEQ ID NO: 44 или его гомологи). В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCНТ1 связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCНТ1 избирательно связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCНТ1 специфически связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCНТ1 связывает CD3ε. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCНТ1 избирательно связывает CD3ε. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCНТ1 специфически связывает CD3ε. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCНТ1 кодирован посредством SEQ ID NO 43. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCНТ1 содержит SEQ ID NO 44. В некоторых вариантах осуществления, huUCНТ1 имеет мутацию Y177T (также обозначенный как huUCНТ1 (Y177T)) (SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46). В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCНТ1 (Y177T) связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCНТ1 (Y177T) избирательно связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCНТ1 (Y177T) специфически связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCНТ1 (Y177T) связывает CD3ε. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCНТ1 (Y177T) избирательно связывает CD3ε. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCНТ1 (Y177T) специфически связывает CD3ε. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCНТ1 (Y177T) кодирован посредством SEQ ID NO 45. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCНТ1 содержит SEQ ID NO 46.

**[0114]** В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит













последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 26.

**Трансмембранный домен и цитозольный домен**

**[0131]** В некоторых вариантах осуществления, связывающий T-клетку с антигеном агент включает полипептид передающего сигналы домена T-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена TCR содержит трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена TCR содержит цитозольный домен. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена TCR содержит трансмембранный домен и цитозольный домен. В некоторых вариантах осуществления, цитозольный домен и трансмембранные домены, необязательно, соединены посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена T-клеточного рецептора содержит домен корецептора TCR. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена T-клеточного рецептора не содержит домен костимулятора TCR. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена TCR содержит трансмембранный домен и/или цитозольный домен корецептора TCR. В некоторых вариантах осуществления, корецептор TCR представляет собой CD4, CD8, LAG3 или его химерный вариант.

**[0132]** В некоторых вариантах осуществления, корецептор TCR представляет собой CD4. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена TCR содержит трансмембранный и цитозольный домены корецептора CD4, кодированные посредством SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена TCR содержит трансмембранный и цитозольный домены корецептора CD4, содержащие SEQ ID NO: 18.

**[0133]** В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с



последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 37.

**[0137]** В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 38.

**[0138]** В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена TCR содержит химеру последовательностей или доменов из корцепторов. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена TCR содержит химеру CD8 $\alpha$  и CD8 $\beta$ , где богатая аргинином область CD8 $\alpha$  заменена на богатую аргинином область CD8 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора содержит трансмембранный и цитозольный домены химеры корцептора CD8 $\alpha$ +R( $\beta$ ), кодируемой посредством SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора содержит трансмембранный и цитозольный домены химеры корцептора CD8 $\alpha$ +R( $\beta$ ), представленные SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена TCR содержит химеру CD8 $\alpha$  и CD8 $\beta$ , домен CXCP CD8 $\alpha$ , содержащий связывающий Lck мотив, добавлен к С-концу цитозольного домена CD8 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора содержит трансмембранный и

цитозольный домены химеры корцептора CD8 $\beta$ +Lck, кодируемые посредством SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора содержит трансмембранный и цитозольный домены химеры корцептора CD8 $\beta$ +Lck, представленные SEQ ID NO: 42.

**[0139]** В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 39.

**[0140]** В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 40.

**[0141]** В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность



CD30. В некоторых вариантах осуществления, костимулятор TCR представляет собой CD40. В некоторых вариантах осуществления, костимулятор TCR представляет собой ассоциированный с функцией лимфоцитов антиген 1 (LFA-1). В некоторых вариантах осуществления, костимулятор TCR представляет собой CD2. В некоторых вариантах осуществления, костимулятор TCR представляет собой CD7. В некоторых вариантах осуществления, костимулятор TCR представляет собой LIGHT. В некоторых вариантах осуществления, костимулятор TCR представляет собой NKG2C. В некоторых вариантах осуществления, костимулятор TCR представляет собой B7-H3. В некоторых вариантах осуществления, костимулятор TCR представляет собой лиганд, специфически связывающий CD83.

**[0144]** В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена TCR содержит трансмембранный домен и/или цитозольный домен коингибитора TCR. В некоторых вариантах осуществления, коингибитор TCR представляет собой PD-1. В некоторых вариантах осуществления, коингибитор TCR представляет собой TIM3. В некоторых вариантах осуществления, коингибитор TCR представляет собой LAG-3. В некоторых вариантах осуществления, коингибитор TCR представляет собой TIGIT. В некоторых вариантах осуществления, коингибитор TCR представляет собой VTLA. В некоторых вариантах осуществления, коингибитор TCR представляет собой CD160. В некоторых вариантах осуществления, коингибитор TCR представляет собой CD37.

**[0145]** В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена TCR включает как цитозольный домен, так и трансмембранный домен корцептора или костимулирующего белка TCR. В некоторых вариантах осуществления, цитозольный домен и трансмембранный домен происходят из одного и того же корцептора или костимулятора, или из различных корцепторов или костимуляторов. В некоторых вариантах осуществления, TAC дополнительно содержит другие полипептиды, которые напрямую или опосредованно действуют для нацеливания или активации Т-клетки.

#### **Линкеры, соединители и конфигурации**

**[0146]** В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, описанная в настоящем описании, организована в следующем порядке (1) первый полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд; (2) второй полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий комплекс TCR; (3) третий полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен и цитозольный домен. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, описанная в настоящем описании, организована в следующем порядке (1) первый полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд; (2) второй полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий комплекс TCR; (3) третий полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен и цитозольный домен, где порядок приведен от 5'-конца до 3'-конца. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, описанная в настоящем описании, организована в следующем порядке (1) первый полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд; (2) второй

полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий комплекс TCR; (3) третий полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен и цитозольный домен, где порядок приведен от 3'-конца до 5'-конца. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, описанная в настоящем описании, организована в следующем порядке (1) первый полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий комплекс TCR; (2) второй полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд; (3) третий полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен и цитозольный домен. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, описанная в настоящем описании, организована в следующем порядке (1) первый полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий комплекс TCR; (2) второй полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд; (3) третий полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен и цитозольный домен, где порядок приведен от 5'-конца до 3'-конца. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, описанная в настоящем описании, организована в следующем порядке (1) первый полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий комплекс TCR; (2) второй полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд; (3) третий полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен и цитозольный домен, где порядок приведен от 3'-конца до 5'-конца.

**[0147]** В некоторых вариантах осуществления, первая нуклеиновая кислота кодирует первый полипептид, вторая нуклеиновая кислота кодирует второй полипептид, и третья нуклеиновая кислота кодирует третий полипептид. В некоторых вариантах осуществления, первый полипептид, второй полипептид и третий полипептид слиты напрямую. Например, специфический для мишени лиганд и полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора оба слиты с лигандом, связывающим комплекс TCR. В некоторых вариантах осуществления, первый полипептид, второй полипептид, и третий полипептид соединены посредством по меньшей мере одного линкера. В некоторых вариантах осуществления, первый полипептид и второй полипептид слиты напрямую, и соединены с третьим полипептидом посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления, второй полипептид и третий полипептид слиты напрямую, и соединены с первым полипептидом посредством линкера.

**[0148]** В некоторых вариантах осуществления, линкер представляет собой пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 1-40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 1-30 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 1-15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 1-10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 1-6 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 30-40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 32-36 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 5-30 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 5

аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 30 аминокислот.

**[0149]** В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит линкер G<sub>4</sub>S<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 74). В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит SEQ ID NO: 11, 12, 15, 16, 19, 20, или их варианты или фрагменты.

**[0150]** В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер, который соединяет специфический для мишени лиганд с лигандом, связывающим комплекс TCR, (например, UCNT1), известен как соединитель, чтобы отличать этот домен белка от других линкеров в три-TAC. Соединитель имеет любой размер. В некоторых вариантах осуществления, соединитель между лигандом, связывающим комплекс TCR, и специфическим для мишени лигандом представляет собой короткую спираль, содержащую SEQ ID NO ID: 28. В некоторых вариантах осуществления, соединитель между лигандом, связывающим комплекс TCR, и специфическим для мишени лигандом представляет собой короткую спираль, кодируемую посредством SEQ ID NO ID: 27. В некоторых вариантах осуществления, соединитель между лигандом, связывающим комплекс TCR, и специфическим для мишени лигандом представляет собой длинную спираль, содержащую SEQ ID NO ID: 30. В некоторых вариантах осуществления, соединитель между лигандом, связывающим комплекс TCR, и специфическим для мишени лигандом представляет собой длинную спираль, кодируемую посредством SEQ ID NO ID: 29. В некоторых вариантах осуществления, соединитель между лигандом, связывающим комплекс TCR, и специфическим для мишени лигандом представляет собой большой домен, содержащий SEQ ID NO ID: 32. В некоторых вариантах осуществления, соединитель между лигандом, связывающим комплекс TCR, и специфическим для мишени лигандом представляет собой большой домен, кодируемый посредством SEQ ID NO ID: 31.

**[0151]** В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, описанная в настоящем описании, содержит лидерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5, 47 или 49. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5, 47 или 49. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5, 47 или 49. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей

мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5, 47 или 49. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5, 47 или 49. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5, 47 или 49. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 5, 47 или 49.

**[0152]** В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, описанная в настоящем описании, содержит лидерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6, 48 или 50. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6, 48 или 50. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6, 48 или 50. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6, 48 или 50. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6, 48 или 50. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6, 48 или 50. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 6, 48 или 50.

**[0153]** Предусматривают, что три-ТАС представлен в различных конфигурациях и комбинациях (a) специфического для мишени лиганда, (b) лиганда, связывающего комплекс TCR, и (c) передающего сигналы домена TCR, как описано в настоящем описании.

**[0154]** В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (a) специфический для мишени лиганд, (b) одноцепочечное антитело (scFv), связывающее CD3ε, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (a) специфический для мишени лиганд, (b) UCNT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (a) специфический для мишени лиганд, (b) UCNT1 (Y182T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (a) специфический для мишени лиганд, (b) huUCNT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В









трансмембранный и цитозольный домен корцептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для CD19 ScFv, (b) ОКТ3, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корцептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для CD19 ScFv, (b) F6A, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корцептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для CD19 ScFv, (b) L2K, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корцептора CD8.

**[0166]** В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС переносит CD3 и TCR в области липидных рафтов мембраны, и располагает Lck поблизости от TCR, сходным образом с природным связыванием МНС.

**[0167]** В некоторых вариантах осуществления, ТАС, описанный в настоящем описании, представляет собой DARPIn против HER-2-три-ТАС (также обозначенный как конфигурация 1; SEQ ID NO: 1 и 2), включает, в следующем порядке:

- i) лидерную последовательность против HER-2-три-ТАС (сигнал секреции) (SEQ ID NO: 5 и 6)
- ii) DARPIn, специфический для антигена HER-2 (SEQ ID NO: 7 и 8)
- iii) метку Мус (SEQ ID NO: 9 и 10)
- iv) Соединитель (SEQ ID NO: 11 и 12)
- v) UCNT1 (SEQ ID NO: 13 и 14)
- vi) Линкер (SEQ ID NO: 15 и 16)
- vii) CD4 (SEQ ID NO: 17 и 18).

**[0168]** В некоторых вариантах осуществления, ТАС, описанный в настоящем описании, представляет собой HER2-ТАС. В некоторых вариантах осуществления, HER2-ТАС содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления, HER2-ТАС содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления, HER2-ТАС содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления, HER2-ТАС содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления, HER2-ТАС содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления, HER2-ТАС содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления, HER2-ТАС содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 65.

**[0169]** В некоторых вариантах осуществления, HER2-ТАС содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность







SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 63.

[0177] В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 64.

#### **Полипептиды и векторные конструкции**

[0178] В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к полипептидам, кодируемым посредством последовательности нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании. Настоящее изобретение относится также к векторам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, векторы дополнительно содержат промотор. В некоторых вариантах осуществления, промотор является функциональным в клетке млекопитающего. Промоторы, области ДНК, инициирующие транскрипцию конкретной последовательности нуклеиновой кислоты, хорошо известны в данной области. «Промотор, функциональный в клетке млекопитающего», относится к промотору, управляющему экспрессией ассоциированной последовательности нуклеиновой кислоты в клетке млекопитающего. Промотор, управляющий экспрессией последовательности нуклеиновой кислоты, обозначают как являющийся «функционально связанным» с последовательностью нуклеиновой кислоты.

[0179] Множество векторов для доставки и экспрессирующих векторов используют для введения нуклеиновых кислот, описанных в настоящем описании, в клетку.

[0180] В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, содержащимся в векторе, для получения векторной конструкции,

также обозначенной в настоящем описании как вектор. В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание относится к вектору, содержащему:

- a. первый полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд;
- b. второй полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR;
- c. третий полинуклеотид, кодирующий полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора; и
- d. промотор, который является функциональным в клетке млекопитающего.

**[0181]** В некоторых вариантах осуществления, мишенью специфического для мишени лиганда является HER-2, BCMA или CD19. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой DARPIn, избирательно связывающий антиген HER-2 (erbB-2). В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой DARPIn, специфически связывающий антиген HER-2 (erbB-2). В некоторых вариантах осуществления, DARPIn, нацеленный на HER-2 (erb-2), содержит SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой scFv, избирательно связывающий BCMA. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой scFv, специфически связывающий BCMA. В некоторых вариантах осуществления, scFv, связывающий BCMA, содержит SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой scFv, избирательно связывающий CD19. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой scFv, специфически связывающий CD19. В некоторых вариантах осуществления, scFv, связывающий CD19, содержит SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36.

**[0182]** В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой UCNT1, гуманизированный UCNT1 (huUCNT1), ОКТ3, F6A или L2K. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой UCNT1 или его вариант. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой UCNT1 и кодирован посредством SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой UCNT1 и содержит SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCNT1, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, имеет мутацию Y182T (UCNT1 (Y182T)) и кодирован посредством SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой UCNT1 (Y182T) и содержит SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой гуманизированный UCNT1 (huUCNT1), или его вариант. В некоторых

вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой гуманизированный UCNT1 (huUCNT1) и кодирован посредством SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой huUCNT1 и содержит SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCNT1, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, имеет мутацию Y177T (huUCNT1 (Y177T)) и кодирован посредством SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой huUCNT1 (Y177T) и содержит SEQ ID NO: 46.

**[0183]** В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой OKT3, или его вариант. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой OKT3 и кодирован посредством SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой OKT3 и содержит SEQ ID NO: 22.

**[0184]** В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой F6A или его вариант. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой F6A и кодирован посредством SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой F6A и содержит SEQ ID NO: 24.

**[0185]** В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой L2K или его вариант. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой L2K и кодирован посредством SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой L2K и содержит SEQ ID NO: 26.

**[0186]** В некоторых вариантах осуществления, белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой CD3. В некоторых вариантах осуществления, белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой CD3ε.

**[0187]** В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена TCR содержит трансмембранный домен и/или цитозольный домен корцептора TCR. В некоторых вариантах осуществления, корцептор TCR представляет собой CD4, CD8, LAG3 или его химерный вариант.

**[0188]** В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид и третий полинуклеотид слиты с вторым полинуклеотидом, и кодирующая последовательность является функционально связанной с промотором. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид и третий полинуклеотид слиты с первым полинуклеотидом, и кодирующая последовательность является функционально связанной с промотором. В некоторых вариантах осуществления, вектор сконструирован для экспрессии в клетках

млекопитающих, таких как Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор.

**[0189]** В некоторых вариантах осуществления, векторы, которые можно использовать, включают векторы, происходящие из лентивирусов, вирусов мышинных стволовых клеток (MSCV), поксвирусов, онкоретровирусов, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов. Другие векторы для доставки, которые можно использовать, включают векторы, происходящие из вирусов простого герпеса, транспозонов, вирусов осповакцины, вируса папилломы человека, вирусов иммунодефицита обезьян, HTLV, пенистого вируса человека и их вариантов. Дополнительные векторы, которые можно использовать, включают векторы, происходящие из спумавирусов, ретровирусов млекопитающих типа В, ретровирусов млекопитающих типа С, ретровирусов птиц типа С, ретровирусов млекопитающих типа D и ретровирусов типа HTLV/BLV. Одним примером лентивирусного вектора, который можно использовать в описанных композициях и способах, является вектор рCCL4.

**[0190]** В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота представляет собой рекомбинантную, или сконструированную, нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления, первый, второй и/или третий полинуклеотиды представляют собой рекомбинантные, или сконструированные, полинуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды, описанные в настоящем описании, подлежат модификации или мутагенезу для оптимизации функции кодированного полипептида и/или функции, активности и/или экспрессии связывающего Т-клетку с антигеном агента. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота кодирует полипептид.

**[0191]** В некоторых вариантах осуществления, модификации вносят в полинуклеотидные последовательности, включая векторные последовательности и полипептидные последовательности, описанные в настоящем описании. Модификации включают замены, вставку или делецию нуклеотидов или аминокислот, или изменение относительных положений или порядка нуклеотидов или аминокислот.

#### **Экспрессия в Т-клетках**

**[0192]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к модифицированным Т-клеткам, содержащим последовательности нуклеиновой кислоты, описанные в настоящем описании, или векторы, описанные в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к Т-клеткам человека, модифицированным для экспрессии три-ТАС, описанного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетка экспрессирует три-ТАС, описанный в настоящем описании. Кроме того, настоящее изобретение относится к Т-клеткам, трансдуцированным или трансфицированным с использованием связывающего Т-клетку с антигеном агента или вектора, содержащего три-ТАС. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетка представляет собой выделенную Т-клетку.

**[0193]** В некоторых вариантах осуществления, для Т-клеток человека,

модифицированных для экспрессии три-ТАС, показана функциональность, эквивалентная общепринятому CAR *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления, для Т-клеток, модифицированных с использованием три-ТАС, показана функциональность, превосходящая общепринятый CAR *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к Т-клеткам человека, модифицированным с использованием три-ТАС, для которых показана улучшенная безопасность, по сравнению с традиционными CAR. В некоторых вариантах осуществления, для Т-клеток человека, модифицированных для экспрессии три-ТАС, показана улучшенная безопасность, по сравнению с традиционными CAR.

**[0194]** Т-клетки, в некоторых вариантах осуществления, получают из ряда источников, включая, но без ограничения, кровь (например, мононуклеарные клетки периферической крови), костный мозг, ткань тимуса, ткань лимфатического узла, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из участка инфекции, ткань селезенки или опухоли. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки представляют собой аутологичные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки получают из линии клеток из Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки получают от доноров (аллогенные Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки получают посредством дифференцировки эмбриональных стволовых клеток или стволовых клеток, или из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления, независимо от источника Т-клеток, Т-клетки модифицированы таким образом, чтобы в них отсутствовала экспрессия эндогенного TCR и/или временно или постоянно отсутствовала экспрессия молекул MHC/HLA (универсальные донорные Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки являются аутологичными по отношению к субъекту. В некоторых вариантах осуществления, клетки являются аллогенными, сингенными или ксеногенными по отношению к субъекту.

**[0195]** В некоторых вариантах осуществления, после получения, Т-клетки, необязательно, обогащают *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления, популяцию клеток обогащают посредством положительного или отрицательного отбора. Кроме того, Т-клетки, необязательно, замораживают или криоконсервируют и затем размораживают в более позднюю дату.

**[0196]** В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки активируют и/или размножают до или после введения три-ТАС в Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки размножают посредством контакта с поверхностью, к которой прикреплено средство, стимулирующее ассоциированный с CD3/комплексом TCR сигнал, и лиганд, стимулирующий костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки размножают посредством контакта с одним или несколькими растворимыми средствами, стимулирующими передачу сигналов CD3/комплекса TCR и передачу сигналов костимулирующей молекулы.

**[0197]** В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки трансдуцируют или

трансфицируют с использованием последовательностей нуклеиновой кислоты. Трансдуцированные или трансфицированные Т-клетки экспрессируют белки, кодированные трансфицированными или трансдуцированными последовательностями нуклеиновой кислоты. Нуклеиновую кислоту можно вводить в клетку посредством физических, химических или биологических способов. Физические способы включают, но без ограничения, микроинъекцию, электропорацию, бомбардировку частицам, липофекцию и преципитацию фосфатом кальция. Биологические способы включают использование ДНК- и РНК-векторов.

**[0198]** Вирусные векторы, включая ретровирусные векторы, используют для введения и экспрессии нуклеиновой кислоты в Т-клетке. Вирусные векторы включают векторы, происходящие из лентивируса, вирусов мышинных стволовых клеток (MSCV), поксвирусов, вируса простого герпеса I, аденовируса и аденоассоциированных вирусов. Вектор, необязательно, включает промотор, управляющий экспрессией трансдуцированной молекулы нуклеиновой кислоты в Т-клетке (например, промотор CMV, промотор eF1a или промотор MSCV).

**[0199]** Любой подходящий анализ используют для подтверждения присутствия и/или экспрессии трансдуцированной последовательности нуклеиновой кислоты, и/или полипептида, кодируемого посредством нуклеиновой кислоты, в Т-клетке. Анализы включают, но без ограничения, Саузерн- и Нозерн-блоттинг, RT-ПЦР и ПЦР, ELISA, Вестерн-блоттинг и проточную цитометрию.

**[0200]** Т-клетка, экспрессирующая ТАС, имеет увеличенную активацию Т-клетки в присутствии антигена, по сравнению с Т-клеткой, не экспрессирующей ТАС, и/или по сравнению с Т-клеткой, экспрессирующей традиционный CAR. Увеличенную активацию Т-клетки устанавливают многочисленными способами, включая, но без ограничения, увеличенное уничтожение линии клеток опухоли, увеличенную продукцию цитокинов, увеличенный цитолиз, увеличенную дегрануляцию и/или увеличенную экспрессию маркеров активации, таких как CD107a, IFN $\gamma$ , IL2 или TNF $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления, увеличения измеряют в индивидуальной клетке или в популяции клеток.

**[0201]** Термины «увеличенный» или «увеличение», в рамках изобретения, относятся к увеличению по меньшей мере на 1%, 2%, 5%, 10%, 25%, 50%, 100% или 200% в Т-клетке или популяции Т-клеток, экспрессирующей ТАС, по сравнению с Т-клеткой или популяцией Т-клеток, не экспрессирующей ТАС, и/или по сравнению с Т-клеткой или популяцией Т-клеток, экспрессирующей традиционный CAR.

#### **Фармацевтические композиции**

**[0202]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим сконструированную Т-клетку, описанную в настоящем описании (трансдуцированную с использованием ТАС и/или экспрессирующую ТАС), и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носители включают, но без ограничения, буферы, такие как нейтральный забуференный солевой 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 ЭДТА или глутатион; адьюванты (например, гидроксид алюминия); или консерванты. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные Т-клетки составляют для внутривенного введения.

**[0203]** Фармацевтические композиции вводят способом, подходящим для заболевания, подлежащего лечению (или предотвращению). Количество и частоту введения определяют посредством таких факторов, как состояние пациента, и тип и тяжесть заболевания пациента, хотя подходящие дозы определяют посредством клинических исследований. Когда указано «иммунологически эффективное количество», «противоопухолевое эффективное количество», «ингибирующее опухоль эффективное количество» или «терапевтическое количество», точное количество композиций по настоящему изобретению, подлежащее введению, определяет терапевт, с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе, размере опухоли, степени инфекции или метастазирования и состоянии пациента (субъекта).

**[0204]** В некоторых вариантах осуществления, модифицированные Т-клетки и/или фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, вводят в дозе  $10^1$ - $10^{15}$  клеток на кг массы тела,  $10^4$ - $10^9$  клеток на кг массы тела, необязательно,  $10^5$ - $10^8$  клеток на кг массы тела,  $10^6$ - $10^7$  клеток на кг массы тела или  $10^5$ - $10^6$  клеток на кг массы тела, включая все целые значения в пределах этих диапазонов. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные Т-клетки и/или фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, вводят в дозе более, чем  $10^1$  клеток на кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные Т-клетки и/или фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, вводят в дозе менее, чем  $10^{15}$  клеток на кг массы тела.

**[0205]** В некоторых вариантах осуществления, модифицированные Т-клетки и/или фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, вводят в дозе  $0,5 \times 10^6$  клеток,  $2 \times 10^6$  клеток,  $4 \times 10^6$  клеток,  $5 \times 10^6$  клеток,  $1,2 \times 10^7$  клеток,  $2 \times 10^7$  клеток,  $5 \times 10^7$  клеток,  $2 \times 10^8$  клеток,  $5 \times 10^8$  клеток,  $2 \times 10^9$  клеток,  $0,5$ - $2000 \times 10^6$  клеток,  $0,5$ - $2 \times 10^6$  клеток,  $0,5$ - $2 \times 10^7$  клеток,  $0,5$ - $2 \times 10^8$  клеток или  $0,5$ - $2 \times 10^9$  клеток, включая все целые значения в пределах этих диапазонов.

**[0206]** В некоторых вариантах осуществления, композиции Т-клеток вводят множество раз в этих дозах. В некоторых вариантах осуществления, дозу вводят один раз или множество раз, например, ежедневно, еженедельно, раз в две недели или ежемесячно, один раз в час, или вводят при обострении, рецидиве или прогрессировании злокачественной опухоли, подвергаемой лечению. Клетки, в некоторых вариантах осуществления, вводят с использованием способов инфузии, общеизвестных в иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988).

**[0207]** Фармацевтическая композиция является в основном свободной от, например, не содержит поддающихся детекции уровней контаминанта, например,

выбранного из группы, состоящей из эндотоксина, микоплазмы, компетентного по репликации лентивируса (RCL), p24, нуклеиновой кислоты VSV-G, gag HIV, остаточных покрытых антителами против CD3/против CD28 бусин, мышинных антител, пулированной человеческой сыворотки, бычьего сывороточного альбумина, бычьей сыворотки, компонентов культуральной среды, компонентов упаковывающей вектор клетки или плазмиды, бактерии, гриба, микоплазмы, IL-2 и IL-7.

**[0208]** В некоторых вариантах осуществления, модифицированные Т-клетки, описанные в настоящем описании, вводят субъекту, и затем отбирают кровь (или проводят аферез), Т-клетки оттуда активируют и повторно вводят посредством инфузии пациенту с модифицированными Т-клетками. Этот процесс, в некоторых вариантах осуществления, проводят множество раз каждые несколько недель. Т-клетки активируют из отборов крови от 10 см<sup>3</sup> до 400 см<sup>3</sup>. Т-клетки активируют из отборов крови 20 см<sup>3</sup>, 30 см<sup>3</sup>, 40 см<sup>3</sup>, 50 см<sup>3</sup>, 60 см<sup>3</sup>, 70 см<sup>3</sup>, 80 см<sup>3</sup>, 90 см<sup>3</sup> или 100 см<sup>3</sup>.

**[0209]** Модифицированные/сконструированные Т-клетки и/или фармацевтические композиции вводят способами, включающими, но без ограничения, аэрозольную ингаляцию, инъекцию, инфузию, проглатывание, трансфузию, имплантацию или трансплантацию. Модифицированные Т-клетки и/или фармацевтические композиции вводят субъекту трансартериально, подкожно, внутрикожно, внутрь опухоли, внутрь узлов, интрамедуллярно, внутримышечно, посредством внутривенной (i.v.) инъекции, посредством внутривенной (i.v.) инфузии или внутрибрюшинно. Модифицированные/сконструированные Т-клетки и/или их фармацевтические композиции вводят пациенту посредством внутрикожной или подкожной инъекции. Модифицированные/сконструированные Т-клетки и/или их фармацевтические композиции вводят посредством i.v. инъекции. Модифицированные/сконструированные Т-клетки и/или их фармацевтические композиции инъекцируют непосредственно в опухоль, лимфатический узел или участок инфекции.

**[0210]** Модифицированные/сконструированные Т-клетки и/или фармацевтические композиции вводят в объеме приблизительно 5 мл, 10 мл, 15 мл, 20 мл, 25 мл, 30 мл, 35 мл, 40 мл, 45 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл, 110 мл, 120 мл, 130 мл, 140 мл, 150 мл, 200 мл, 300 мл, 400 мл или 500 мл.

**[0211]** Модифицированные/сконструированные Т-клетки и/или фармацевтические композиции вводят в объеме более чем максимум приблизительно 5 мл, 10 мл, 15 мл, 20 мл, 25 мл, 30 мл, 35 мл, 40 мл, 45 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл, 110 мл, 120 мл, 130 мл, 140 мл, 150 мл, 200 мл, 300 мл, 400 мл или 500 мл.

**[0212]** Модифицированные/сконструированные Т-клетки и/или фармацевтические композиции вводят в объеме по меньшей мере приблизительно 5 мл, 10 мл, 15 мл, 20 мл, 25 мл, 30 мл, 35 мл, 40 мл, 45 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл, 110 мл, 120 мл, 130 мл, 140 мл, 150 мл, 200 мл, 300 мл, 400 мл или 500 мл.

**[0213]** Фармацевтическую композицию получают известными по существу способами получения фармацевтически приемлемых композиций, которые вводят

субъектам, таким образом, что эффективное количество Т-клеток объединяют в смеси с фармацевтически приемлемым носителем. Пригодные носители описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, 20<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA, 2000). На этой основе, композиции включают, но не исключительно, растворы веществ в ассоциации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, и содержащиеся в забуференных растворах с подходящим рН и осмоотических с физиологическими жидкостями.

**[0214]** Пригодные фармацевтически приемлемые носители включают по существу химически инертные и нетоксичные композиции, которые не создают помех для эффективности биологической активности фармацевтической композиции. Примеры пригодных фармацевтических носителей включают, но без ограничения, воду, солевые растворы, растворы глицерина, хлорид N-(1(2,3-диолеилокси)пропил)N, N,N-триметиламмония (DOTMA), диолеилфосфатидилхолинэтанолламин (DOPE) и липосомы. В некоторых вариантах осуществления, такие композиции содержат терапевтически эффективное количество соединения, вместе с подходящим количеством носителя, таким образом, чтобы обеспечивать форму для прямого введения пациенту.

**[0215]** Фармацевтические композиции включают, без ограничения, лиофилизированные порошки или водные или неводные стерильные пригодные для инъекции растворы или суспензии, которые могут дополнительно содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатики и растворенные вещества, которые делают композиции по существу совместимыми с тканями или кровью назначенного реципиента. Другие компоненты, которые могут присутствовать в таких композициях, включают, например, воду, поверхностно-активные вещества (такие как Tween), спирты, полиолы, глицерин и растительные масла. Растворы и суспензии для немедленной инъекции можно получать из стерильных порошков, гранул, таблеток или концентрированных растворов или суспензий.

**[0216]** Фармацевтическую композицию, описанную в настоящем описании, составляют во множестве форм и вводят посредством ряда различных способов. Фармацевтический состав вводят перорально, ректально или парентерально, в составах, содержащих общепринятые носители, адъюванты и связующие, как желательно. Термин «парентерально», в рамках изобретения, включает способы подкожной, внутривенной, внутримышечной или интратеральной инъекции и инфузии. Введение включает инъекцию или инфузию, включая внутриартериальное, интракардиальное, интрацеребровентрикулярное, внутривожное, интрадуоденальное, интрамедуллярное, внутримышечное, внутрикостное, внутрибрюшинное, интратекальное, внутрисосудистое, внутривенное введение, введение в стекловидное тело, эпидуральное и подкожное введение), ингаляционное, чрескожное, трансмукозальное, подъязычное, буккальное и местное (включая накожное, кожное введение, введение посредством клизмы, глазных капель, ушных капель, интраназальное, вагинальное) введение. В некоторых

иллюстративных вариантах осуществления, способ введения осуществляют посредством инъекции, такой как внутримышечная, внутривенная, подкожная или внутривентрикулярная инъекция.

**[0217]** Жидкие составы включают пероральный состав, внутривенный состав, интраназальный состав, глазной состав, ушной состав, аэрозоль и т.п. В конкретных вариантах осуществления, вводят комбинацию различных составов. В конкретных вариантах осуществления, композицию составляют для профиля замедленного высвобождения.

#### **Способы лечения и использования**

**[0218]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам использования три-ТАС, описанных в настоящем описании, в лечении злокачественной опухоли у нуждающегося в этом индивидуума. В некоторых вариантах осуществления, специфические для мишени лиганды из ТАС, описанных в настоящем описании, связываются с антигеном опухоли или опухолеассоциированным антигеном на клетке опухоли. В некоторых вариантах осуществления, специфические для мишени лиганды из ТАС, описанных в настоящем описании, избирательно связываются с антигеном опухоли или опухолеассоциированным антигеном на клетке опухоли. В некоторых вариантах осуществления, специфические для мишени лиганды из ТАС, описанных в настоящем описании, специфически связываются с антигеном опухоли или опухолеассоциированным антигеном на клетке опухоли. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген опухоли. Примеры антигенов опухолей включают, но без ограничения, CD19, HER-2 (erbB-2), антиген созревания В-клеток (BCMA), альфафетопротеин (AFP), карциноэмбриональный антиген (CEA), CA-125, MUC-1, эпителиальный антиген опухоли (ETA), тирозиназу, ассоциированный с меланомой антиген (MAGE), простатспецифический антиген (PSA), ассоциированный с глиомой антиген,  $\beta$ -субъединицу хорионического гонадотропина человека, тиреоглобулин, RAGE-1, MN-CA IX, обратную транскриптазу теломеразы человека, RU1, RU2 (AS), карбоксилэстеразу кишечника, mut hsp70-2, M-CSF, простазу, PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, простеин, PSMA, сурвивин и теломеразу, антиген-1 опухоли карциномы предстательной железы (PCTA-1), ELF2M, эластазу нейтрофилов, CD22, инсулиновый фактор роста (IGF)-I, IGF-II, рецептор IGF-I и мезотелин.

**[0219]** В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли, экспрессирующей антиген-мишень, у нуждающегося в этом индивидуума, включающим введение индивидууму модифицированных Т-клеток, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой CD19. В некоторых вариантах осуществления, способ лечения злокачественной опухоли, экспрессирующей CD19, у нуждающегося в этом индивидуума включает введение индивидууму модифицированных Т-клеток, содержащих ТАС, содержащий нацеливающий на CD19 лиганд. В некоторых вариантах осуществления, примеры злокачественных опухолей, подвергаемых лечению

посредством ТАС, содержащего нацеливающий на CD19 лиганд, включают, но без ограничения, В-клеточные злокачественные новообразования. В некоторых вариантах осуществления, примеры злокачественных опухолей, подвергаемых лечению посредством ТАС, содержащего нацеливающий на CD19 лиганд, включают, но без ограничения, В-клеточные лимфомы, острый лимфобластный лейкоз (ALL) и хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL). В некоторых вариантах осуществления, примеры злокачественных опухолей, подвергаемых лечению посредством ТАС, содержащего нацеливающий на CD19 лиганд, включают, но без ограничения, неходжскинскую лимфому (NHL).

**[0220]** В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой HER-2. В некоторых вариантах осуществления, способ лечения злокачественной опухоли, где клетка злокачественной опухоли экспрессирует HER-2, у нуждающегося в этом индивидуума включает введение индивидууму модифицированных Т-клеток, содержащих ТАС, содержащий нацеливающий на HER-2 лиганд. В некоторых вариантах осуществления, примеры злокачественных опухолей, подвергаемых лечению посредством ТАС, содержащего нацеливающий на HER-2 лиганд, включают, но без ограничения, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак яичника и рак желудка.

**[0221]** В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, способ лечения злокачественной опухоли, где клетка злокачественной опухоли экспрессирует ВСМА, у нуждающегося в этом индивидуума включает введение индивидууму модифицированных Т-клеток, содержащих ТАС, содержащий нацеливающий на ВСМА лиганд. В некоторых вариантах осуществления, примеры злокачественных опухолей, подвергаемых лечению посредством ТАС, содержащего нацеливающий на ВСМА лиганд, включают, но без ограничения, лейкоз, лимфомы и множественную миелому.

**[0222]** Кроме того, настоящее изобретение относится к использованию модифицированной Т-клетки, описанной в настоящем описании, в получении лекарственного средства для лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом индивидуума. Настоящее изобретение относится также к использованию смеси Т-клеток, содержащей модифицированные и немодифицированные клетки, или, содержащей различные популяции модифицированных клеток в присутствии или в отсутствие немодифицированных клеток. Специалисту в данной области понятно, что терапевтическое количество модифицированных Т-клеток не должно иметь гомогенный характер.

**[0223]** В некоторых вариантах осуществления, модифицированные Т-клетки, описанные в настоящем описании, являются частью комбинированной терапии. В некоторых вариантах осуществления, эффективность терапии, описанной в настоящем описании, оценивают множество раз. В некоторых вариантах осуществления, пациентов стратифицируют на основании ответа на лечение, описанное в настоящем описании. В

некоторых вариантах осуществления, эффективность лечения определяет вход в исследование.

**[0224]** В некоторых вариантах осуществления, злокачественные опухоли, подвергаемые лечению с использованием модифицированных Т-клеток, содержащих любой из ТАС, описанных в настоящем описании, включают любую форму неопластического заболевания. В некоторых вариантах осуществления, примеры злокачественных опухолей, подвергаемых лечению, включают, но без ограничения, рак молочной железы, рак легкого и лейкоз, например, лейкоз смешанного происхождения (MLL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) острый лимфобластный лейкоз (ALL). В некоторых вариантах осуществления, примеры злокачественных опухолей, подвергаемых лечению, включают, но без ограничения, крупноклеточную В-клеточную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности или крупноклеточную В-клеточную лимфому, возникающую из фолликулярной лимфомы. Другие злокачественные опухоли включают карциномы, бластомы, меланомы, саркомы, гематологические злокачественные опухоли, лимфоидные злокачественные новообразования, доброкачественные и злокачественные опухоли, и злокачественные новообразования. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль включает не солидные опухоли или солидные опухоли. В некоторых вариантах осуществления, злокачественные опухоли, подвергаемые лечению, включают опухоли, которые не являются васкуляризированными, или еще не являются значительно васкуляризированными, так же как васкуляризированные опухоли. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой солидную злокачественную опухоль или содержит солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой жидкую злокачественную опухоль или содержит жидкую опухоль. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак легкого, рак молочной железы, рак ободочной кишки, множественную миелому, глиобластому, злокачественную опухоль желудочно-кишечного тракта, рак яичника, рак желудка, колоректальный рак, рак уротелия, рак эндометрия или меланому. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак легкого. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак ободочной кишки. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой глиобластому. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль желудочно-кишечного тракта. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак яичника. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак желудка. В некоторых вариантах

осуществления, злокачественная опухоль представляет собой колоректальный рак. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак уротелия. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак эндометрия. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой меланому.

**Таблица 1. Таблица последовательностей**

<b>SEQ ID NO</b>	<b>Описание</b>	<b>Нуклеотиды/аминокислоты</b>
SEQ ID NO: 1	Три-ТАС, конфигурация 1	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 2	Три-ТАС, конфигурация 1	Аминокислоты
SEQ ID NO: 3	Три-ТАС, конфигурация 2	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 4	Три-ТАС, конфигурация 2	Аминокислоты
SEQ ID NO: 5	Лидер mIgG (сигнал секреции)	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 6	Лидер mIgG (сигнал секреции)	Аминокислоты
SEQ ID NO: 7	DARPin, специфический для антигена Her2	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 8	DARPin, специфический для антигена Her2	Аминокислоты
SEQ ID NO: 9	Метка Мус	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 10	Метка Мус	Аминокислоты
SEQ ID NO: 11	Линкер 1	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 12	Линкер 1	Аминокислоты
SEQ ID NO: 13	UCHT1 <sup>1</sup>	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 14	UCHT1 <sup>2</sup>	Аминокислоты
SEQ ID NO: 15	Линкер 2	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 16	Линкер 2	Аминокислоты
SEQ ID NO: 17	Домен CD4 <sup>3</sup>	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 18	Домен CD4 <sup>4</sup>	Аминокислоты
SEQ ID NO: 19	Линкер на основе CD4	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 20	Линкер на основе CD4	Аминокислоты
SEQ ID NO: 21	ОКТ3	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 22	ОКТ3	Аминокислоты
SEQ ID NO: 23	F6A	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 24	F6A	Аминокислоты
SEQ ID NO: 25	L2K	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 26	L2K	Аминокислоты
SEQ ID NO: 27	Соединитель с короткой спиралью	Нуклеотиды

SEQ ID NO: 28	Соединитель с короткой спиралью	Аминокислоты
SEQ ID NO: 29	Соединитель с длинной спиралью	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 30	Соединитель с длинной спиралью	Аминокислоты
SEQ ID NO: 31	Соединитель с большим доменом	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 32	Соединитель с большим доменом	Аминокислоты
SEQ ID NO: 33	ScFv, специфический для антигена BCMA	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 34	ScFv, специфический для антигена BCMA	Аминокислоты
SEQ ID NO: 35	ScFv, специфический для антигена CD19	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 36	ScFv, специфический для антигена CD19	Аминокислоты
SEQ ID NO: 37	Домен CD8 $\alpha$	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 38	Домен CD8 $\alpha$	Аминокислоты
SEQ ID NO: 39	Домен CD8 $\alpha$ +R( $\beta$ )	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 40	Домен CD8 $\alpha$ +R( $\beta$ )	Аминокислоты
SEQ ID NO: 41	Домен CD8 $\alpha$ +Lck	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 42	Домен CD8 $\alpha$ +Lck	Аминокислоты
SEQ ID NO: 43	huUCHT1	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 44	huUCHT1	Аминокислоты
SEQ ID NO: 45	huUCHT1 (Y177T)	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 46	huUCHT1 (Y177T)	Аминокислоты
SEQ ID NO: 47	huIgG	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 48	huIgG	Аминокислоты
SEQ ID NO: 49	huCD8a	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 50	huCD8a	Аминокислоты
SEQ ID NO: 51	3625 scFv BCMA Vh-Vl	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 52	3625 scFv BCMA Vh-Vl	Аминокислоты
SEQ ID NO: 53	3625 scFv BCMA Vl-Vh	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 54	3625 scFv BCMA Vl-Vh	Аминокислоты
SEQ ID NO: 55	3625 TAC-спираль-Vh-Vl huUCHT1	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 56	3625 TAC-спираль-Vh-Vl huUCHT1	Аминокислоты
SEQ ID NO: 57	3625 TAC-спираль-Vl-Vh huUCHT1	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 58	3625 TAC-спираль-Vl-Vh huUCHT1	Аминокислоты
SEQ ID NO: 59	3625 TAC-G <sub>4</sub> S-Vh-Vl huUCHT1	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 60	3625 TAC-G <sub>4</sub> S-Vh-Vl huUCHT1	Аминокислоты
SEQ ID NO: 61	3625 TAC-G <sub>4</sub> S-VL-VH huUCHT1	Нуклеотиды

SEQ ID NO: 62	3625 TAC-G <sub>4</sub> S-VL-VH huUCHT1	Аминокислоты
SEQ ID NO: 63	CD19-TAC	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 64	CD19-TAC	Аминокислоты
SEQ ID NO: 65	huIgG Her2-TAC huUCHT1	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 66	huIgG Her2-TAC huUCHT1	Аминокислоты
SEQ ID NO: 67	CD8a Her2-TAC huUCHT1	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 68	CD8a Her2-TAC huUCHT1	Аминокислоты
SEQ ID NO: 69	Гибкий соединитель	Аминокислоты
SEQ ID NO: 70	Гибкий соединитель	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 71	UCHT1 (Y182T)	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 72	UCHT1 (Y182T)	Аминокислоты
SEQ ID NO: 73	Гибкий линкер G4S	Аминокислоты
SEQ ID NO: 74	Линкер G4S3	Аминокислоты
SEQ ID NO: 75	muIgG Her2-TAC huUCHT1	Нуклеотиды
SEQ ID NO: 76	muIgG Her2-TAC huUCHT1	Аминокислоты
SEQ ID NO: 77	Линкер G <sub>4</sub> S3	Нуклеотиды

<sup>1</sup> Легкая цепь, нуклеотиды 1-324; Линкер, нуклеотиды 325-387; Тяжелая цепь, нуклеотиды 388-750

<sup>2</sup> Легкая цепь, аминокислоты 1-108; Линкер, аминокислоты 109-128; Тяжелая цепь, аминокислоты 129-250

<sup>3</sup> Внеклеточный линкер, нуклеотиды 1-66; Трансмембранный домен, нуклеотиды 67-132; Цитозольный домен, нуклеотиды 133-254

<sup>4</sup> Внеклеточный линкер, аминокислоты 1-22; Трансмембранный домен, аминокислоты 23-44; Цитозольный домен, аминокислоты 45 84

### **ПРИМЕРЫ**

**[0225]** Следующие примеры приведены с целью иллюстрации различных вариантов осуществления изобретения и не предназначены для ограничения настоящего изобретения никаким образом. Настоящие примеры, вместе со способами, описанными в настоящем описании, являются в настоящее время репрезентативными для предпочтительных вариантов осуществления, являются иллюстративными и не предназначены для ограничения объема изобретения. Их изменения и другие применения, включенные в содержание изобретения, как определено посредством объема формулы изобретения, могут прийти на ум специалисту в данной области.

#### **Пример 1. Характеризация технологии три-TAC**

**[0226]** Обзор технологии три-TAC представлен на **фиг. 1А - фиг. 1С**.

**[0227]** На **фиг. 1А** показан пример активации CD8 Т-клетки на основе совместной сборки различных рецепторов и ассоциированных с ними белковых партнеров. Сначала,

главный комплекс гистосовместимости I представляет антиген (спираль). Это узнает комплекс Т-клеточного рецептора (TCR), способный связывать антиген. Комплекс TCR содержит несколько индивидуальных субъединиц. Домены  $\alpha/\beta$  являются способными взаимодействовать непосредственно с антигеном, представленным на МНС-I. Затем домены  $\alpha/\beta$  взаимодействуют с несколькими другими доменами ( $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  и  $\zeta$ ), все из которых участвуют в активации Т-клетки посредством различных внутриклеточных активирующих доменов. Комплекс TCR взаимодействует с МНС-I одновременно с корецептором CD8. Корецептор CD8 связывается с МНС-I независимым от антигена образом. CD8 взаимодействует непосредственно с Lck, протеинкиназой, важной для активации комплекса рецептора TCR. Взаимодействие CD8 и Lck также обеспечивает их ассоциацию с микродоменами липидных рафтов (частью мембраны), которые, согласно гипотезе, организуют и инкапсулируют другие соответствующие передающие сигналы группы (темные сферы). Затем более поздние стадии активации приводят к привлечению CD28. Если этот каскад взаимодействий возникает параллельно несколько раз, Т-клетки становятся активированными и способны проявлять свои цитотоксические эффекты.

**[0228]** На **фиг. 1В** представлен обзор химерных рецепторов антигенов (CAR). В CAR стараются воспроизводить комплексный механизм активации Т-клетки посредством объединения нескольких ключевых активирующих доменов, таких как CD3 $\zeta$  и CD28, в одной синтетически сконструированной молекуле. Затем CAR взаимодействует непосредственно с выбранным антигеном с использованием специфических связывающих доменов. На этой фигуре изображен белок с анкириновым повтором (DARPin). Считают, что несколько таких взаимодействий, возникающих параллельно, приводят к активации Т-клетки.

**[0229]** **Фиг. 1С** представляет собой обзор технологии три-ТАС, имитирующей природный процесс активации. Три-ТАС разработан для лучшего воспроизведения природной передачи сигналов посредством TCR, в то же время сохраняя нерестрицированное по МНС нацеливание. Активация Т-клетки происходит после связывания МНС посредством TCR и Т-клеточного корецептора (либо CD4, либо CD8), которые одновременно связываются с консервативными областями молекулы МНС. Корецепторы специфически локализованы внутри «липидных рафтов», микродоменов мембраны, которые являются особенно важными для формирования передающего сигналы комплекса TCR. В дополнение к обеспечению правильной локализации микродоменов активирующего комплекса TCR, эти корецепторы также связываются непосредственно с Lck, протеинкиназой, которая является критической для активации Т-клеток. Ни один из традиционных химерных рецепторов или бифункциональных белков не привлекает молекулы корецептора или Lck. Получена молекула, в которой трансмембранные и внутриклеточные области корецептора CD4, которые локализованы в липидном рафте и связывают Lck, соответственно, были слиты с одноцепочечным антителом, связывающим CD3 (UCHT1; SEQ ID NO: 13, 14 и его гомологи). Эта конструкция сконструирована для переноса молекулы CD3 и TCR в области липидных

рафтов и расположения Lck поблизости от TCR, сходным образом с природным связыванием МНС. Для нацеливания на этот рецептор, сконструированный анкириновый повтор (DARPin) связывали с химерой CD4-UCHT1 для получения трифункционального связывающего Т-клетку с антигеном средства (три-ТАС). В этом примере, DARPin являлся специфическим для протоонкогена, HER-2 (erbB-2).

**[0230]** Возможно множество конфигураций три-ТАС (**фиг. 2А** и **фиг. 2В**). В конфигурации 1 (**фиг. 2А**), антигенсвязывающий домен локализован на N-конце, соединенный со связывающим лиганд CD3 доменом и затем доменом корецептора. В конфигурации 2 (**фиг. 2В**) связывающий лиганд CD3 домен локализован на N-конце, соединенный с антигенсвязывающим доменом, который, в свою очередь, соединен с доменом рецептора.

**[0231]** Множество классов связывающих лиганд доменов можно включать в молекулу три-ТАС (**фиг. 3А - фиг. 3Д**). Примеры в настоящем описании иллюстрируют общую схему конфигурации 1 три-ТАС (**фиг. 3А**), три-ТАС, несущий специфический для HER-2 DARPin (**фиг. 3В**), три-ТАС, несущий специфический для CD19 scFv (**фиг. 3С**), и три-ТАС, несущий специфический для ВСМА scFv (**фиг. 3Д**).

**[0232]** **Фиг. 4А - фиг.4Д** иллюстрируют функциональность три-ТАС, несущего специфический для HER-2 DARPin. Т-клетки человека модифицировали для экспрессии либо три-ТАС, как описано в настоящем описании, либо общепринятого CAR с таким же DARPin. Определили, что, во всех аспектах, для Т-клеток, сконструированных с использованием три-ТАС, показана функциональность, по меньшей мере эквивалентная общепринятому CAR. Интересно, что, применительно к 2 параметрам (продукции TNF- $\alpha$  и мобилизации CD107a), наблюдали, что три-ТАС являлся более активным, чем общепринятый CAR, в некоторых условиях.

**[0233]** На **фиг. 4А** показана поверхностная экспрессия DARPin против HER-2-три-ТАС, по сравнению с DARPin против HER-2-CAR и контрольными Т-клетками. Химерные рецепторы детектировали посредством инкубации с рекомбинантным HER-2. DARPin против HER-2-три-ТАС хорошо экспрессировался на поверхности модифицированных Т-клеток. На **фиг. 4В** показан рост культур модифицированных Т-клеток. Т-клетки активировали с использованием Dynabeads против CD3/против CD28 и модифицировали с использованием лентивирусов, кодирующих три-ТАС, CAR или без рецептора (контроль). Через 2 недели, CAR- и контрольные культуры выращивали до сходных количеств в то время как три-ТАС-культуры росли немного более медленно. На **фиг. 4С** и **фиг. 4Д** показаны функциональные признаки модифицированных Т-клеток. Т-клетки, модифицированные для экспрессии три-ТАС или CAR, несущего HER-2 DARPin, стимулировали с использованием связанного с планшетом антигена. Т-клетки, модифицированные для экспрессии три-ТАС и CAR, могли осуществлять все измеренные функции (продукцию TNF- $\alpha$ , продукцию IFN- $\gamma$  и мобилизацию CD107a, **фиг. 3С** и **фиг. 3Д**). Для Т-клеток, модифицированных с использованием три-ТАС, показаны увеличенные частоты положительных по CD107a клеток после стимуляции, по сравнению

с Т-клетками, модифицированными с использованием CAR (**фиг. 3D**), что позволяет предполагать увеличенную цитотоксичность на основании отдельных клеток.

**[0234]** На **фиг. 6A - фиг.6J** представлены данные, подтверждающие важность как связывающего лиганд домена, так и связывающего UCNT1 CD3 домена для функциональности три-ТАС. Т-клетки были модифицированы с использованием полноразмерного три-ТАС, несущего HER-2 DARPIn (**фиг. 6G, фиг. 6H, фиг. 6I**, нижний ряд), варианта три-ТАС, лишённого DARPIn (**фиг. 6A, фиг. 6B, фиг. 6C**, верхний ряд), или варианта три-ТАС, лишённого UCNT1 (**фиг. 6D, фиг. 6E, фиг. 6F**, средний ряд). Все популяции модифицированных Т-клеток стимулировали с использованием положительных по HER-2 клеток опухолей. Т-клетки, модифицированные с использованием полноразмерного три-ТАС, могли продуцировать IFN-g, TNF- и IL-2 после стимуляции, в то время как для вариантов не удалось продуцировать какой-либо цитокин после стимуляции. Три популяции Т-клеток также культивировали совместно с клетками D2F2/E2 (экспрессирующими HER-2) или клетками D2F2 (отрицательными по HER-2) в соотношении эффектор: мишень 4:1 (**фиг. 6J**). Для Т-клеток, модифицированных с использованием полноразмерного три-ТАС, показано надежное уничтожение клеток D2F2/E2, но не уничтожение клеток D2F2. Для других вариантов три-ТАС, лишённых либо DARPIn, либо UCNT1, не показано уничтожения.

**[0235]** На **фиг. 7A - фиг. 7C** показаны результаты для мышей, подвергнутых лечению с использованием контрольного вектора (NGFR), DARPIn против HER-2 CAR или DARPIn против HER-2-три-ТАС. Использовали модель ксенотрансплантата на мышах. Клетки опухоли OVCAR-3 вводили мышам подкожно и позволяли расти, пока опухоли не достигали размера 100-200 мм<sup>3</sup>. На **фиг. 7A** показано относительное прогрессирование опухоли, нормализованное по размеру опухоли на сутки лечения. Модифицированные с использованием DARPIn против HER-2-три-ТАС Т-клетки вызывали быстрое уменьшение объема опухоли, контроль не оказывал эффекта, и клетки с CAR замедляли рост опухоли, и для них показано отсроченное уменьшение размера опухоли. **Фиг. 7B** иллюстрирует относительные изменения массы тела после инфузии Т-клеток. Как для контрольных, так и для модифицированных с использованием DARPIn против HER-2-три-ТАС клеток, не показано значимых изменений массы тела мышей после лечения. В отличие от этого, для мышей после лечения DARPIn против HER-2 CAR показана значимая потеря массы тела, показательная для тяжелой токсичности. **Фиг. 7C** иллюстрирует концентрации цитокинов в сыворотке мышей на сутки 7 после инфузии Т-клеток. Уровни цитокинов были выше у мышей после лечения CAR, по сравнению с мышами после лечения три-ТАС.

### **Пример 2. Замены UCNT1 влияют на функцию три-ТАС**

**[0236]** **Фиг. 8A-фиг. 8H** иллюстрируют функциональность три-ТАС, несущих альтернативные связывающие CD3 домены. Домены перечислены на **фиг. 8A** и **фиг. 8E**. Для три-ТАС, содержащих UCNT1 (**фиг. 8B**), ОКТ3 (**фиг. 8B**) и huUCNT1 (**фиг. 8F**), показана высокая поверхностная экспрессия, в то время как для три-ТАС, содержащих

F6A (**фиг. 8F**) и L2K (**фиг. 8F**), выявлена более низкая поверхностная экспрессия. Для клеток, экспрессирующих три-ТАС, содержащий ОКТЗ, показана низкая продукция цитокинов (**фиг. 8С, фиг. 8С1**) и промежуточная цитотоксичность (**фиг. 8D**) после связывания три-ТАС. Для клеток, экспрессирующих три-ТАС, содержащий F6A, показана сильная продукция цитокинов (**фиг. 8G, фиг. 8G1**) и цитотоксичность (**фиг. 8H**) после связывания три-ТАС. Для клеток, экспрессирующих три-ТАС, содержащий L2K, показана низкая продукция цитокинов (**фиг. 8G, фиг. 8G1**) и промежуточная цитотоксичность (**фиг. 8H**).

[0237] **Фиг. 9А - фиг. 9H** иллюстрирует поверхностную экспрессию TCR на Т-клетках, модифицированных с использованием различных вариантов три-ТАС, показанных на **фиг. 8А** и **фиг. 8Е**. Для Т-клеток, модифицированных с использованием вариантов три-ТАС, содержащих ОКТЗ (**фиг. 9А, фиг. 9Е** и **фиг. 9В, фиг. 9F**) или L2K (**фиг. 9С, фиг. 9G** и **Фиг 9D, фиг. 9H**), показана более низкая поверхностная экспрессия TCR, по сравнению с Т-клетками, модифицированными с использованием три-ТАС, содержащих UCNT1 или huUCNT1, соответственно. В отличие от этого, для Т-клеток, модифицированных с использованием варианта три-ТАС, содержащего F6A, не выявлена понижающая регуляция TCR, по сравнению с три-ТАС, несущим huUCNT1 (**фиг. 9С, фиг. 9G** и **фиг. 9D, фиг. 9H**). Замена F6A уменьшала поверхностную экспрессию рецептора три-ТАС, в то же время сохраняя умеренную продукцию цитокинов и цитотоксичность. Замена L2K умеренно уменьшала поверхностную экспрессию и уменьшала продукцию цитокинов, но сохраняла промежуточную цитотоксичность. Замена ОКТЗ приводила к высокой поверхностной экспрессии три-ТАС, низкой продукции цитокинов и промежуточной цитотоксичности. Эти данные показывают, что поверхностной экспрессии три-ТАС и эффекторным функциям Т-клетки не свойственна пропорциональность, и что замены доменов три-ТАС, в некоторых случаях, изменяют эффекторные функции, независимо от уровней поверхностной экспрессии. Можно предположить, что вариант ТАС с уменьшенной цитотоксичностью и низкой поверхностной экспрессией может являться полезным в конкретных клинических применениях.

[0238] Во многих случаях, замены scFv уменьшают способность модифицированной Т-клетки вырабатывать IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-2, где модифицированные Т-клетки еще сохраняют способность уничтожать клетки-мишени. Избыточная продукция цитокинов ассоциирована с неблагоприятными событиями в клинических условиях, ограничивая современные технологии CAR опасными заболеваниями. Возможность модификации молекул ТАС для уменьшения для них продукции цитокинов, в то же время с сохранением умеренной цитотоксичности, может позволять получение рецепторов три-ТАС с точным уровнем реакционной способности, необходимой для удовлетворения клинической эффективности и безопасности.

[0239] Способность варианта три-ТАС, содержащего ОКТЗ, супрессировать поверхностную экспрессию TCR и продукцию цитокинов, в то же время с сохранением

цитотоксичности, может являться очень полезной в аллогенных ситуациях, когда супрессия TCR может супрессировать реакцию трансплантат против хозяина.

[0240] Эти данные показывают, что замены scFv UCNT1 влияют на функцию три-ТАС. Дополнительные модификации могут приводить к получению три-ТАС, которые можно использовать в различных применениях (например, для онкологии, аутоиммунитета, аллергии).

**Пример 3. Введение различных линкеров, соединяющих лиганд, связывающий комплекс TCR, с доменом связывающего мишень лиганда**

[0241] Фиг. 10А-фиг. 10В иллюстрируют несколько вариантов ТАС с различными линкерами, соединяющими лиганд, связывающий комплекс TCR, и домен связывающего мишень лиганда. Гибкий соединитель позволяет движение между двумя доменами. Соединитель с большим доменом содержит два свернутых домена и является очень большим и жестким. Соединители с короткой и длинной спиралью также вводят жесткость, но являются менее ограничивающими, по сравнению с линкером с большим доменом.

[0242] Фиг. 11А - фиг.11Е иллюстрируют влияние замены соединителя на поверхностную экспрессию три-ТАС, эффективность трансдукции три-ТАС, и продукцию цитокинов после связывания три-ТАС. На фиг. 11А и фиг. 11В показано, что спиральные линкеры увеличивают поверхностную экспрессию и эффективность трансдукции, по сравнению с гибким линкером, в то время как соединитель с большим доменом улучшает эффективность трансдукции, но не поверхностную экспрессию. Фиг. 11D, фиг. 11Е иллюстрирует продукцию цитокинов для клеток, экспрессирующих три-ТАС с соединителями с короткой спиралью, с длинной спиралью, или с большим доменом.

[0243] Фиг. 12А иллюстрирует увеличенную цитотоксичность *in vitro* Т-клеток, экспрессирующих три-ТАС с соединителем с короткой спиралью. Фиг. 12В иллюстрирует усиленный контроль опухоли *in vivo* для Т-клеток, экспрессирующих три-ТАС с соединителем с короткой спиралью. Соединитель с короткой спиралью был ассоциирован с высокой цитотоксичностью *in vitro* и эффективным контролем опухоли *in vivo*.

**Пример 4. Введение цитозольного домена CD8 $\alpha$ / $\beta$**

[0244] Фиг. 13А иллюстрирует поверхностную экспрессию CD8 $\alpha$ -три-ТАС в паре с scFv против HER-2, или фиг. 13С - с DARPIn против HER-2. Фиг. 13В иллюстрирует продукцию цитокинов Т-клетками, экспрессирующими CD8 $\alpha$  три-ТАС, в паре с scFv против HER-2 или DARPIn против HER-2.

[0245] Фиг. 14А иллюстрирует мономер CD4 три-ТАС и гетеродимер CD8 $\alpha$ / $\beta$ . Корцепторы TCR, как CD4, так и CD8, несут функциональные домены, важные для функциональности корцептора. Эти области включают богатые аргинином области, согласно гипотезе, важные для ассоциации с липидным рафтом, и мотив CXCP, необходимый для связывания Lck. В отличие от CD4, который представляет собой мономер, корцептор CD8 представляет собой гетеродимер, состоящий из субъединиц  $\alpha$  и  $\beta$  (фиг. 14А). Обе субъединицы  $\alpha$  и  $\beta$  CD8 содержат богатые аргинином области, но

только субъединица  $\alpha$  содержит мотив СХСР.

[0246] На **фиг. 14В-фиг. 14D** представлены схемы вариантов три-ТАС, включающих элементы из корцептора CD8, показанные на **фиг. 14А**. Цистеин, ответственный за димеризацию CD8 $\alpha$  и CD8 $\beta$ , заменен на аланин во всех вариантах CD8-три-ТАС. **Фиг. 14В** представляет собой схему CD8 $\alpha$  три-ТАС, содержащего мутацию цистеина до серина, для обеспечения распространения мономерного рецептора, и цитозольный домен CD8 $\alpha$ . **Фиг. 14С** представляет собой схему CD8 $\alpha$ +R $\beta$  три-ТАС, содержащего мутацию цистеина до серина, для обеспечения распространения мономерного рецептора, и химерный цитозольный домен CD8 $\alpha$ , где богатая аргинином область CD8 $\alpha$  заменена на богатую аргинином область CD8 $\beta$ . **Фиг. 14D** представляет собой схему CD8 $\beta$ +Lck-три-ТАС, содержащего мутацию цистеина до серина, для обеспечения распространения мономерного рецептора, и химерный цитозольный домен CD8 $\beta$ , где домен СХСР CD8 $\alpha$ , содержащий связывающий Lck мотив, добавлен к С-концу цитозольного домена CD8 $\beta$ .

[0247] **Фиг. 15А - фиг. 15D** иллюстрируют различные фенотипические и функциональные признаки вариантов три-ТАС на основе CD8, по сравнению с прототипическим три-ТАС. **Фиг. 15А - фиг. 15В** иллюстрируют поверхностную экспрессию вариантов CD8-три-ТАС, по сравнению с прототипическим три-ТАС. Поверхностная экспрессия являлась сравнимой среди различных три-ТАС. **Фиг. 15С** иллюстрирует цитотоксичность *in vitro* вариантов CD8-три-ТАС при совместном культивировании с LOX IMVI (отрицательными по HER-2) и A549, SKOV3, SKBR3 или MVA MB 231 (все являются положительными по HER-2). Для всех Т-клеток, модифицированных с использованием три-ТАС, показана цитотоксичность. **Фиг. 15D** иллюстрирует деление клеток для Т-клеток, модифицированных с использованием либо вариантов CD8-три-ТАС, либо прототипического три-ТАС (**фиг. 15D**). **Фиг. 15Е** иллюстрирует поверхностную экспрессию TCR для модифицированных Т-клеток, содержащих варианты CD8-три-ТАС или прототипический три-ТАС. Все варианты три-ТАС оказывали сходный эффект на экспрессию TCR. В то время как для корцептора CD4 показана хорошая поверхностная экспрессия и функциональность, как с scFv, так и с DARPIn против HER-2, для конструкции CD8 $\alpha$  показана активность только в контексте антигенсвязывающего домена DARPIn. При тестировании различных цитозольных доменов CD8 $\alpha$ , все конфигурации имели ключевые атрибуты последовательности, ассоциированные с функциональностью корцептора, (богатую аргинином область и СХСР). Для всех конструкций CD8 $\alpha$ / $\beta$  показана сходная активность, при сравнении с прототипом CD4. Это подчеркивает, что сохранение специфических биохимических свойств, таких как аффинность для липидного рафта и связывание Lck, является более важным для определения активности три-ТАС, чем конкретная последовательность цитозольного полипептида.

[0248] Рост Т-клеток, модифицированных с использованием CD8 $\alpha$ +R( $\beta$ )- и CD8 $\beta$ +Lck-три-ТАС, являлся значимо ослабленным, по сравнению с ростом Т-клеток,

модифицированных с использованием других вариантов. Несмотря на значительное влияние на рост, для всех этих три-ТАС показана сравнимая способность к активации Т-клеток. Уменьшенный рост для CD8 $\alpha$ +R( $\beta$ )- и CD8 $\beta$ +Lck-три-ТАС может обеспечивать преимущества для конкретного применения, где максимальное размножение Т-клеток не является желательным.

### **Пример 5. Разработка конструкции CD19-ТАС**

**[0249]** Фиг. 16 иллюстрирует ступенчатую разработку конструкции CD19-ТАС. Получают несколько поколений лентивирусных векторов с различными изменениями в дизайне элементов для обеспечения специфичности для CD19, надлежащей экспрессии ТАС и продукции лентивируса квалификации GMP. Каждая рамка представляет лентивирусный вектор и определяет 3 главных элемента дизайна: (А) антигенсвязывающий домен, (В) TCR/CD3-связывающий домен, и (С) домен корцептора. Затемненные области указывают домены, являвшиеся объектом модификации в ходе процесса разработки вектора.

**[0250]** ТАС на первой стадии содержит специфический для HER-2 сконструированный с анкириновым повтором белок (DARPin), мышинный UCNT1, специфический для CD3 scFv, и гибкий трансмембранный и цитозольный полипептид CD4. ТАС клонируют в лентивирусный вектор pCCL4.

**[0251]** Для получения специфического для CD19 три-ТАС, специфический для HER-2 DARPin заменяли полипептидом, содержащим N-концевой лидерный пептид CD8a, слитый с scFv против CD19. Тяжелые и легкие цепи CD19 scFv были соединены посредством глицин-сериновой линкерной области.

**[0252]** Домен UCNT1 заменяли гуманизированным вариантом (huUCNT1) для уменьшения иммуногенности. Для этой конструкции ТАС показаны уровни поверхностной экспрессии, превосходящие ее предшественника.

**[0253]** Для дальнейшего улучшения экспрессии рецептора на клеточной поверхности Т-клеток без нарушения функциональности, две отдельные модификации оценивали параллельно. Для увеличения стабилизации одиночной цепи, линкер G<sub>4</sub>S (SEQ ID NO: 73), использованный в scFv против CD19, заменяли на более структурированный линкер Уитлоу. Отдельно, мутацию Y177T вводили в домен huUCNT1. Оба способа увеличивали экспрессию рецептора ТАС, и рецептор получали с использованием как линкера Уитлоу, так и мутации Y177T.

**[0254]** Фиг. 17 иллюстрирует вставку CD19-ТАС в лентивирусный вектор pCCL. Вектор pCCL характеризуется двунаправленной промоторной системой с  $\Delta$ NGFR(hu) под контролем промотора mCMV и экспрессией ТАС, управляемой промотором EF-1 $\alpha$ .  $\Delta$ NGFR(hu) представляет собой укороченный CD271 человека (член 16 суперсемейства рецептора фактора некроза опухоли), с трансмембранным доменом, но лишенный цитозольного передающего сигналы домена. Продукт экспрессии  $\Delta$ NGFR(hu) используют для количественной оценки лентивирусной трансдукции. Открытая рамка считывания CD19-ТАС#921 увеличена, чтобы показать ключевые элементы конструкции ТАС: лидер

CD8 $\alpha$ , одиночную цепь FMC63 (scFv против CD19), метку с-Мус человека, huUCHT1 (Y177T) и домен  $\Delta$ CD4. Мутация huUCHT1 (Y177T) была идентифицирована посредством проверки точечных мутаций, случайным образом введенных в остатки поверхности связывания мышиного UCHT1 - CD3-эпсилон. При скрининге успешно идентифицирована мутация (Y177T). Мутация (Y177T) приводит к лучшей поверхностной экспрессии три-ТАС, в то же время сохраняя активацию Т-клетки.  $\Delta$ CD4 лишен четырех внеклеточных подобных иммуноглобулину доменов CD4 и сохраняет внеклеточный линкер, трансмембранный и цитозольный домены.

[0255] Для получения лентивирусного вектора квалификации GMP, конструкцию CD19-три-ТАС клонировали в новый лентивирусный вектор под контролем промотора MSCV. Конструкция CD19-три-ТАС является такой, как описано на **фиг. 17**.

**Пример 6. Возможность промышленного получения экспрессирующих CD19-ТАС Т-клеток из различного донорного материала**

[0256] **Фиг. 18** иллюстрирует эффективность экспрессирующих CD19-ТАС Т-клеток, полученных от множества доноров. Экспрессирующие CD19-ТАС Т-клетки получали с использованием Т-клеток от трех различных доноров, и тестировали в модели опухоли NALM-6. Мышей, несущих развившиеся опухоли NALM-6, подвергали лечению с использованием однократной дозы  $4 \times 10^6$  экспрессирующих CD19-ТАС Т-клеток. Для контрольных мышей показано быстрое разрастание опухоли, где все мыши достигли конечной точки к концу исследования. Продукты Т-клеток от доноров 1 и 2 приводили к полному контролю у всех мышей. Продукт Т-клеток от донора 3 приводил к надежному контролю опухоли у всех мышей и длительному контролю у 2/4 подвергнутых лечению мышей. Исследование подтверждает, что отторжения опухоли достигают посредством экспрессирующих CD19-ТАС Т-клеток, происходящих от множества здоровых доноров. Результаты для модели опухоли NALM-6 на **фиг. 18** позволяют предполагать, что эффективный CD19-ТАС получен из материалов из множества донорских источников.

**Пример 7. Цитотоксичность in vitro и эффективность in vivo экспрессирующих CD19-ТАС Т-клеток**

[0257] Для оценки способности CD19-ТАС эффективно привлекать различные положительные по CD19 клетки, модифицированные с использованием три-ТАС-Т-клетки культивировали совместно с NALM-6 (острый лимфобластный лейкоз), Raji (лимфома Беркитта) или Jeko-1 (лимфома из клеток мантийной зоны). Клетки NALM-6, Jeko-1 и Raji модифицировали с использованием усиленной люциферазы светляка, чтобы позволить отслеживание опухолевой нагрузки in vitro и в живом животном посредством биOLUMИнесцентной визуализации.

[0258] **Фиг. 19А - фиг. 19С** иллюстрирует уничтожение линий клеток опухолей посредством экспрессирующих CD19-ТАС Т-клеток. Эффекты являлись зависимыми от дозы и увеличивались с увеличением соотношений эффектора к мишени (Е:Т). В качестве отрицательного контроля, использовали клетки, модифицированные с использованием  $\Delta$ ТАС (лишенного антигенсвязывающего домена), или нетрансдуцированные Т-клетки.

Эти результаты показывают, что экспрессирующие CD19-TAC Т-клетки уничтожают положительные по CD19 клетки опухолей.

**[0259] Фиг. 19 D - фиг. 19G** иллюстрирует дизайн и исход исследования *in vivo*, оценивающего эффективность CD19-TAC у мышей с трансплантированными жидкими опухолями NALM-6 (острый лимфобластный лейкоз), Raji (лимфома Беркитта) или Jeko-1 (лимфома из клеток мантийной зоны). Для инициации развития опухолей NALM-6, Raji и Jeko-1, мышам инокулировали клетки NALM-6, Raji или Jeko-1, и содержали 4 или 7 суток, соответственно, чтобы обеспечить приживание опухолей. На сутки 4 или 7, экспрессирующие CD19-TAC Т-клетки вводили в форме внутривенной инъекции в хвостовую вену. Опухолевую нагрузку измеряли с еженедельными интервалами, и данные наносили на график как среднее излучение [ф/с/см<sup>2</sup>/ср].

**[0260] фиг. 19 E - фиг. 19G** иллюстрирует, что модифицированные посредством CD19-TAC Т-клетки являются эффективными для индукции регрессии опухоли и длительного контроля опухоли для жидких опухолей NALM-6 (острый лимфобластный лейкоз), Raji (лимфома Беркитта) или Jeko-1 (лимфома из клеток мантийной зоны).

**[0261]** Результаты для моделей опухолей NALM-6, Raji или Jeko-1 на **фиг. 19A - фиг. 19G** позволяют предполагать, что CD19-TAC является эффективным во множестве моделей положительных по CD19 опухолей.

**Пример 8. Персистенция экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток и длительный иммунитет против опухоли.**

**[0262] Фиг. 20A - фиг. 20B** иллюстрируют персистенцию иммунитета против опухоли и устойчивость к повторному заражению у мышей, которым вводили экспрессирующие CD19-TAC Т-клетки. Мышей, несущих развившиеся опухоли NALM-6, подвергали лечению с использованием экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток.

**[0263] Фиг. 20A** иллюстрирует разработку эксперимента для определения персистенции CD19-TAC у мышей. Мышей, которым сначала инокулировали клетки NALM-6, за чем следовал период приживания 4 суток, подвергали лечению с использованием CD19-TAC. Для всех мышей показана регрессия опухоли и полный контроль опухоли. Через 56 суток после начального лечения, мышей повторно заражали жидкими опухолями либо NALM-6 (положительной по CD19), либо KMS11 (отрицательной по CD19). Во всех случаях, наивных мышей подвергали совместной инъекции клеток опухолей и использовали в качестве отрицательного контроля. Опухолевую нагрузку отслеживали посредством сигнал люминесценции.

**[0264] Фиг. 20B:** Мышей, несущих развившиеся опухоли NALM-6, подвергали лечению с использованием экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток, введенных в форме дробной дозы, всего  $4 \times 10^6$  модифицированных клеток. В качестве контроля, использовали группу животных без лечения. После АСТ, у подвергнутых лечению мышей проявлялись длительные противоопухолевые ответы. В отличие от этого, для контрольных мышей показано экспоненциальное увеличение масс опухолей и достижение связанной с опухолевой нагрузкой конечной точки. На сутки 56 после АСТ, мышей повторно

заражали либо клетками опухоли NALM-6 (положительными по CD19), либо клетками опухоли KMS11 (отрицательными по CD19). Подвергнутые лечению с использованием CD19-ТАС мыши оставались защищенными от клеток опухоли NALM-6 (положительных по CD19), но не от клеток опухоли KMS11 (отрицательных по CD19) й.

[0265] Результаты экспериментов повторного заражения на **фиг. 20А** и **фиг. 20В** позволяют предполагать, что CD19-ТАС, в некоторых случаях, подвергаются дифференцировке в долгоживущие клетки памяти, сохраняющие противоопухолевые свойства.

**Пример 9. Размножение in vivo и зависимость от дозы для экспрессирующих CD19-ТАС Т-клеток.**

[0266] **Фиг. 21** и **фиг. 22** иллюстрируют зависимость от дозы, режим дозирования (дробный или однократный) и размножение экспрессирующих CD19-ТАС Т-клеток в модели злокачественной опухоли NALM-6. **Фиг. 21А** иллюстрирует дизайн эксперимента. Мышам вводили либо однократную дозу экспрессирующих CD19-ТАС Т-клеток на сутки четыре после инокуляции опухоли, либо дробную дозу, доставляемую с интервалом в семь суток. Тестировали множество доз экспрессирующих CD19-ТАС Т-клеток:  $0,5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$  и  $4 \times 10^6$  клеток. **Фиг. 21В** в контрольных группах мышей вводили  $4 \times 10^6$  нетрансдуцированных клеток или среды для замораживания (контрольный носитель).

[0267] **Фиг. 21В** иллюстрируют выживаемость мышей после инъекции NALM-6 и инъекции CD19-ТАС. Зависимую от дозы стимуляцию выживаемости наблюдали в группах как однократной дозы, так и дробной дозы, где введение наивысшей однократной дозы ограничивало рост опухоли и стимулировало выживаемость мышей.

[0268] **Фиг 22А** иллюстрирует способ отбора, использованный для оценки пролиферации Т-клеток. Клетки сначала отбирали на основании прямого и бокового рассеяния для отбора популяции лимфоцитов. Синглеты клеток идентифицировали посредством области прямого рассеяния, превышающей отбор по высоте. Живые клетки идентифицировали посредством отбора в ближнем ИК. Клетки человека идентифицировали посредством отбора по hCD45. Из полученной подгруппы клеток далее отделяли положительные по CD3 клетки. Затем эти клетки отбирали посредством CD4/CD8 и белка L. Способ окрашивания также включал идентификацию мышинных клеток крови по mCD45\_1. CD19 включали для окрашивания клеток NALM-6.

[0269] **Фиг. 22В** размножение Т-клеток мышей после дробной дозы адоптивного переноса Т-клеток (АСТ). После АСТ, образцы крови отбирали регулярно и анализировали посредством проточной цитометрии. Значения нормализовали по количеству тотальных Т-клеток, присутствующих в крови после АСТ1. Значения также нормализовали по общему количеству CD45.1+ (мышинных) клеток для учета различий в отборах крови. Для Т-клеток у мышей, подвергнутых лечению с использованием модифицированных посредством CD19-ТАС клеток, показано размножение у мышей-реципиентов в пределах приблизительно 1-2 недель после первой АСТ (**фиг. 22В**). Нетрансдуцированные клетки не размножались (**фиг. 22В**).

[0270] Результаты для различных доз, режимов дозирования (**Фиг 21В**) и количеств Т-клеток (**Фиг 22В**) позволяют предполагать, что эффективность CD19-ТАС является зависимой от дозы, что модифицированные Т-клетки размножаются *in vivo*, и что это размножение является специфическим для модифицированных посредством CD19-ТАС клеток у животных, несущих положительные по CD19 опухоли.

**Пример 10. Эффективность *in vivo*, длительная эффективность и безопасность лечения посредством CD19-ТАС**

[0271] На **фиг. 23 - фиг. 25** показана длительная безопасность и эффективность (**фиг. 23**) и отсутствие какой-либо острой ассоциированной с лечением токсичности (**фиг. 24 - фиг. 25**).

[0272] **Фиг. 23А** иллюстрирует дизайн эксперимента. Мышам инъецировали  $0,5 \times 10^6$  модифицированных с использованием усиленной люциферазы клеток NALM-6, которым позволяли приживаться в течение 4 суток. Затем мышей подвергали лечению с использованием двух уровней дозирования (4 и  $12 \times 10^6$  модифицированных клеток) модифицированных посредством CD19-ТАС Т-клеток, при введении в однократной дозе. Рост опухоли затем отслеживали посредством регулярных измерений люминесценции. Состояние здоровья мышей регулярно оценивали посредством проверки поведения мышей и физических характеристик (ухода за шерстью, подвижности, целостности меха)

[0273] **Фиг. 23В** иллюстрирует опухолевую нагрузку по люминесценции после лечения только носителем (средами для замораживания), немодифицированными контрольными клетками (дозой тотальных Т-клеток, равной дозе тотальных Т-клеток из группы лечения наивысшей дозой модифицированных клеток) и либо 4, либо  $12 \times 10^6$  модифицированных посредством сконструированного CD19-ТАС Т-клеток. Для обоих видов контроля показано быстрое разрастание опухоли и отсутствие противоопухолевой эффективности. Контрольная доза приводит к задержке разрастания опухоли, по сравнению только с носителем, предположительно, из-за конкуренции между высокой дозой Т-клеток и клетками опухоли за ниши для приживания. Для модифицированных Т-клеток показана регрессия опухоли, во всех случаях. Для групп лечения высокой дозой показан полный контроль опухоли, во всех случаях. Для группы лечения  $4 \times 10^6$  показаны 3 мыши с полным контролем, одна с задержкой разрастания опухоли и одна с контролируемой, но высокой опухолевой нагрузкой.

[0274] **Фиг. 23С** иллюстрирует общую выживаемость для различных групп лечения. В обеих контрольных группах мышей, с носителем и без модификации, все мыши погибли из-за опухоли в пределах 23-35 суток, соответственно. В случае лечения высокой дозой CD19-ТАС, у всех мышей развились симптомы GvHD, и они погибли от GvHD в пределах 61 суток. GvHD представляет собой последствие собственно модели на мышях, а не лечения с использованием модифицированных Т-клеток. Для мышей с низкой дозой показана выживаемость 3 мышей до окончания исследования на 90 сутки, одна мышь погибла из-за высокой опухолевой нагрузки, одна мышь погибла из-за GvHD.

[0275] **Фиг. 24 и фиг. 25** иллюстрируют параметры клинической химии и уровни

цитокинов для мышей, подвергнутых лечению контрольным носителем, не модифицированными клетками и CD19-TAC (4 и  $12 \times 10^6$  эффективных модифицированных посредством CD19-TAC клеток). Мышей отслеживали в течение 33 суток с использованием образцов крови, отобранных через 5, 12 и 33 суток после АСТ. Только мыши, подвергнутые лечению CD19-TAC, выживали в течение 33 суток. Мыши с контрольным носителем погибали от опухолевой нагрузки до того, как можно было отобрать 3<sup>ий</sup> образец, мышей с немодифицированными клетками умерщвляли рано на сутки 26, непосредственно перед тем, как мыши достигали связанной с опухолевой нагрузкой конечной точки. Все образцы крови анализировали по нескольким параметрам клинической химии и уровням цитокинов.

**[0276] Фиг. 24** иллюстрирует, что на сутки 5 и 12, для мышей, подвергнутых лечению CD19-TAC, не показано параметра, который является значимо более высоким, по сравнению с контрольными группами. На сутки 33, для всех подвергнутых лечению мышей показаны параметры клинической химии, сравнимые с ранними временными точками лечения, за исключением аланинаминотрансферазы (ALT) и аспартатаминотрансферазы (AST), где некоторые мыши испытывали высокие уровни, подобно мышам, подвергнутым лечению с использованием немодифицированными клетками, с образцами, отобранными на сутки 26.

**[0277] Фиг. 25** иллюстрирует ответ цитокинов на сутки 5, 12 и 33. На сутки 5 после АСТ, для CD19-TAC, но не для контрольных мышей, показано увеличение уровней всех тестируемых цитокинов. Увеличение уровня цитокинов согласуется с воспалительным ответом модифицированных посредством CD19-TAC Т-клеток, узнающих и вступающих в реакцию с положительными по антигену клетками опухоли NALM-6. После их первоначальной реакции на сутки 12, уровни цитокинов падают, что коррелирует с индуцированной к этому времени регрессией опухоли и, как правило, низкой опухолевой нагрузкой. На сутки 12 уровни цитокинов для лечения CD19-TAC являются либо сходными, либо более низкими, чем для немодифицированных Т-клеток, за исключением IL10. На более поздней стадии, для всех мышей, подвергнутых лечению с использованием нетрансдуцированных или модифицированных посредством CD19-TAC Т-клеток, показано увеличение уровня цитокинов, предположительно, ассоциированное с началом GvHD. См. также **фиг. 29**, которая иллюстрирует ответ цитокинов на сутки 5, 12, 26 и 33.

**[0278]** Результаты длительного отслеживания мышей, подвергнутых лечению с использованием CD19-TAC, и их профилей клинической химии, показывают, что модифицированные Т-клетки являются безопасными и для них не показано никаких показателей токсичности, вызванной специфической модификацией CD19-TAC. Результаты исследования цитокинов показывают ранний воспалительный ответ, ассоциированный с противоопухолевой эффективностью, за которым следует падение уровней всех цитокинов, что позволяет предполагать контролируемый воспалительный ответ.

### **Пример 11. Эффективность in vivo нескольких вариантов ВСМА-три-TAC**

[0279] **Фиг. 26** иллюстрирует исследование эффективности *in vivo* различных конструкций ВСМА-три-ТАС. **Фиг. 26А** иллюстрирует общий дизайн эксперимента. 1 миллиону модифицированных посредством люциферазы клеток опухолей KMS11 (положительных по ВСМА) позволяли приживаться в течение 12 суток. Затем мышей подвергали лечению с использованием однократной эффективной дозы 4 миллиона конструкций для ВСМА и контроля (**фиг. 26В**). Опухолевую нагрузку регулярно оценивали посредством измерений люминесценции. Всех мышей, для которых показана регрессия опухоли и контроль опухоли, затем повторно заражали на сутки 25 после АСТ с использованием 1 миллиона клеток KMS11.

[0280] **Фиг. 26С:** После АСТ, для контрольных мышей показано быстрое разрастание клеток опухолей, достигающее ассоциированной с опухолью конечной точки в пределах 19-25 суток. В отличие от этого, для всех мышей, подвергнутых лечению с использованием ВСМА-ТАС, показана начальная регрессия опухоли. Контроль опухоли менялся среди конструкций, где для G<sub>4</sub>S (SEQ ID NO: 73) 3625VH-VL показан самый низкий уровень начального контроля опухоли, и для 3625 VL-VH с короткой спиралью показан самый высокий уровень начального контроля опухоли. После повторного заражения, большинство из всех конструкций, сохраняющих контроль опухоли до суток 25, оставались защитными после повторного заражения.

[0281] Результаты этого исследования *in vivo* показывают, что множество конструкций ВСМА-три-ТАС являются эффективными для контроля жидких опухолей KMS11 (положительных по ВСМА). Но при этом, конкретные предпочтительные конфигурации обеспечивают превосходящую эффективность. Как правило, спиральная область соединителя обеспечивает относительное преимущество, по сравнению с гибким линкером внутри той же самой конфигурации scFv.

#### **Пример 12. ТАС-Her2 in vivo**

[0282] Мышам инокулируют в задний пах солидные опухоли OVCAR3. Опухолям позволяют развиваться и расти до размера 100 мм<sup>3</sup>. Затем мышей подвергают лечению с использованием инъекции в хвостовую вену модифицированных посредством ТАС-Her2 Т-клеток. Объем опухоли измеряют регулярно.

#### **Пример 13. Клинические исследования**

[0283] Проводили клиническое исследование, в котором субъектов в возрасте по меньшей мере 18 лет с положительной по CD19 диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой, для которых были неудачными по меньшей мере две предшествующих линии терапии, включая ASCT, или которые являются неподходящими для ASCT, подвергали лечению с использованием экспрессирующих CD19-ТАС Т-клеток. Исследование представляет собой открытое двухстадийное исследование фазы 1/2, с одной группой, характеризующееся стадией повышения дозы для определения максимально переносимой дозы (MTD) или рекомендованной дозы для фазы II (RPh2D), с последующей расширением когорты для выбранной дозы.

[0284] После регистрации, субъектов подвергают лейкаферезу для получения Т-

клеток для получения экспрессирующих CD19-TAC T-клеток. После успешного получения, субъектов переводят в фазу лечения. Эта фаза включает противолимфоцитарную химиотерапию флударабином и циклофосфамидом, с последующим внутривенным (IV) введением экспрессирующих CD19-TAC T-клеток. После лечения экспрессирующими CD19-TAC T-клетками, субъектов переводят в отслеживание после лечения и отслеживают по безопасности, статусу заболевания и выживаемости в течение 2 лет после их последней дозы экспрессирующих CD19-TAC T-клеток. После завершения исследования, субъектов отслеживают по выживаемости, длительной токсичности и безопасности вирусного вектора по отдельному протоколу длительного отслеживания в течение вплоть до 15 лет после последней дозы экспрессирующих CD19-TAC T-клеток.

**[0285]** Во всех группах, безопасность оценивают на протяжении исследования. Размножение T-клеток оценивают от времени первой дозы экспрессирующих CD19-TAC T-клеток до тех пор, пока клетки не перестанут дальше поддаваться детекции. Радиографическую оценку заболевания проводят посредством сканирований позитронной эмиссионной томографии (PET) и/или компьютерной томографии (СТ) до лечения и приблизительно через 3, 6, 9, 12, 18 и 24 месяцев после последней дозы экспрессирующих CD19-TAC T-клеток, или до прогрессирования заболевания, или до лечения с использованием дополнительной противораковой терапии.

#### **Пример 14. Изготовление фармацевтических продуктов из экспрессирующих CD19-TAC T-клеток**

**[0286]** Способ изготовления фармацевтических продуктов из экспрессирующих CD19-TAC T-клеток включает отбор CD4/CD8 T-клеток из продукта лейкофереза, активацию положительных по CD4/CD8 клеток, трансдукцию клеток лентивирусным вектором, содержащим конструкцию CD19-TAC (как описано в примере 5), размножение трансдуцированных клеток до уровня, адекватного для предполагаемого расписания дозирования, и сбор и криоконсервацию конечного продукта.

**[0287]** Материал после лейкофереза от пациента с ассоциированным с ним уникальным идентификатором субъекта (UPN) получают в производственном участке и присваивают уникальный номер образца (ISN). Отобранные CD4/CD8 клетки криоконсервируют до начала стадий способа культивирования.

**[0288]** Криоконсервированные положительно отобранные по CD4/CD8 T-клетки размораживают при 37°C, ресуспендируют в подходящей среде и рассеивают в культуральные пакеты с активирующими реагентами, культуры инкубируют в течение ночи при 37°C/5% CO<sub>2</sub>.

**[0289]** Клетки трансдуцируют с использованием лентивирусного вектора CD19-TAC с подходящей множественностью инфекции (MOI) и инкубируют в течение ночи при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. В последующие несколько суток, культуру дополняют полной средой для поддержания желательной концентрации клеток и в конечном счете пулируют в пакеты для переноса, осаждают, ресуспендируют и рассеивают в большие культуральные пакеты

при целевой плотности клеток.

[0290] Для состава фармацевтического продукта, собранную суспензию клеток ресуспендируют в наполнителе и криоконсервируют с использованием замораживателя с контролируемой скоростью, затем переносят в хранилище с LN2.

[0291] Продукт транспортируют до клинического центра в замороженном состоянии, размораживают на месте лечения пациента и вводят внутривенно.

[0292] Перед клиническими исследованиями, проводят мероприятия по технологической подготовке производства, включая все тестирования в ходе технологического процесса и при выпуске продукции, с использованием материала после лейкофереза от здорового донора. В дополнение к тестированию в ходе технологического процесса и при выпуске продукции, исследования, поддерживающие отчеты регулирующим органам, проводят для конечного фармацевтического продукта из этих мероприятий по технологической подготовке. Эти исследования включают стабильность после размораживания, инициацию длительной стабильности, тестирование на остаточное содержание, чтобы убедиться в клиренсе стимулирующих рост цитокинов, и раннюю оценку потенциальной функциональности/показывающие активность анализы.

**Пример 15. Доклиническая разработка терапии специфическим для ВСМА связывающим Т-клетку с антигеном агентом (ТАС) для лечения положительных по ВСМА злокачественных новообразований**

[0293] Фиг. 27 иллюстрирует, что ТАС осуществляют пролиферацию, когда сталкиваются с антигеном на клетках, но не когда антиген представлен на искусственных бусинах; но CAR осуществляют пролиферацию, независимо от того, представлены ли антигены на бусинах или клетках.

[0294] Фиг. 28А-фиг. 28В иллюстрируют, что модифицированные посредством ТАС Т-клетки размножаются *in vivo* и обеспечивают длительную защиту, показывая персистенцию клеток в модели миеломы. Фиг. 28А - фиг. 28В иллюстрируют, что ВСМА-ТАС-Т-клетки приводят к отторжению опухоли множественной миеломы в модели ксенотрансплантата KMS-11, сконструированной с использованием NanoLuc (KMS 11-NanoLuc) (ВСМА<sup>пол</sup>). После приживления опухоли, мышей подвергали лечению с использованием ВСМА-ТАС-Т-клеток (несущих люциферазу светляка). ТАС-Т-клетки значительно размножились после введения. Это коррелирует с регрессией опухоли. Подвергнутые лечению мыши являлись устойчивыми к повторному заражению опухолью, что указывает на длительную персистенцию ТАС-Т-клеток.

[0295] Эти данные иллюстрируют, что ТАС-Т-клетки разрушают клетки опухолей, вероятно, посредством механизма, имитирующего природный процесс активации Т-клетки. Технология ТАС иллюстрирует 1) сильную эффективность в жидкости, 2) пролиферацию *in vivo*, 3) персистенцию Т-клеток, защищающих мышей от повторного заражения, и 4) размножение клеток после введения Т-клеток.

**Пример 16. Активность *in vivo* и *in vitro* hu- или muIgk-HER2-ТАС с промотором MSCV или EF1 $\alpha$ .**

**[0296]** CD4 и CD8 Т-клетки были модифицированы с использованием множества экспрессирующих ТАС вирусов. Одна группа клеток была модифицирована с использованием лентивируса, в котором использован промотор MSCV для экспрессии ТАС, специфического для HER-2, в котором использован сигнальный пептид мышинового IgG [ $\mu$ IgG-TAC (MSCV)]. Другая группа клеток была модифицирована с использованием лентивируса, в котором использован промотор MSCV для экспрессии ТАС, специфического для HER-2, в котором использован сигнальный пептид человеческого IgG [ $h$ uIgG-TAC (MSCV)]. Третья группа клеток была модифицирована с использованием лентивируса, в котором использован промотор EF1 $\alpha$  для экспрессии ТАС, специфического для HER-2, в котором использован сигнальный пептид мышинового IgG [ $\mu$ IgG-TAC (EF1 $\alpha$ )]. В качестве отрицательного контроля, использовали конструкцию ТАС, лишенную связывающего HER2 домена ( $\Delta$ связывающий домен ТАС). Затем модифицированные клетки характеризовали *in vitro* по измененной поверхностной экспрессии и специфической активности, и *in vivo* по активности в модели положительной по HER2 солидной опухоли OVCAR3.

**[0297]** **Фиг. 30** иллюстрирует поверхностную экспрессию на Т-клетке рецепторов HER2-TAC с лидером из человеческого или мышинового IgG, под контролем промотора MCSV или EF1 $\alpha$ . Поверхностная экспрессия является ключевым требованием для биологической активности, и это иллюстрирует, что на экспрессию рецепторов HER2-TAC не влияет вид - источник сигнального пептида IgG.

**[0298]** На **фиг. 31** показано, что Т-клетки, модифицированные с использованием конструкций HER2-TAC с лидером либо из человеческого, либо из мышинового IgG, под контролем промотора MCSV или EF1 $\alpha$ , индуцируют продукцию цитокинов, при совместном культивировании с положительными по HER2 клетками-мишенями (OVCAR3), но не с отрицательными по HER2 клетками (LOX IMVI). Это показывает, что модифицированные с использованием рецептора HER2-TAC Т-клетки являются способными к специфическому привлечению экспрессирующих HER2 клеток-мишеней, но не являются реакционноспособными против отрицательных по антигену клеток.

**[0299]** На **фиг. 32** показана эффективность *in vivo* конструкций HER2-TAC с лидером из человеческого или мышинового IgG, под контролем промотора MCSV или EF1 $\alpha$ . После введения дробной дозы модифицированных Т-клеток, для модифицированных с использованием HER2-TAC клеток показано значительное влияние на рост опухоли, включая регрессию опухоли, по сравнению с отрицательным контролем  $\Delta$ связывающий домен ТАС. Этот эксперимент *in vivo* показывает, что для всех модифицированных с использованием HER2-TAC клеток показана значительная активность против солидной опухоли в модели *in vivo*.

**[0300]** В то время как предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения показаны и описаны в настоящем описании, специалисту в данной области очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Многочисленные варианты, изменения и замены в настоящее время очевидны

специалисту в данной области без отклонения от изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы вариантам осуществления изобретения, описанным в настоящем описании, можно использовать в практическом осуществлении изобретения. Подразумевают, что следующие ниже пункты формулы изобретения определяют объем изобретения, и что способы и структуры в пределах объема этих пунктов формулы изобретения и их эквивалентов охвачены таким образом.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CD19-трифункциональный связывающий T-клетку с антигеном агент (CD19-TAC), содержащая:

(а) первый полинуклеотид, кодирующий лиганд, избирательно связывающий антиген CD19;

(b) второй полинуклеотид, кодирующий лиганд UCNT1, связывающий CD3; и

(с) третий полинуклеотид, кодирующий полипептид передающего сигналы домена TCR, содержащий цитозольный домен и трансмембранный домен;

где компоненты, кодируемые (а), компоненты, кодируемые (b), и компоненты, кодируемые (с), слиты непосредственно друг с другом, или соединены посредством по меньшей мере одного линкера.

2. Последовательность нуклеиновой кислоты по п.1, где лиганд, избирательно связывающий антиген CD19, представляет собой одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv).

3. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-2, где лиганд, избирательно связывающий антиген CD19, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 36.

4. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3, где лиганд UCNT1 представляет собой одноцепочечное антитело.

5. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-4, где лиганд UCNT1 содержит мутацию Y182T.

6. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-4, где лиганд UCNT1 представляет собой гуманизированный вариант UCNT1 (huUCNT1).

7. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-4, где лиганд UCNT1 представляет собой гуманизированный вариант UCNT1, содержащий мутацию Y177T (huUCNT1 (Y177T)).

8. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-7, где лиганд UCNT1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 46.

9. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-8, где цитозольный домен представляет собой цитозольный домен CD4, и трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD4.

10. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-9, где третий полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность,

имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18.

11. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-10, где компонент, кодируемый посредством (a), и компонент, кодируемый посредством (c), слиты с компонентом, кодируемым посредством (b).

12. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-10, где компонент, кодируемый посредством (b), и компонент, кодируемый посредством (c), слиты с компонентом, кодируемым посредством (a).

13. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-10, где по меньшей мере один линкер соединяет компонент, кодируемый посредством (a), с компонентом, кодируемым посредством (b).

14. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-10 или 13, где по меньшей мере один линкер представляет собой гибкий линкер G<sub>4</sub>S (SEQ ID NO: 73), большой домен белка, структуру длинной спирали или структуру короткой спирали.

15. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-10 или 13-14, где по меньшей мере один линкер содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 28.

16. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-15, где CD3 происходит из комплекса TCR на клетке, экспрессирующей второй полинуклеотид.

17. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-16, где связывание CD3 индуцирует активацию клетки, экспрессирующей второй полинуклеотид.

18. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-17, где CD19-TAC содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63.

19. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-17, где CD19-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64.

20. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-19, не кодирующая костимулирующий домен.

21. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-20, не кодирующая активирующий домен.

22. Векторная конструкция, содержащая:

(a) последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-21; и

(b) промотор, функциональный в клетке млекопитающего.

23. Т-клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-21.

24. Фармацевтическая композиция, содержащая Т-клетку по п.23 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

25. Способ лечения злокачественной опухоли, экспрессирующей CD19, у нуждающегося в этом индивидуума, включающий введение индивидууму фармацевтической композиции по п.24.

26. Способ по п.25, где злокачественная опухоль представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование.

27. Способ по п.25, где злокачественная опухоль представляет собой В-клеточную лимфому, острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) или неходжкинскую лимфому.

28. Способ по любому из пп. 25-27, где фармацевтическую композицию вводят трансартериально, подкожно, внутрикожно, внутрь опухоли, внутрь узлов, интрамедуллярно, внутримышечно, внутривенно или внутрибрюшинно.

29. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (три-TAC), содержащая:

(a) первый полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд;

(b) второй полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR; и

(c) третий полинуклеотид, кодирующий полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора;

где лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, выбран из ОКТ3, F6A или L2K.

30. Последовательность нуклеиновой кислоты по п.29, где компонент, кодируемый посредством (a), компонент, кодируемый посредством (b), и компонент, кодируемый посредством (c), слиты непосредственно друг с другом или соединены посредством по меньшей мере одного линкера.

31. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-30, где компонент, кодируемый посредством (a), и компонент, кодируемый посредством (b), непосредственно связаны и соединены с компонентом, кодируемым посредством (c), посредством линкера.

32. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-30, где компонент, кодируемый посредством (b), и компонент, кодируемый посредством (c), непосредственно связаны и соединены с компонентом, кодируемым посредством (a), посредством линкера.

33. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 30-32, где по меньшей мере один линкер представляет собой гибкий линкер G<sub>4</sub>S (SEQ ID NO: 73),

большой домен белка, структуру длинной спирали или структуру короткой спирали.

34. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 30-33, где по меньшей мере один линкер имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 28.

35. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-34, где лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой ОКТ3.

36. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-35, где лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 22.

37. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-34, где лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой F6A.

38. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-34 или 37, где лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 24.

39. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-34, где лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой L2K.

40. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-34 или 39, где лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 26.

41. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-40, где белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой CD3.

42. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-41, где специфический для мишени лиганд избирательно связывает антиген опухоли.

43. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-42, где специфический для мишени лиганд представляет собой сконструированный полипептид с анкириновым повтором (DARPin), или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

44. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-43, где специфический для мишени лиганд избирательно связывает антиген CD19, антиген HER2

или антиген ВСМА.

45. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-44, где специфический для мишени лиганд, избирательно связывающий антиген HER-2, содержит антигенсвязывающий домен антитела, выбранного из трастузумаба, пертузумаба, лапатиниба, нератиниба, адо-трастузумаба эмтанзина, ганкотамаба, маргетуксимаба, тимигутузумаба и эртумаксамаба.

46. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-44, где специфический для мишени лиганд, избирательно связывающий антиген ВСМА, содержит антигенсвязывающий домен антитела, выбранного из белантамаба мафодотина и GSK2857916.

47. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-44, где специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 34.

48. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-47, где полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора содержит цитозольный домен и трансмембранный домен.

49. Последовательность нуклеиновой кислоты по п.48, где цитозольный домен представляет собой цитозольный домен CD4, и трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD4, или где цитозольный домен представляет собой цитозольный домен CD8, и трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD8.

50. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-49, дополнительно содержащая лидерную последовательность.

51. Последовательность нуклеиновой кислоты по п.50, где лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 50.

52. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-51, где CD3 происходит из комплекса TCR на клетке, экспрессирующей второй полинуклеотид.

53. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-52, где связывание CD3 индуцирует активацию клетки, экспрессирующей второй полинуклеотид.

54. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-53, где три-ТАС содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%

идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 61.

55. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-53, где три-ТАС содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60 или SEQ ID NO: 62.

56. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-55, не кодирующая костимулирующий домен.

57. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-56, не кодирующая активирующий домен.

58. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (три-ТАС), содержащая:

(а) первый полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд;

(b) второй полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR; и

(с) третий полинуклеотид, кодирующий полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора;

где последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит лидерную последовательность, и где компонент, кодируемый посредством (а), компонент, кодируемый посредством (b), и компонент, кодируемый посредством (с), слиты непосредственно друг с другом или соединены посредством по меньшей мере одного линкера.

59. Последовательность нуклеиновой кислоты по п.58, где специфический для мишени лиганд избирательно связывает антиген опухоли.

60. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-59, где специфический для мишени лиганд представляет собой сконструированный полипептид с анкириновым повтором (DARPin), или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

61. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-60, где специфический для мишени лиганд избирательно связывает антиген CD19, антиген HER2 или антиген ВСМА.

62. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-61, где специфический для мишени лиганд избирательно связывает антиген HER-2 и содержит антигенсвязывающий домен антитела, выбранного из трастузумаба, пертузумаба, лапатиниба, нератиниба, адо-трастузумаба эмтанзина, ганкотамаба, маргетуксимаба, тимигутузумаба и эртумаксамаба.

63. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-61, где специфический для мишени лиганд избирательно связывает антиген ВСМА и содержит антигенсвязывающий домен антитела, выбранного из белантамаба мафодотина и

GSK2857916.

64. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-61, где специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 54.

65. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-64, где лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, выбран из UCNT1, UCNT1 (Y182T), huUCNT1, huUCNT1 (Y177T), OKT3, F6A или L2K.

66. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-65, где лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 26.

67. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-66, где белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой CD3.

68. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-67, где полипептид передающего сигнала домена T-клеточного рецептора содержит цитозольный домен и трансмембранный домен.

69. Последовательность нуклеиновой кислоты по п.68, где цитозольный домен представляет собой цитозольный домен CD4, и трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD4, или где цитозольный домен представляет собой цитозольный домен CD8, и трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD8.

70. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-69, где лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 50.

71. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-70, где компонент, кодируемый посредством (а), и компонент, кодируемый посредством (б), непосредственно связаны и соединены с компонентом, кодируемым посредством (с), посредством линкера.

72. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-70, где компонент, кодируемый посредством (б), и компонент, кодируемый посредством (с), непосредственно связаны и соединены с компонентом, кодируемым посредством (а),

посредством линкера.

73. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-72, где по меньшей мере один линкер представляет собой гибкий линкер G<sub>4</sub>S (SEQ ID NO: 73), большой домен белка, структуру длинной спирали или структуру короткой спирали.

74. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-73, где по меньшей мере один линкер имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 28.

75. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-74, где белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой CD3, и CD3 происходит из комплекса TCR на клетке, экспрессирующей второй полинуклеотид.

76. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 75, где связывание CD3 индуцирует активацию клетки, экспрессирующей второй полинуклеотид.

77. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-76, где три-ТАС содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 61.

78. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-76, где три-ТАС содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60 или SEQ ID NO: 62.

79. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-78, не кодирующая костимулирующий домен.

80. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-79, не кодирующая активирующий домен.

81. Полипептид, кодируемый посредством последовательности нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-21 или 29-80.

82. Векторная конструкция, содержащая:

(а) последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-80; и

(б) промотор, функциональный в клетке млекопитающего.

83. Т-клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-80.

84. Фармацевтическая композиция, содержащая Т-клетку по п.83 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

85. Способ лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом индивидуума, включающий введение индивидууму фармацевтической композиции по п.84.

86. Способ по п.85, где индивидуум представляет собой млекопитающее.

87. Способ по любому из пп. 85-86, где злокачественная опухоль представляет собой солидную злокачественную опухоль или жидкую злокачественную опухоль.

88. Способ по любому из пп. 85-87, где злокачественная опухоль представляет собой рак легкого, рак молочной железы, множественную миелому, глиобластому, рак желудка, рак яичника, рак желудка, колоректальный рак, рак уротелия, рак эндометрия или рак ободочной кишки.

89. Способ по любому из пп.85-86, где злокачественная опухоль содержит экспрессирующую CD19 клетку злокачественной опухоли.

90. Способ по любому из пп.85-86, или 89, где злокачественная опухоль представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование.

91. Способ по любому из пп.85-86 или 89, где злокачественная опухоль представляет собой В-клеточную лимфому, острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) или неходжкинскую лимфому.

92. Способ по любому из пп.85-86, где злокачественная опухоль содержит экспрессирующую HER-2 клетку злокачественной опухоли.

93. Способ по любому из пп. 85-86 или 92, где злокачественная опухоль представляет собой рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак яичника или рак желудка.

94. Способ по любому из пп.85-86, где злокачественная опухоль содержит экспрессирующую ВСМА клетку злокачественной опухоли.

95. Способ по любому из пп. 85-86 или 94, где злокачественная опухоль представляет собой лейкоз, лимфому или множественную миелому.

96. Способ по любому из пп. 85-95, где фармацевтическую композицию вводят индивидууму трансартериально, подкожно, внутривенно, внутрь опухоли, внутрь узлов, интрамедуллярно, внутримышечно, внутривенно или внутрибрюшинно.

97. Способ по любому из пп. 85-96, где фармацевтическая композиция находится в форме единичной дозы.

98. Способ по любому из пп. 85-97, где фармацевтическая композиция содержит приблизительно  $0,5-2 \times 10^9$  Т-клеток.

99. Способ по любому из пп. 85-98, где фармацевтическую композицию вводят ежедневно, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, раз в два месяца или ежегодно.

100. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая HER2-трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (HER2-TAC), содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность

последовательности с SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 75.

101. Последовательность нуклеиновой кислоты по п.100, где HER2-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68 или SEQ ID NO: 76.

102. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 100-101, не кодирующая костимулирующий домен.

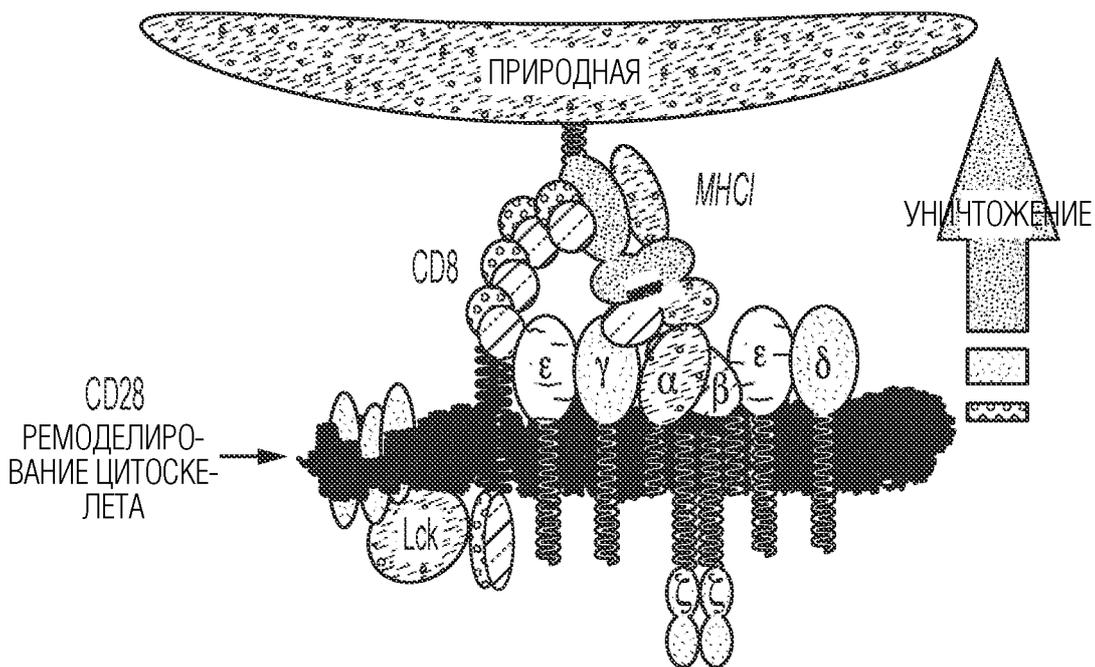
103. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 100-102, не кодирующая активирующий домен.

104. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ВСМА-трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (ВСМА-TAC), содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 61.

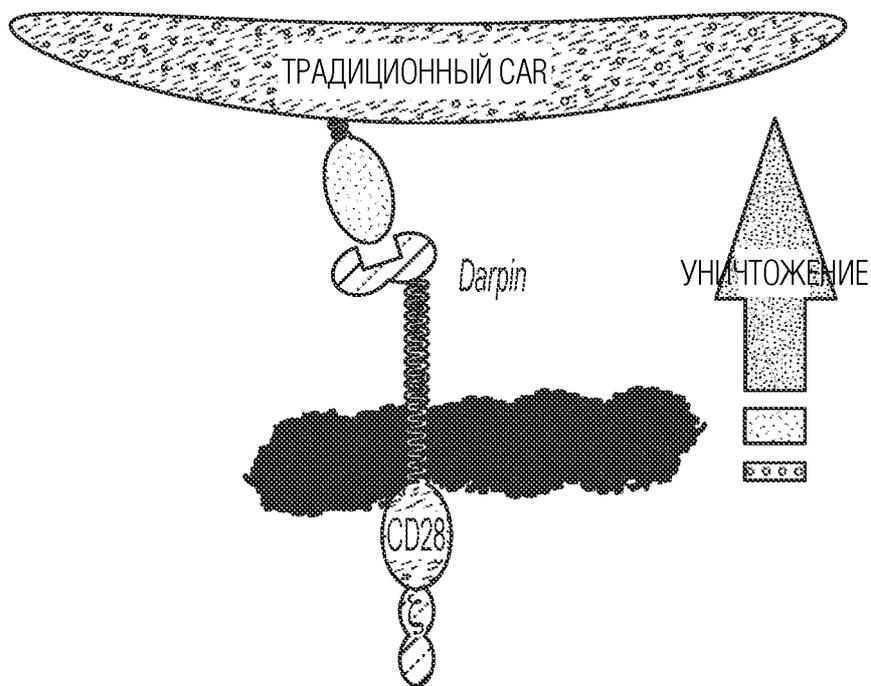
105. Последовательность нуклеиновой кислоты по п.104, где ВСМА-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60 или SEQ ID NO: 62.

106. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 104-105, не кодирующая костимулирующий домен.

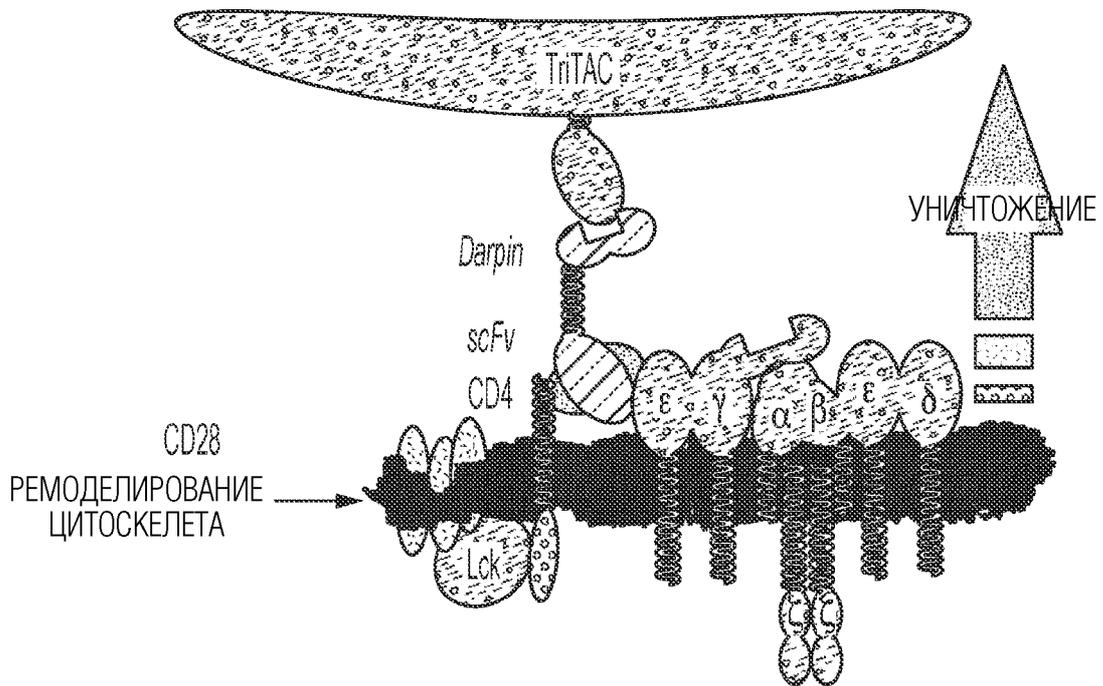
107. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 104-106, не кодирующая активирующий домен.



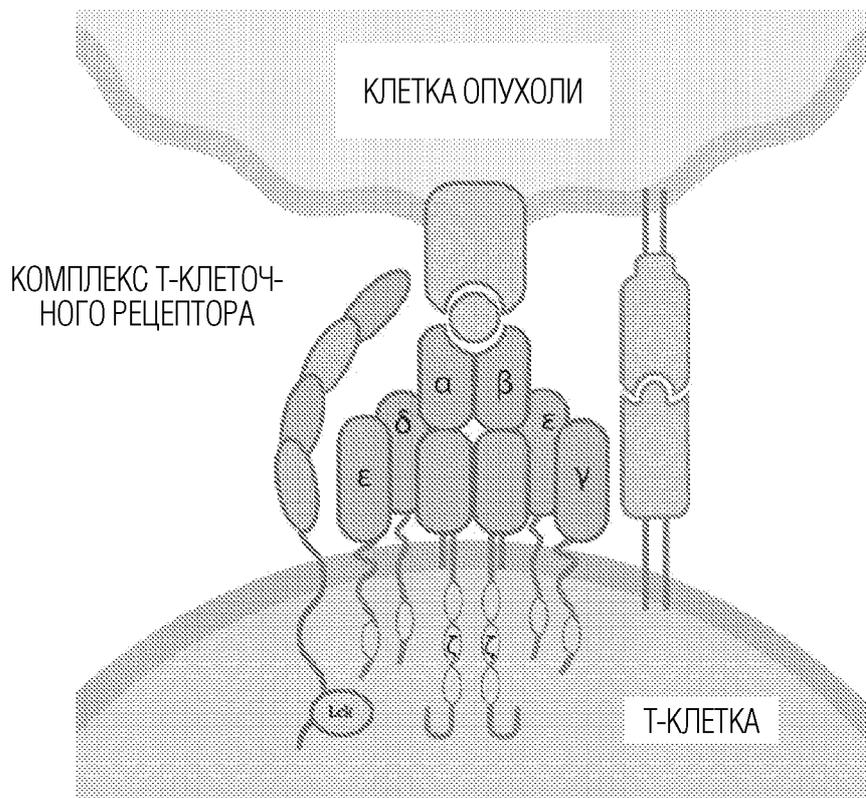
ФИГ. 1А



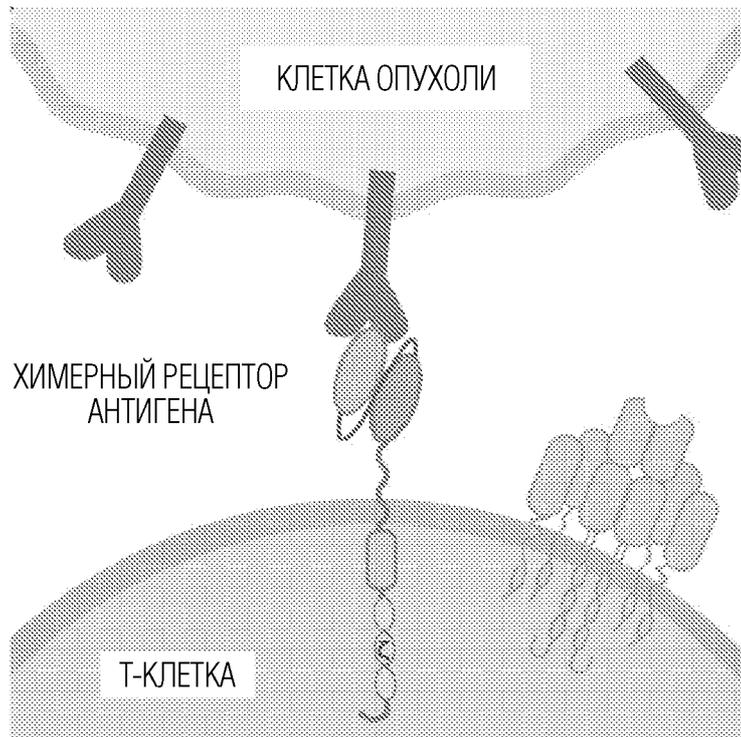
ФИГ. 1В



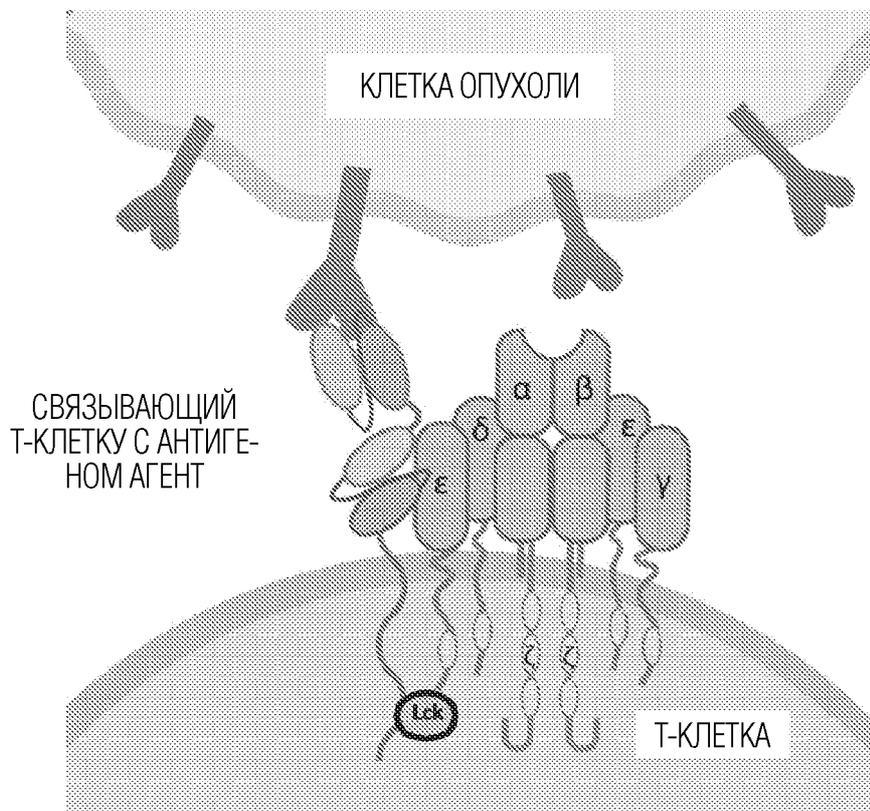
ФИГ. 1С



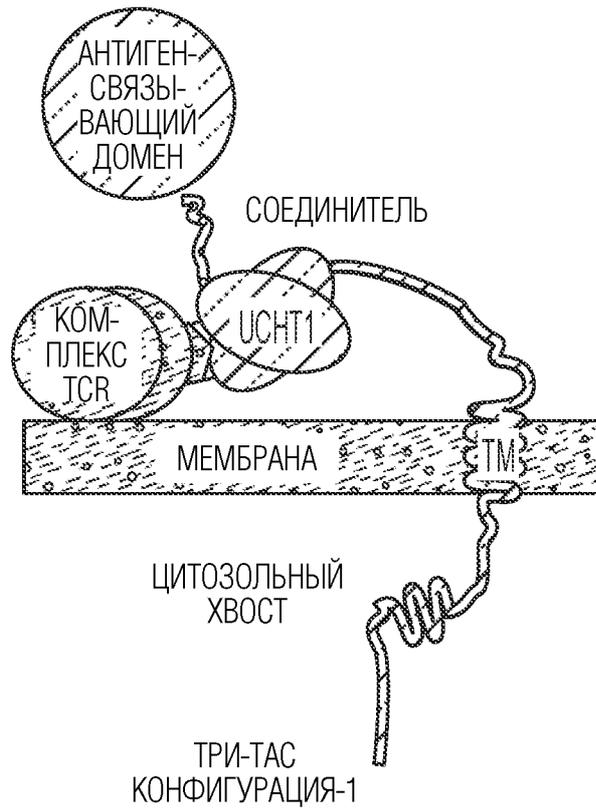
ФИГ. 1D



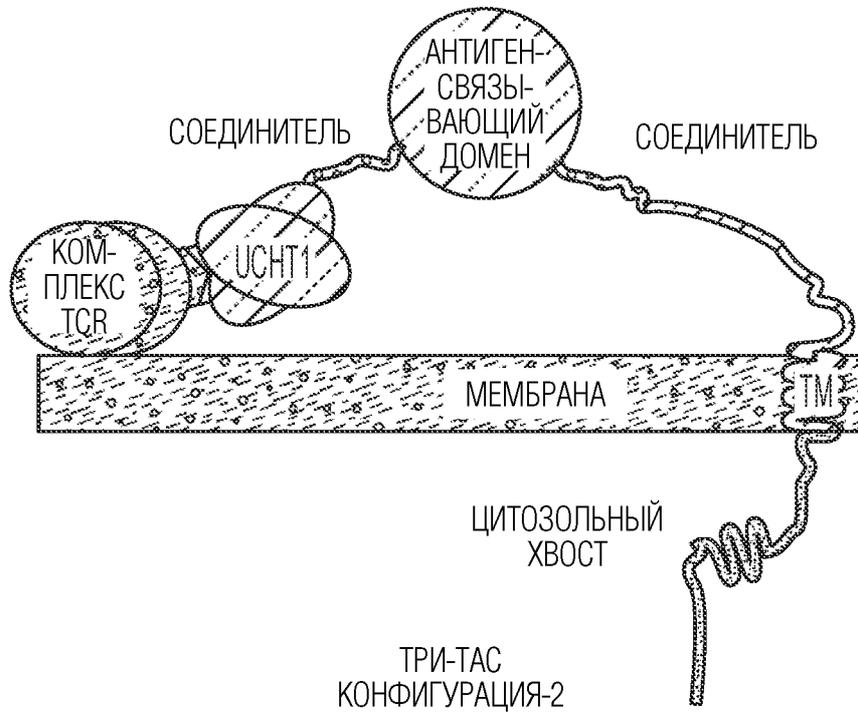
ФИГ. 1Е



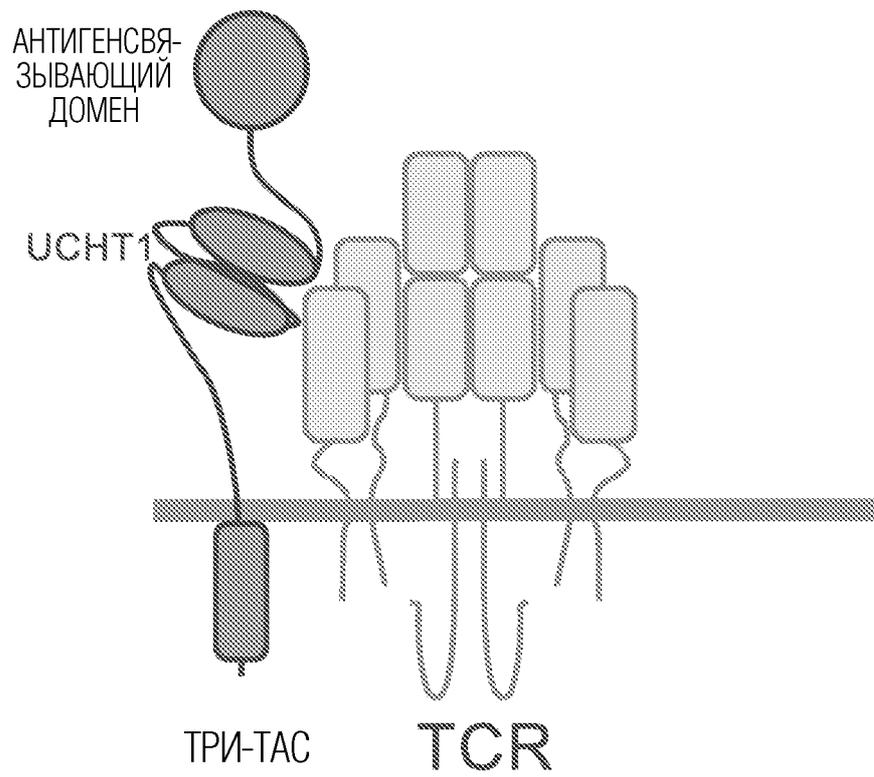
ФИГ. 1F



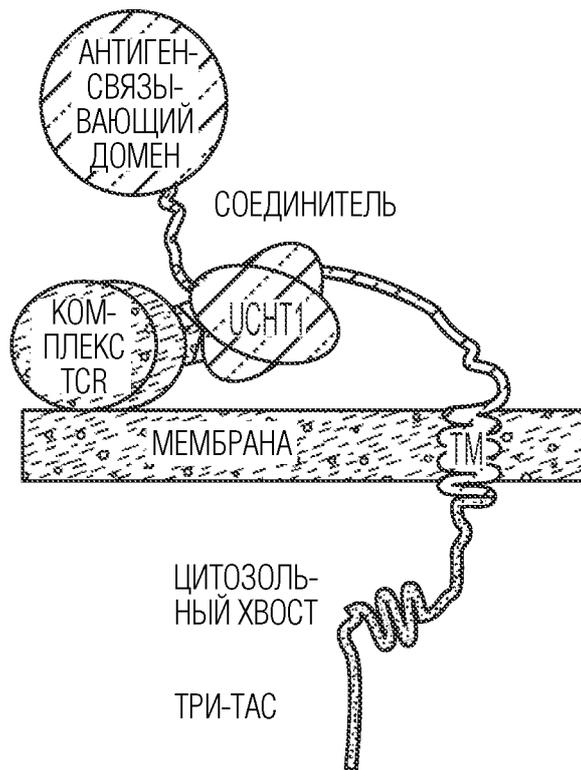
ФИГ. 2А



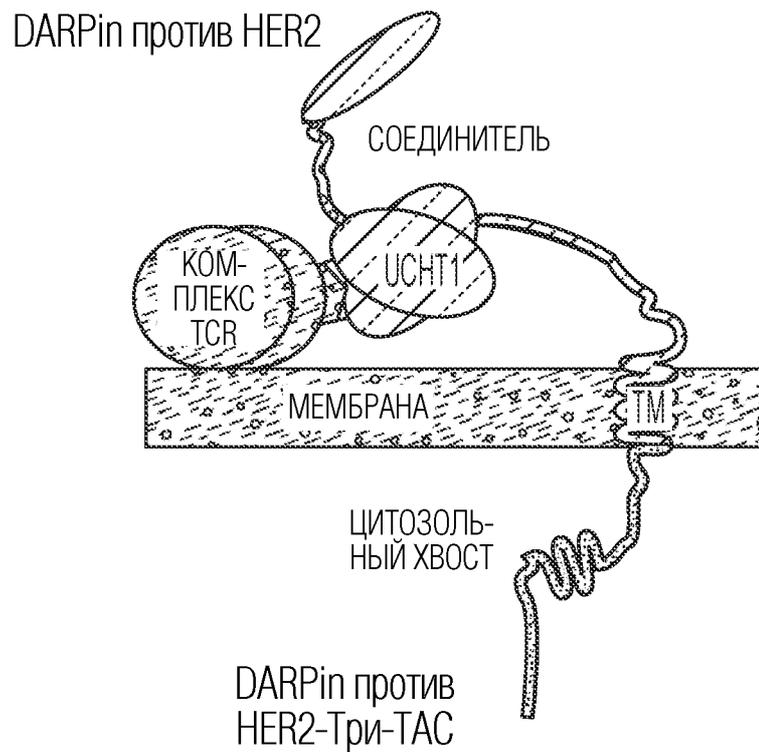
ФИГ. 2В



ФИГ. 2С



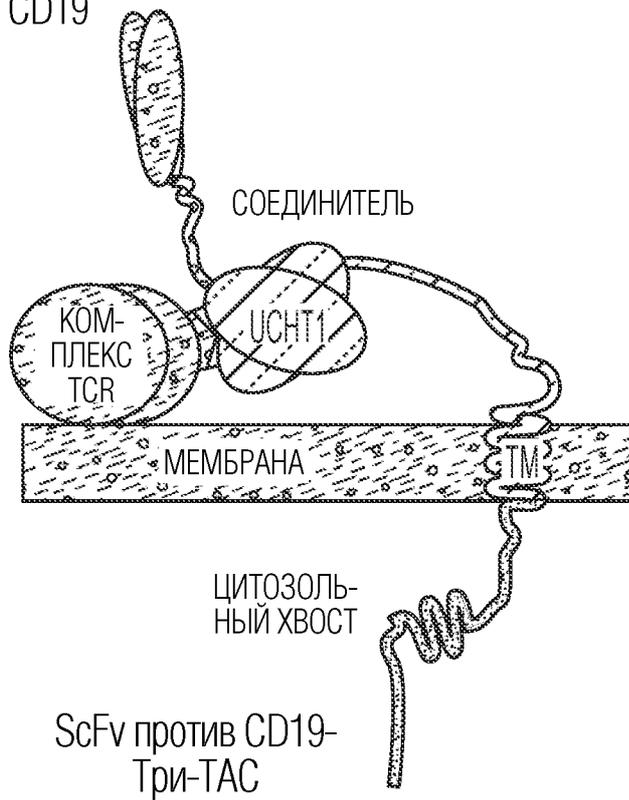
ФИГ. 3А



ФИГ. 3В

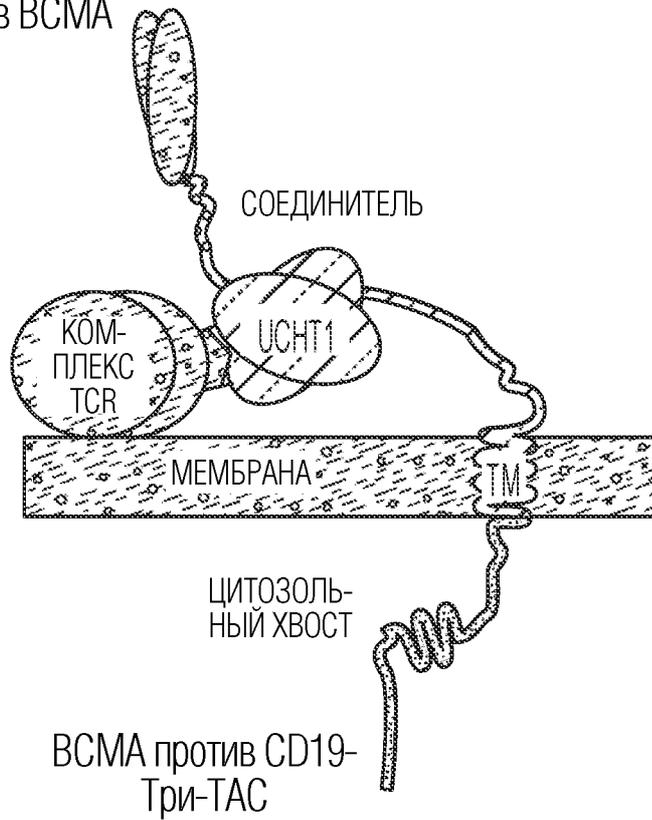
7/57

ScFv против CD19



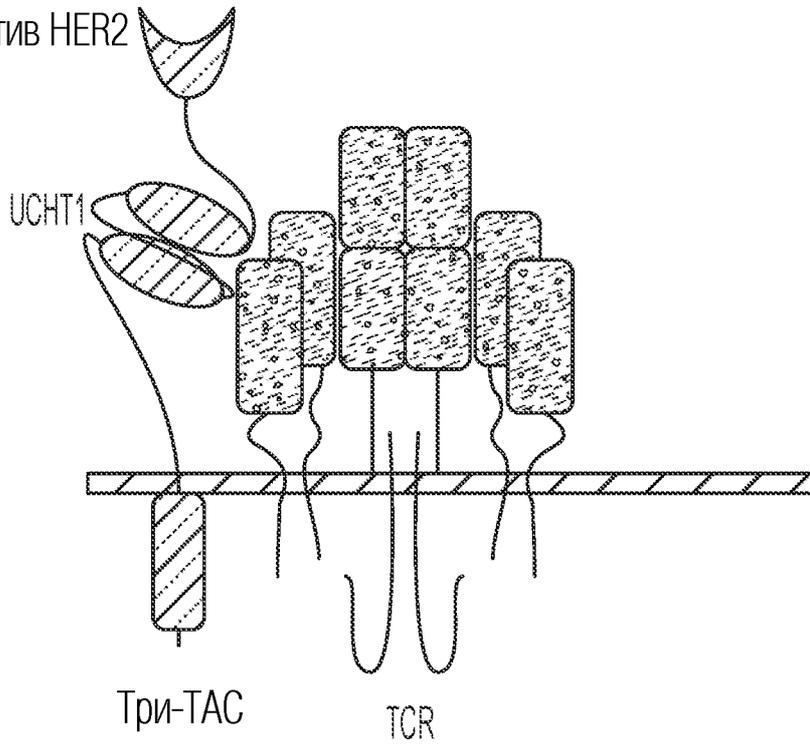
ФИГ. 3С

ScFv против ВСМА



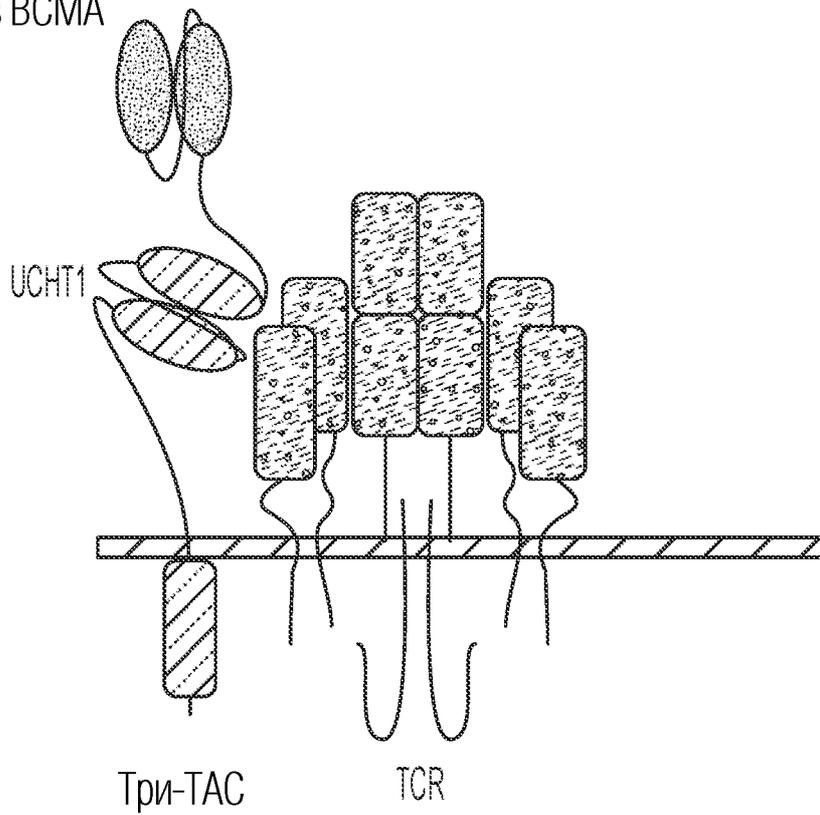
ФИГ. 3D

DARPin против HER2

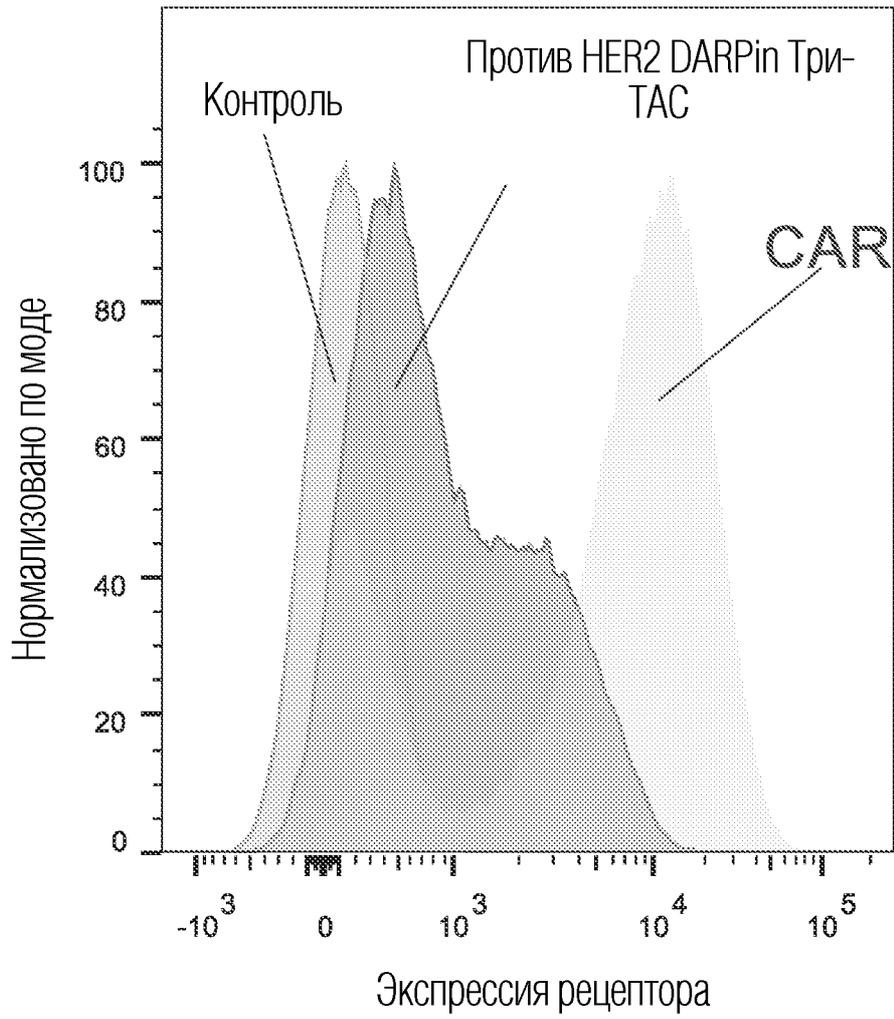


ФИГ. 3Е

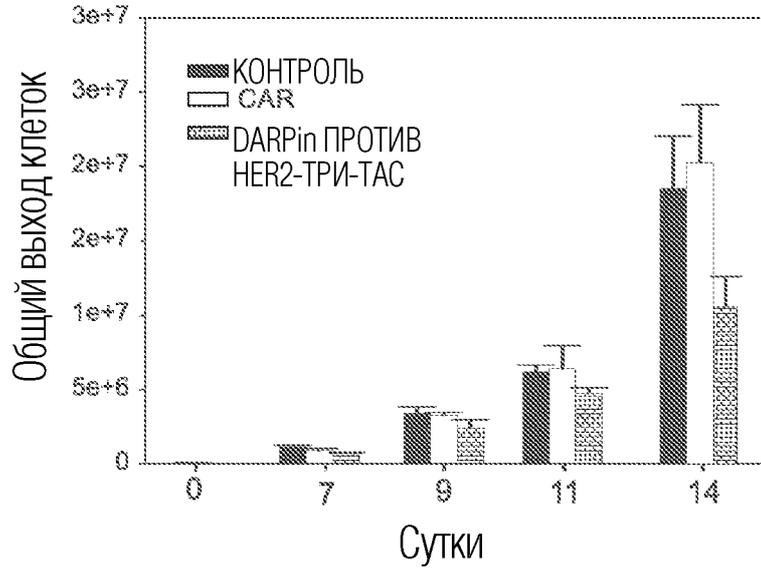
ScFv против BCMA



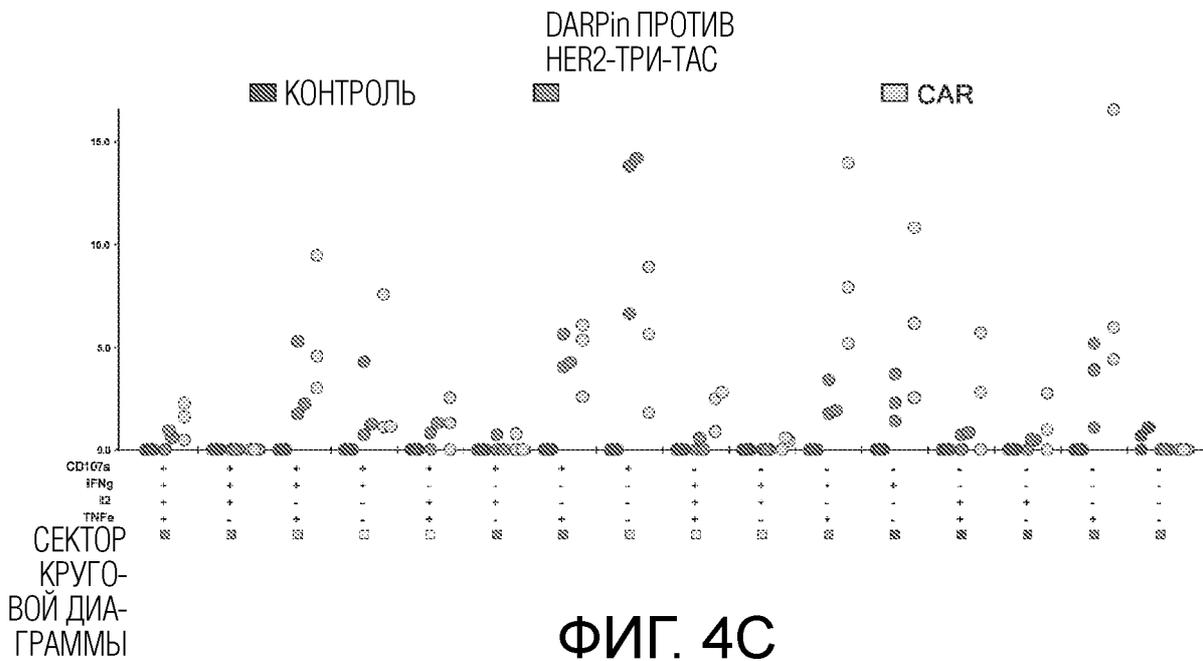
ФИГ. 3F



ФИГ. 4А

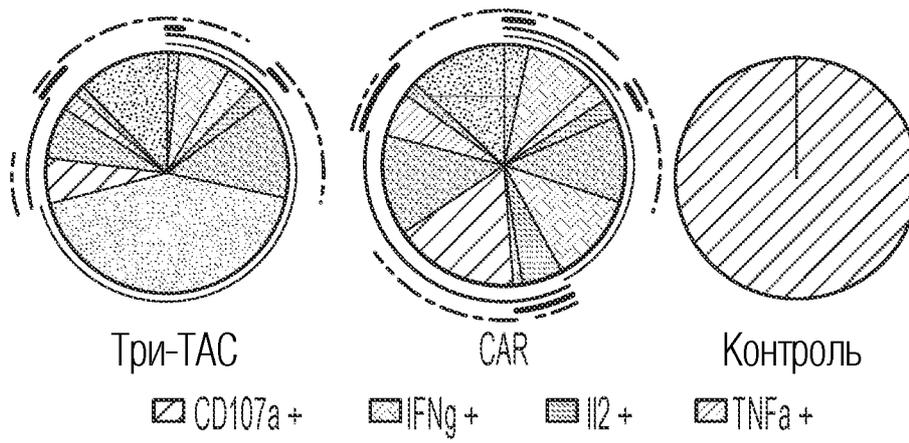


ФИГ. 4В

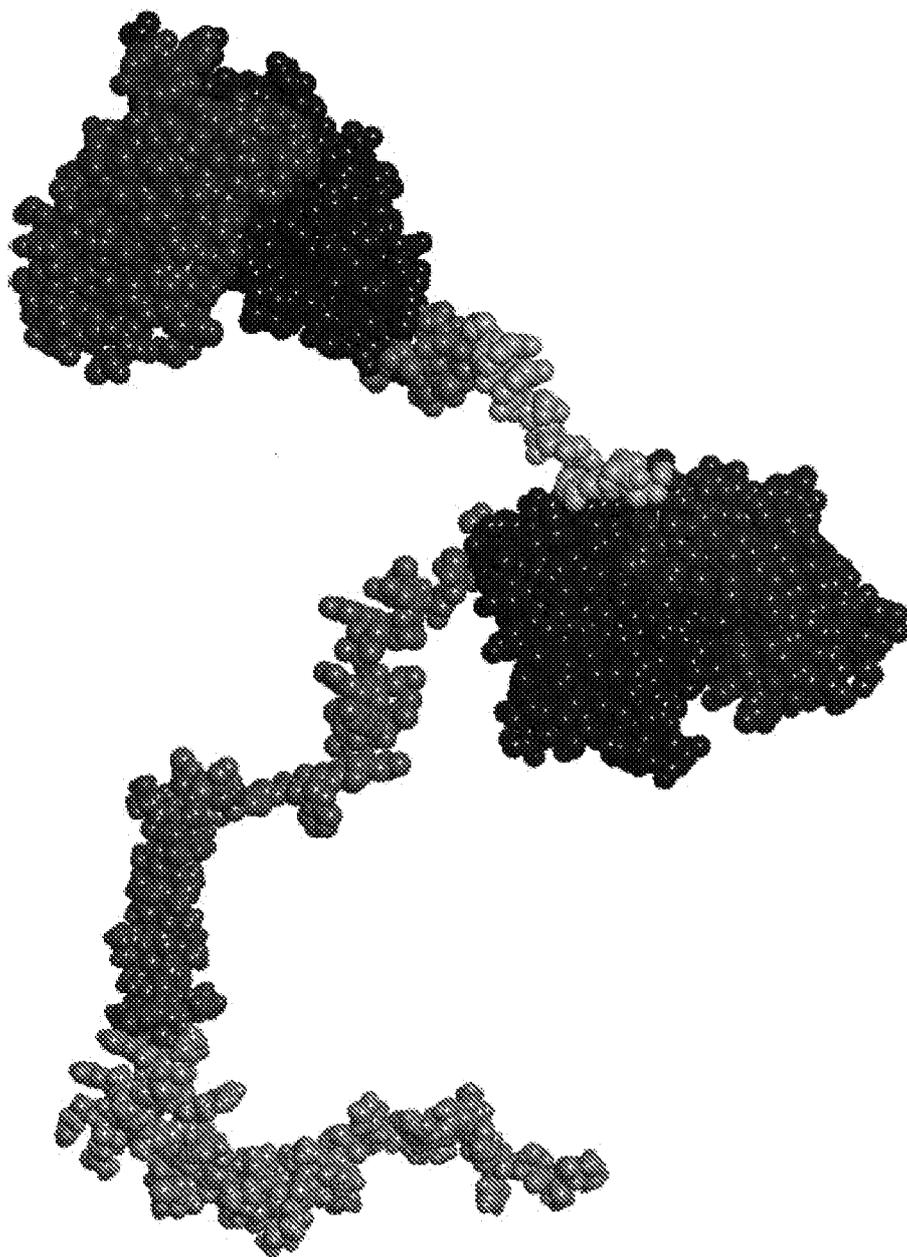


СЕКТОР  
КРУГО-  
ВОЙ ДИА-  
ГРАММЫ

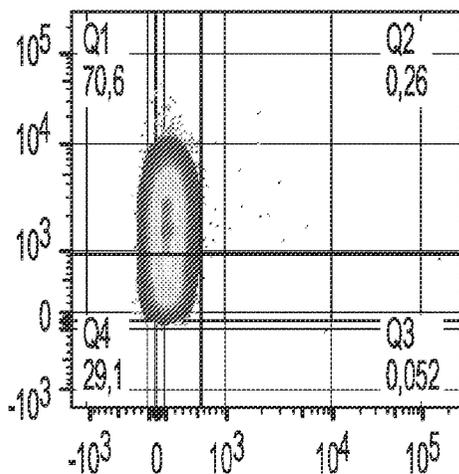
ФИГ. 4С



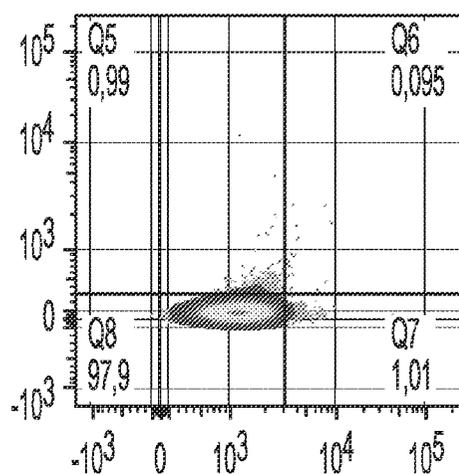
ФИГ. 4D



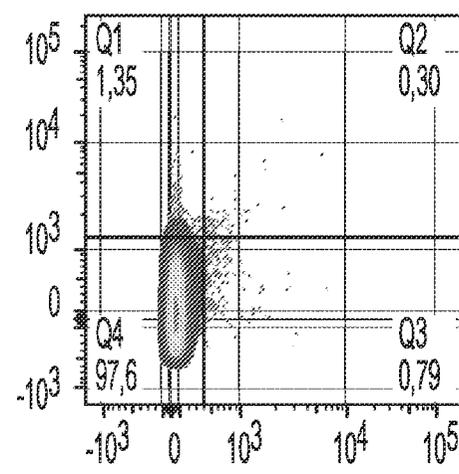
ФИГ. 5



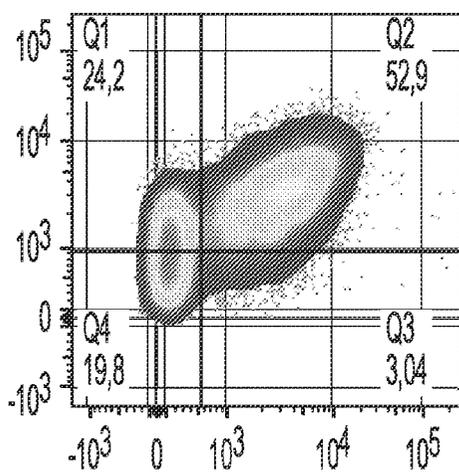
ФИГ. 6А



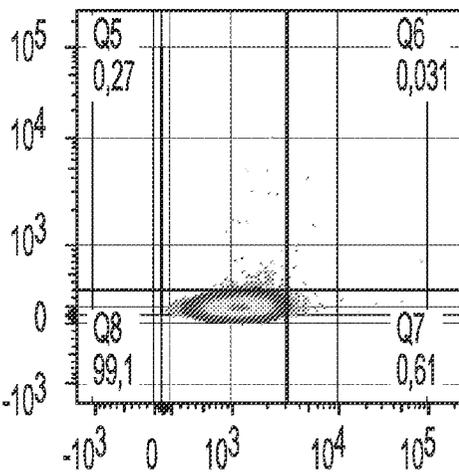
ФИГ. 6В



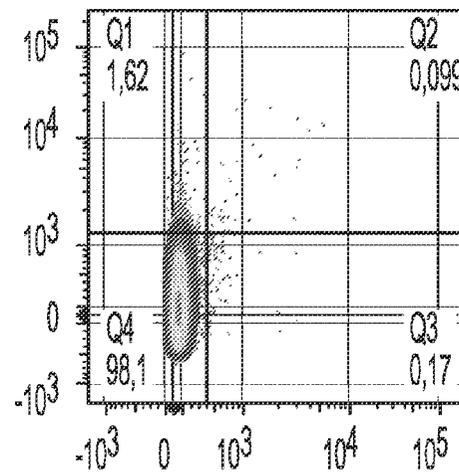
ФИГ. 6С



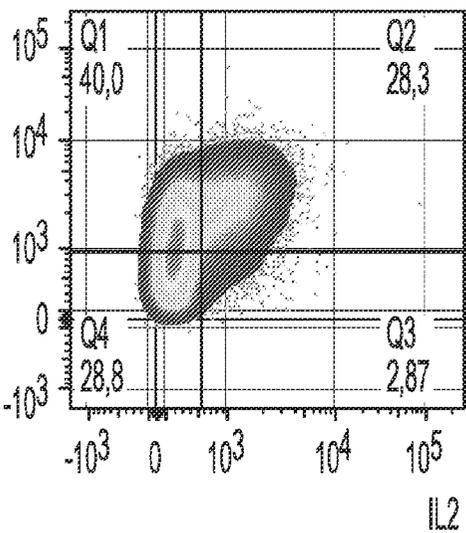
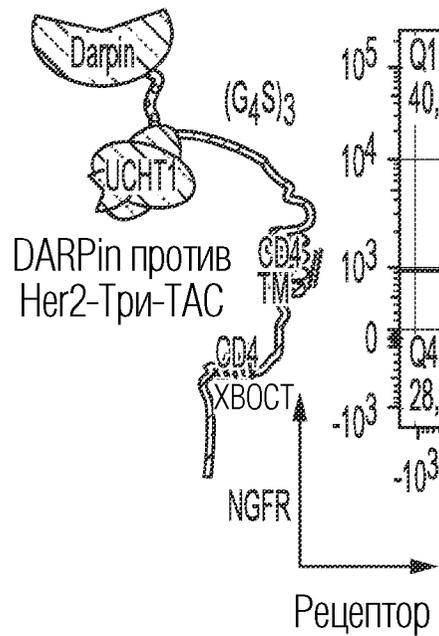
ФИГ. 6D



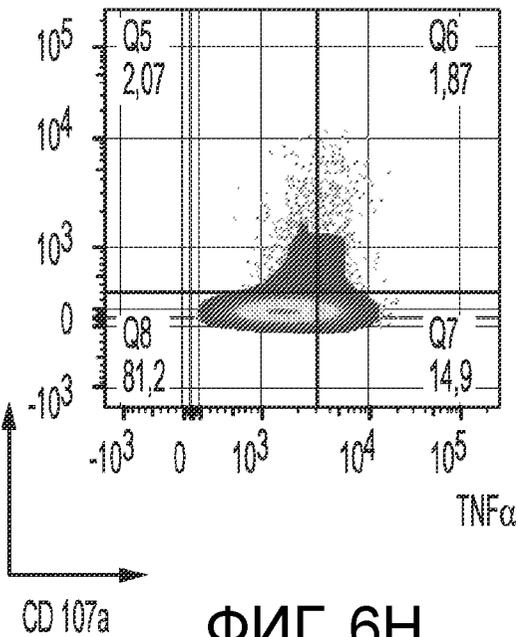
ФИГ. 6Е



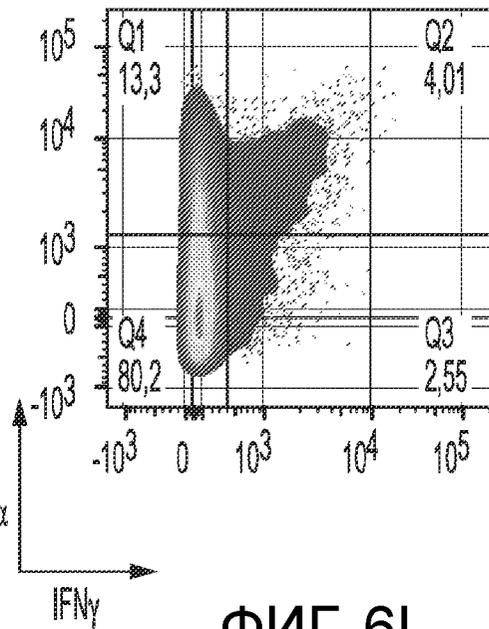
ФИГ. 6F



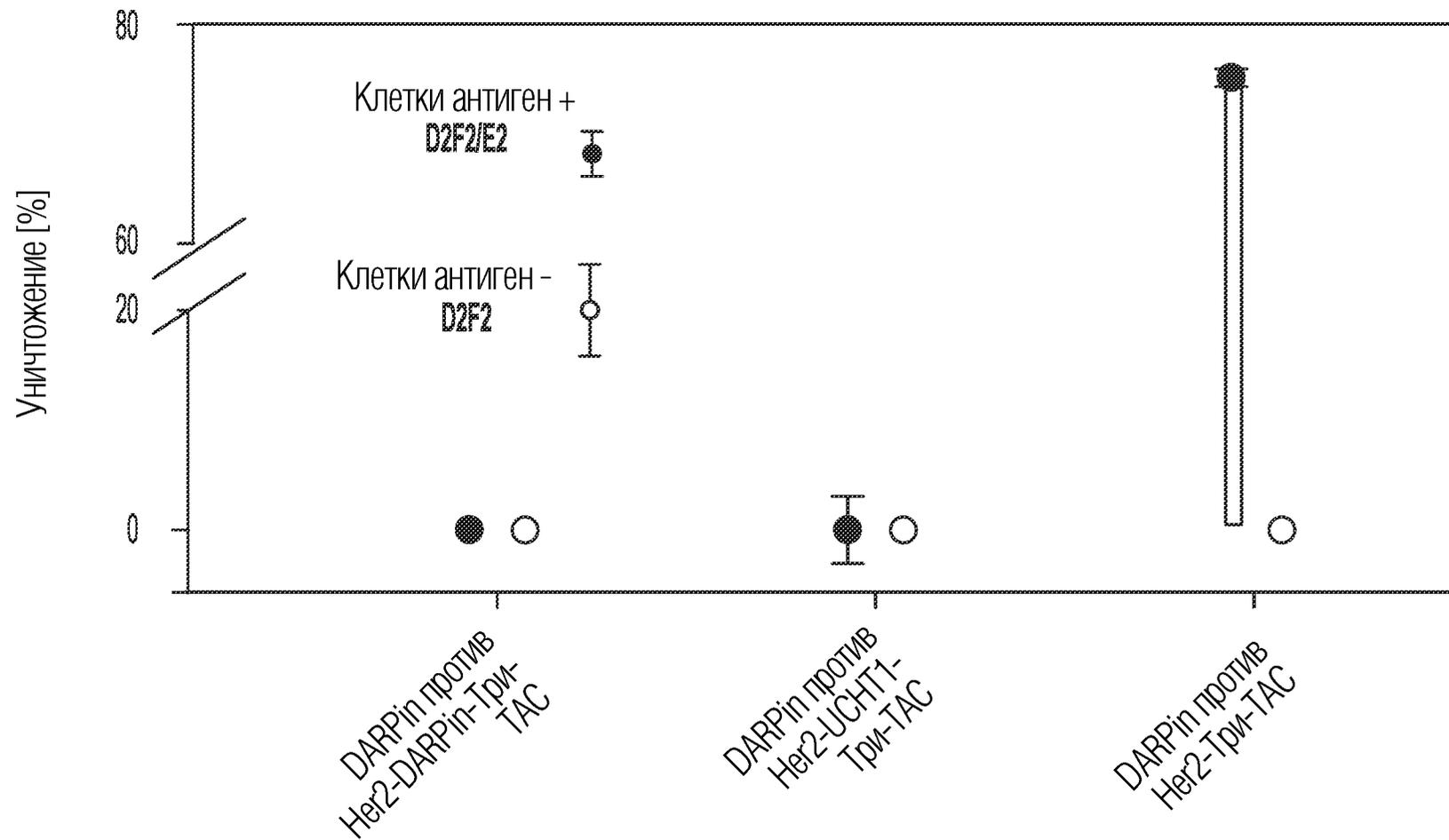
ФИГ. 6G



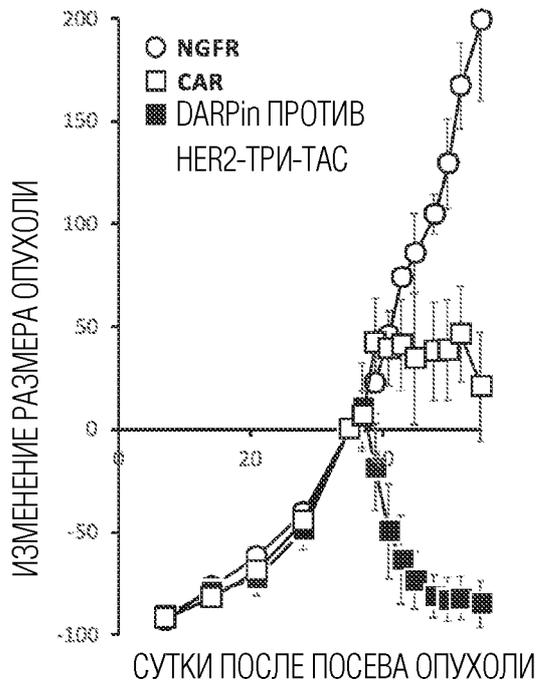
ФИГ. 6H



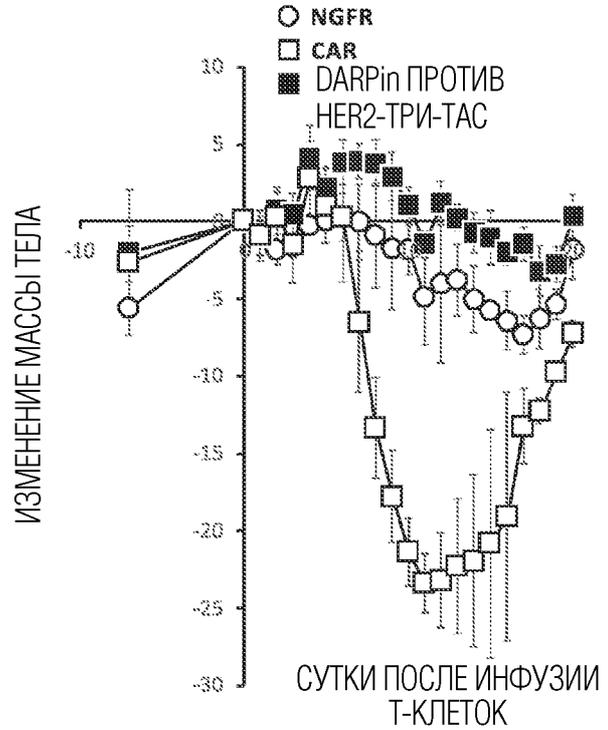
ФИГ. 6I



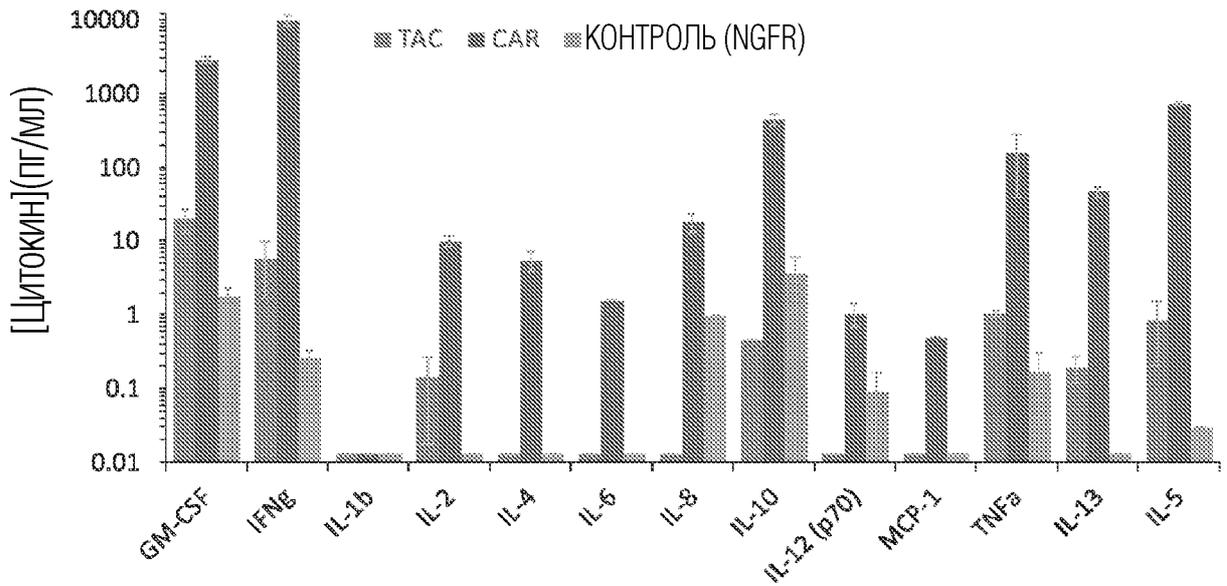
ФИГ. 6J



ФИГ. 7А

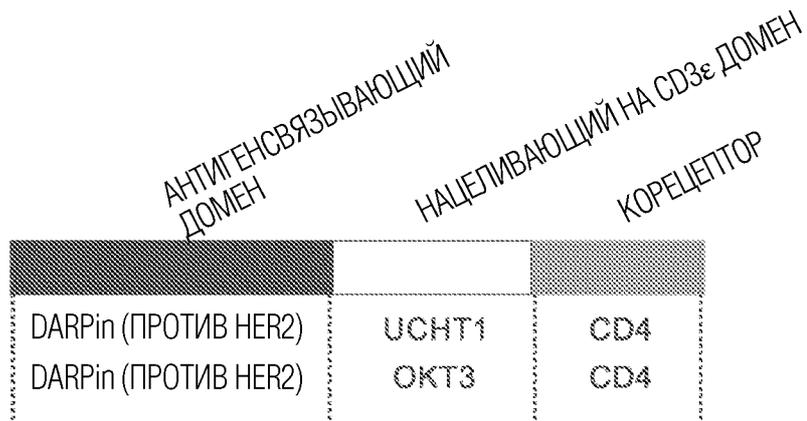


ФИГ. 7В

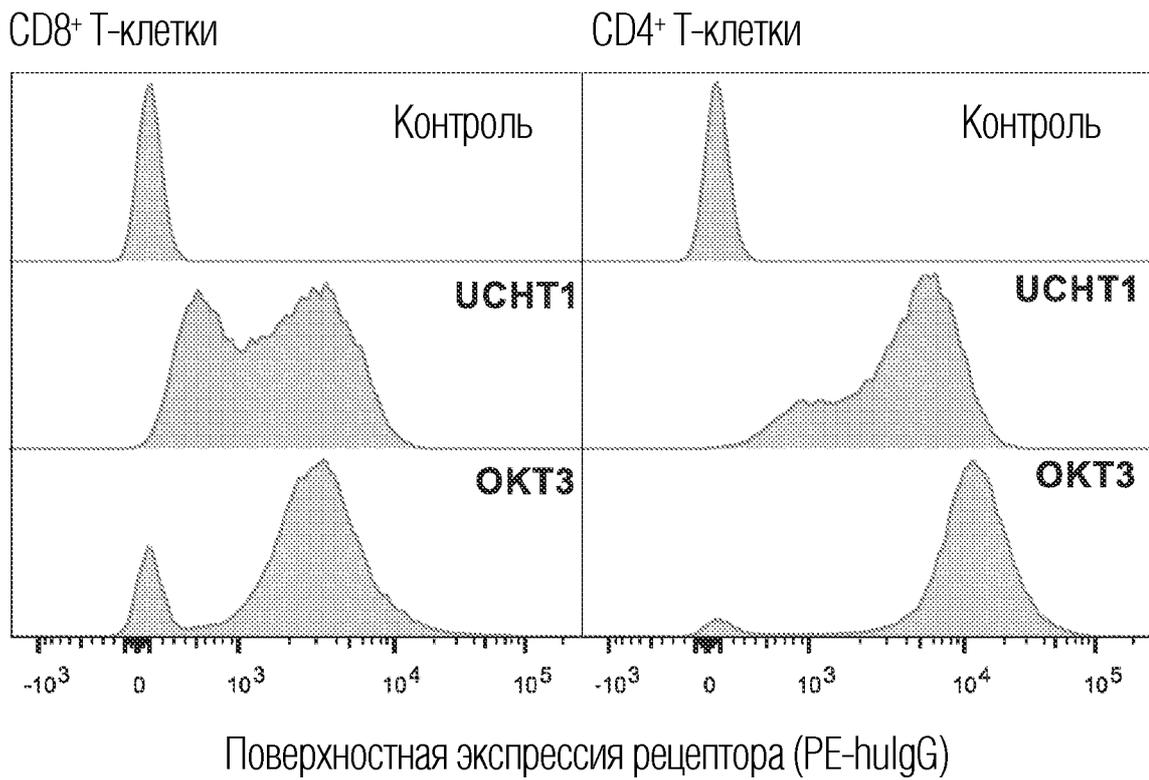


ФИГ. 7С

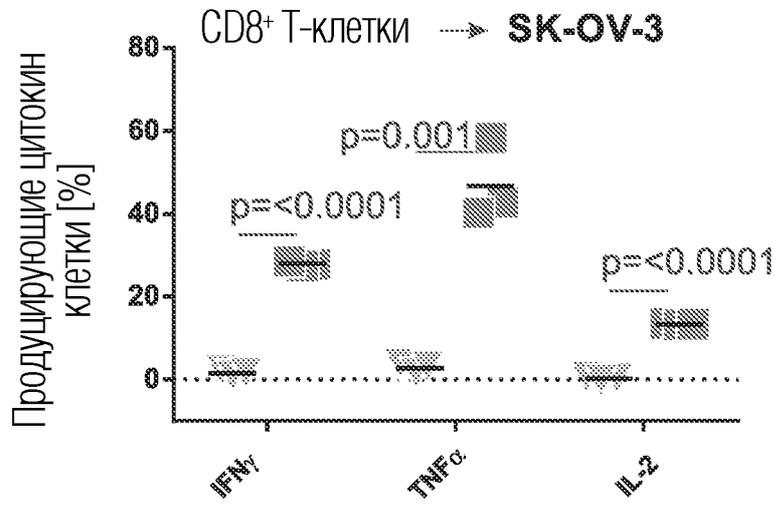
17/57



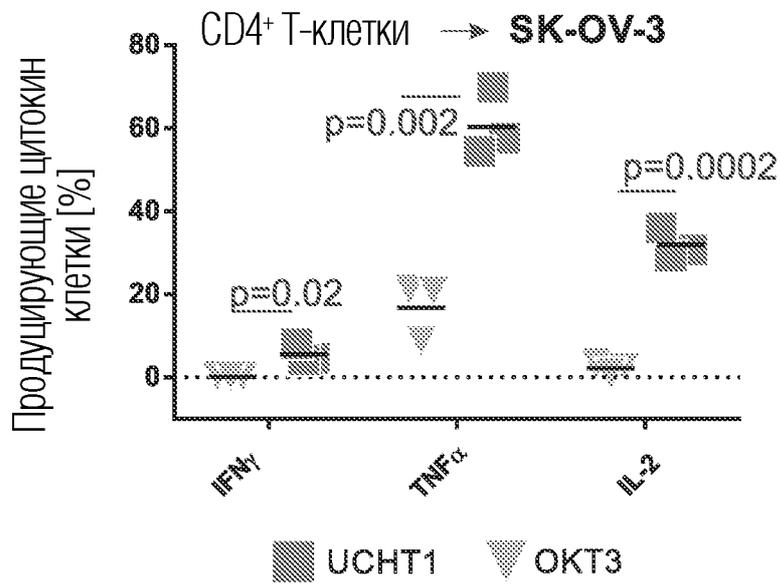
ФИГ. 8А



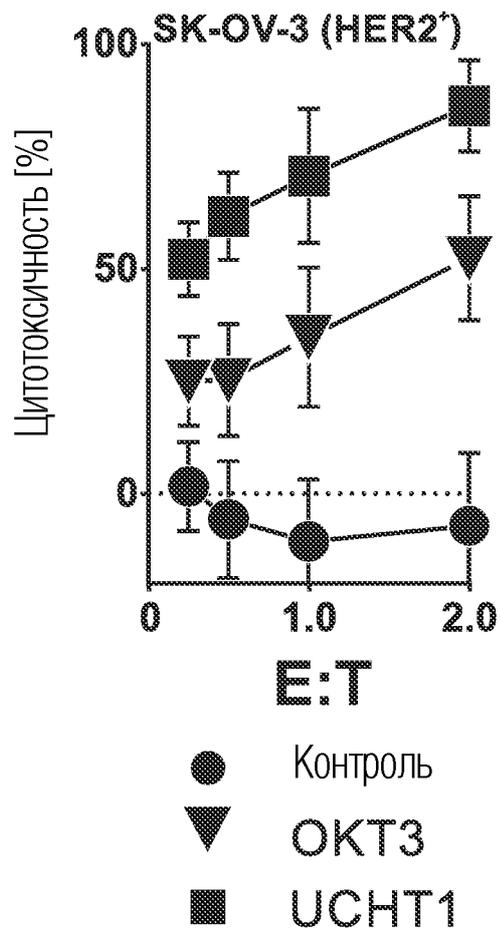
ФИГ. 8В



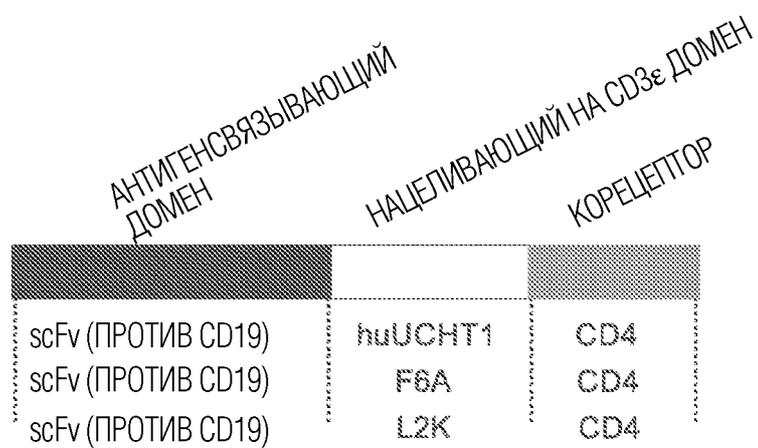
ФИГ. 8С



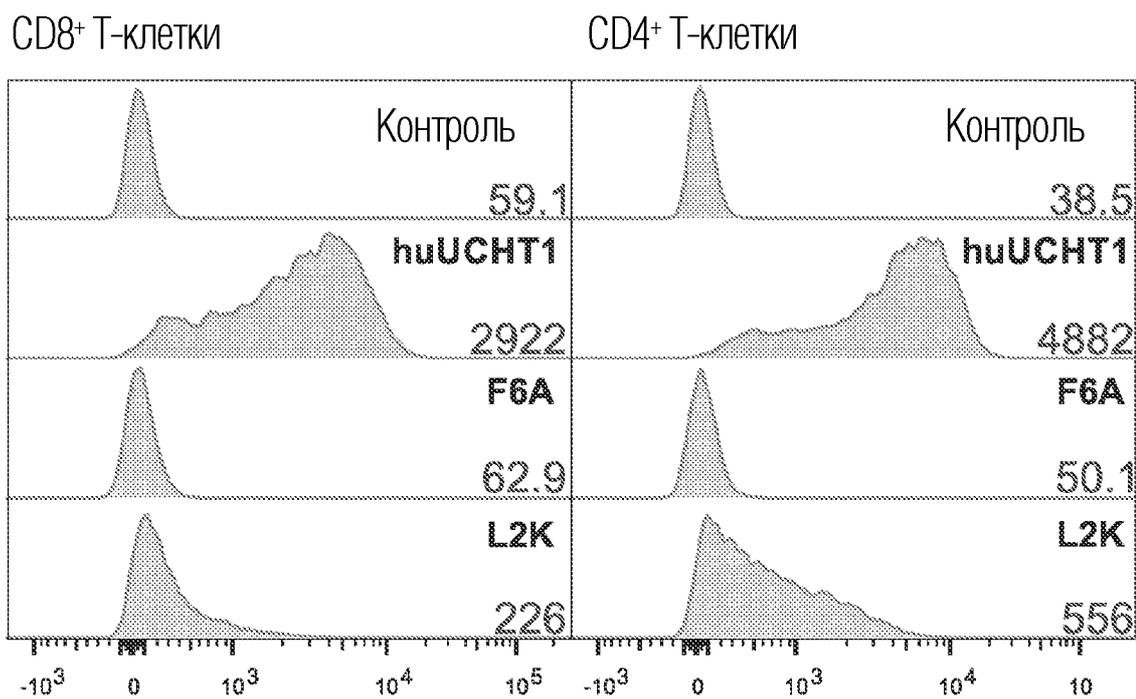
ФИГ. 8С1



ФИГ. 8D

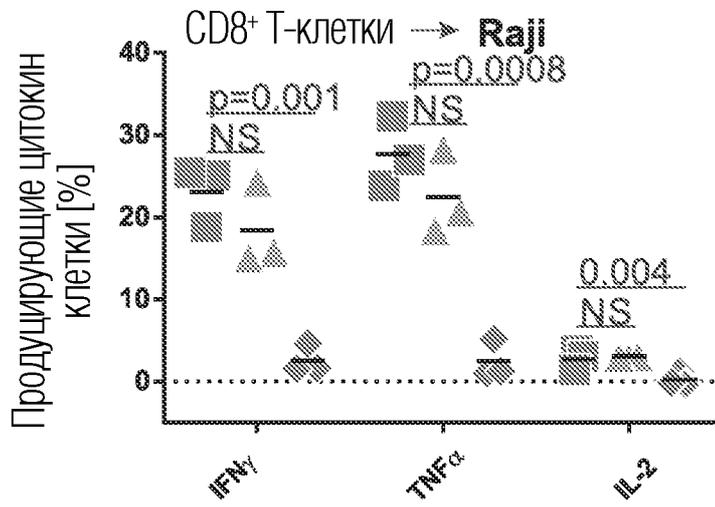


ФИГ. 8Е

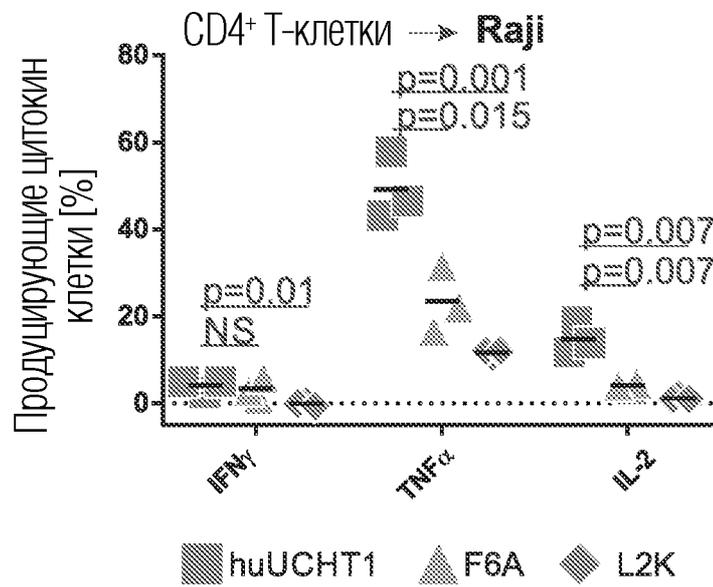


Поверхностная экспрессия рецептора (APC-стрептавидин)

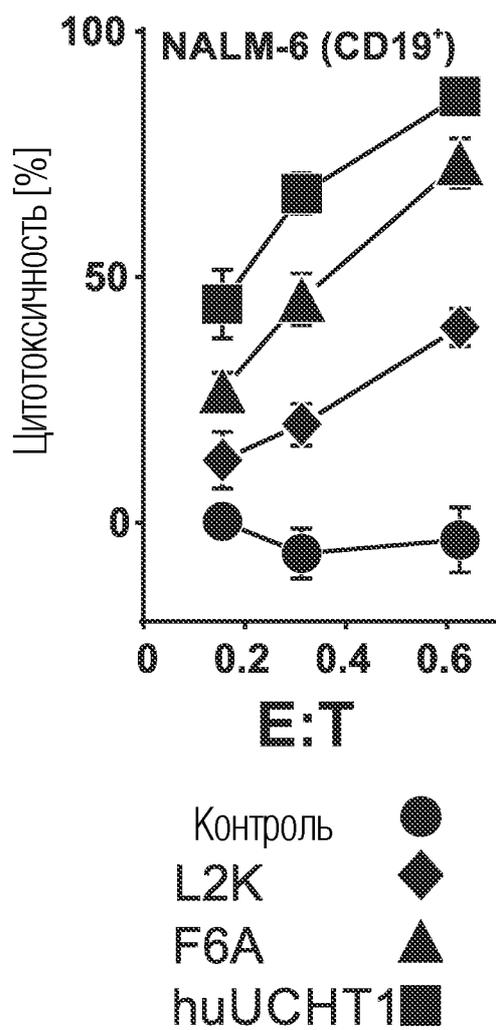
ФИГ. 8F



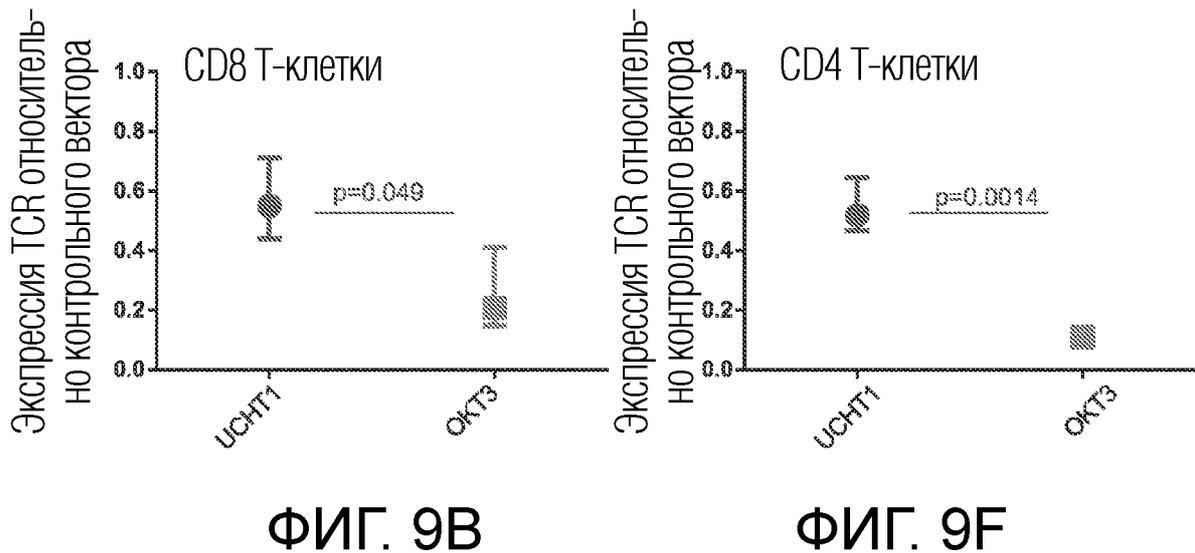
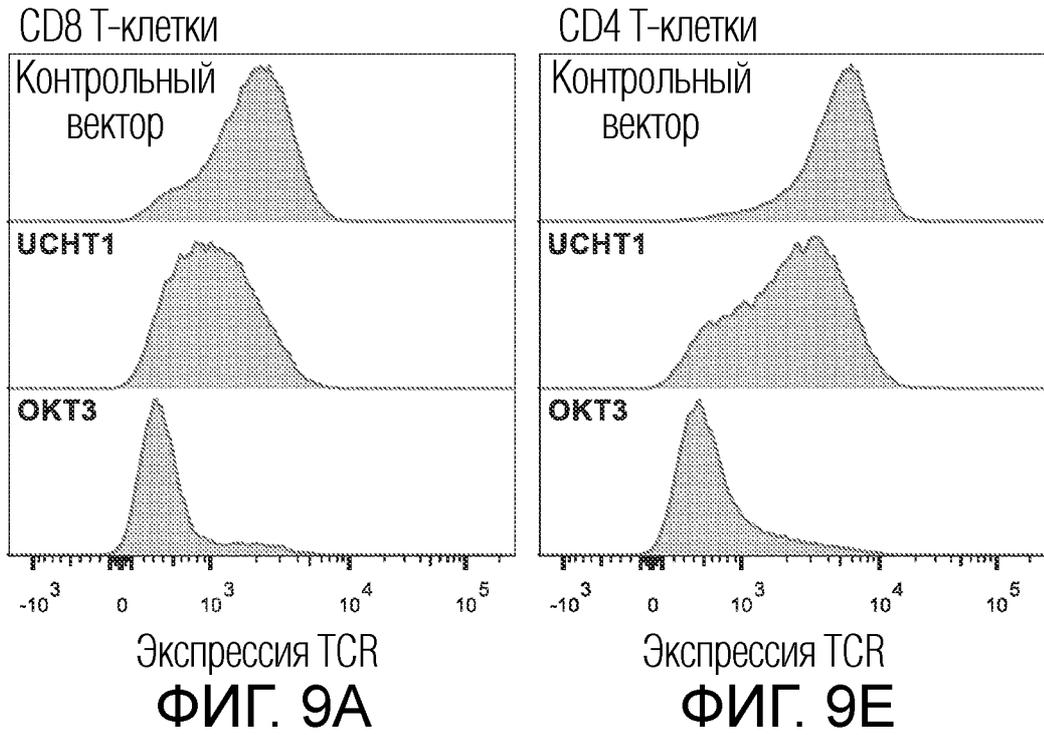
ФИГ. 8G

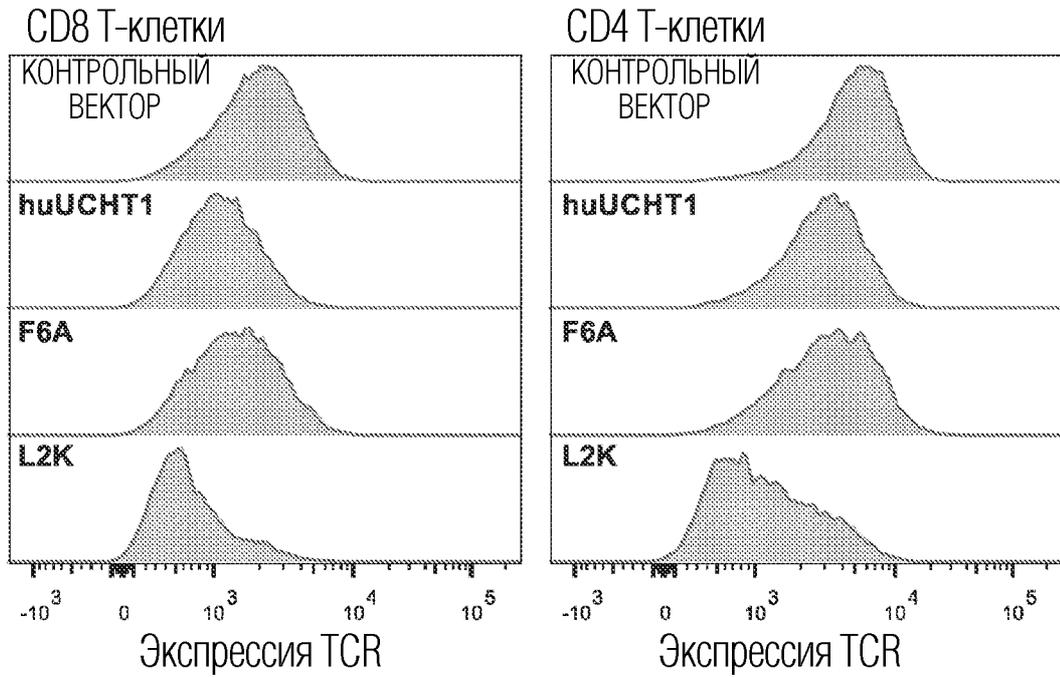


ФИГ. 8G1



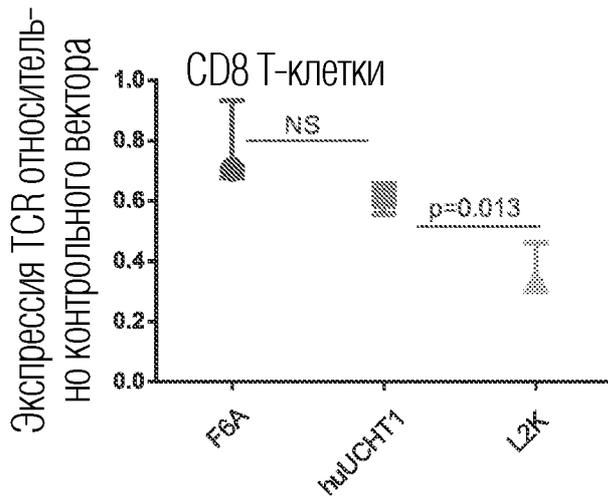
ФИГ. 8Н



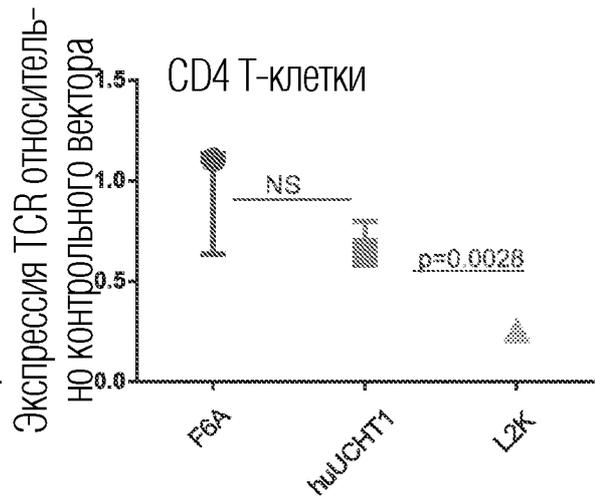


ФИГ. 9С

ФИГ. 9G



ФИГ. 9D



ФИГ. 9H



ФИГ. 10А

ГИБКИЙ СОЕДИНИТЕЛЬ

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

СОЕДИНИТЕЛЬ С КОРОТКОЙ СПИРАЛЬЮ

AEAAAKEAAAKEAAAKA

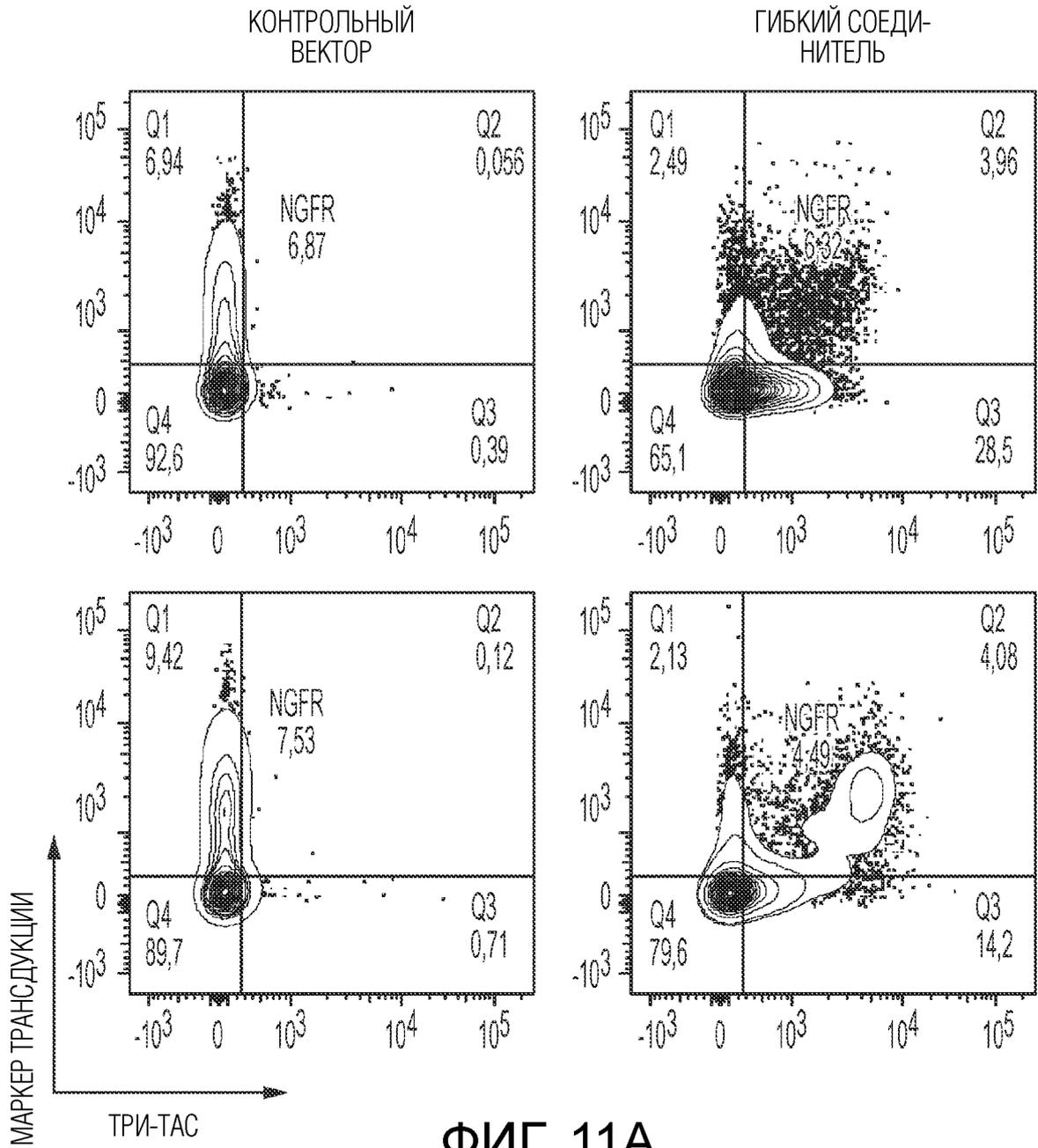
СОЕДИНИТЕЛЬ С ДЛИННОЙ СПИРАЛЬЮ

AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA

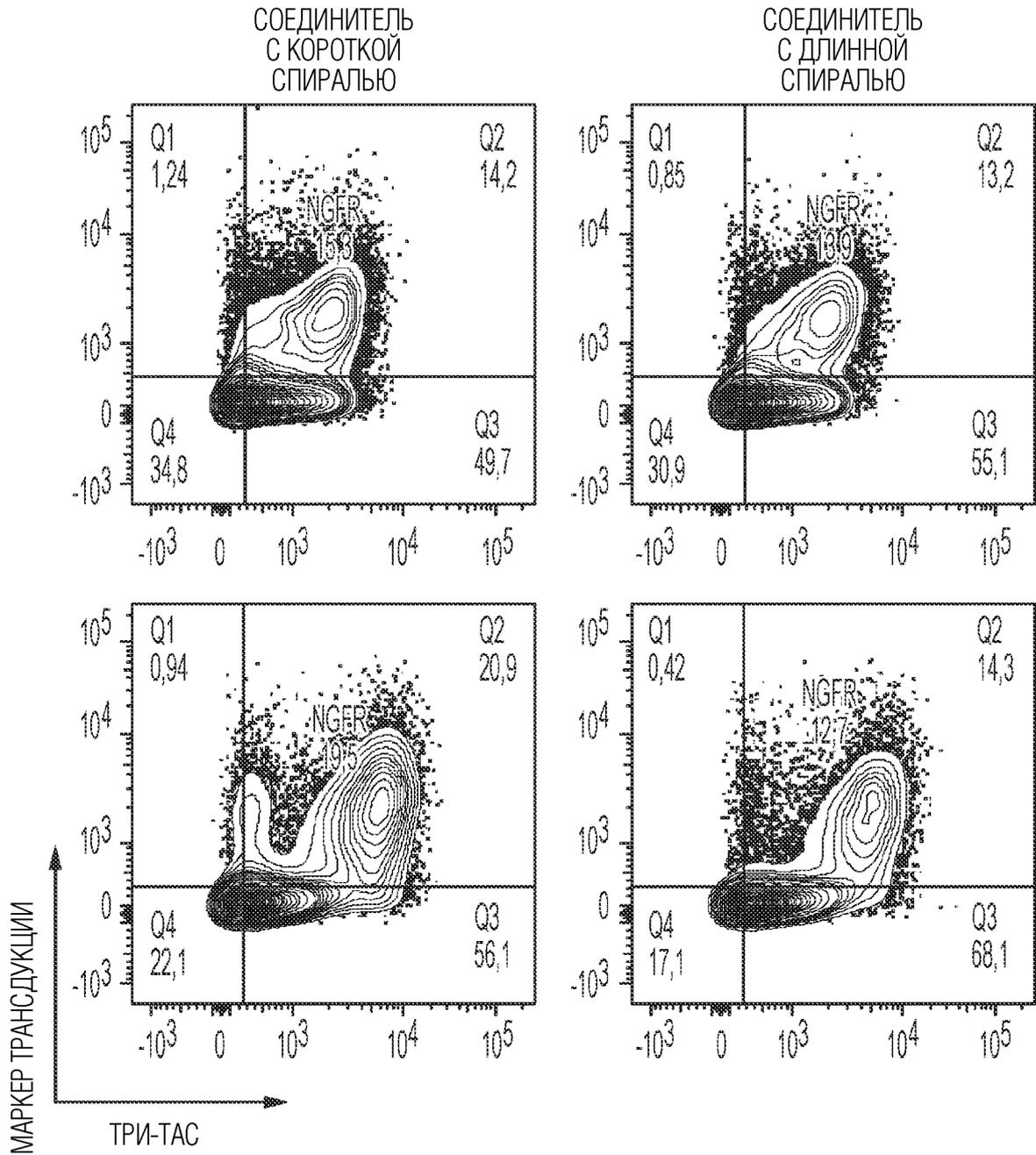
СОЕДИНИТЕЛЬ С БОЛЬШИМ ДОМЕНОМ

IVVLAFAQASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWWQAERASSSKSWITFDLKNKE  
 VSVKRVTDQPKLQMGKKLPLHLTLPOALPQYAGSGNLTALALEAKTGKLGHEVNLVVMRATQ  
 LQKNLTCEVWGPTSPKLMLSLKLENKEAKVSKREKAVWVLNPEAGMWQCLLSDSGQVLE  
 SNIKVLPAA

ФИГ. 10В

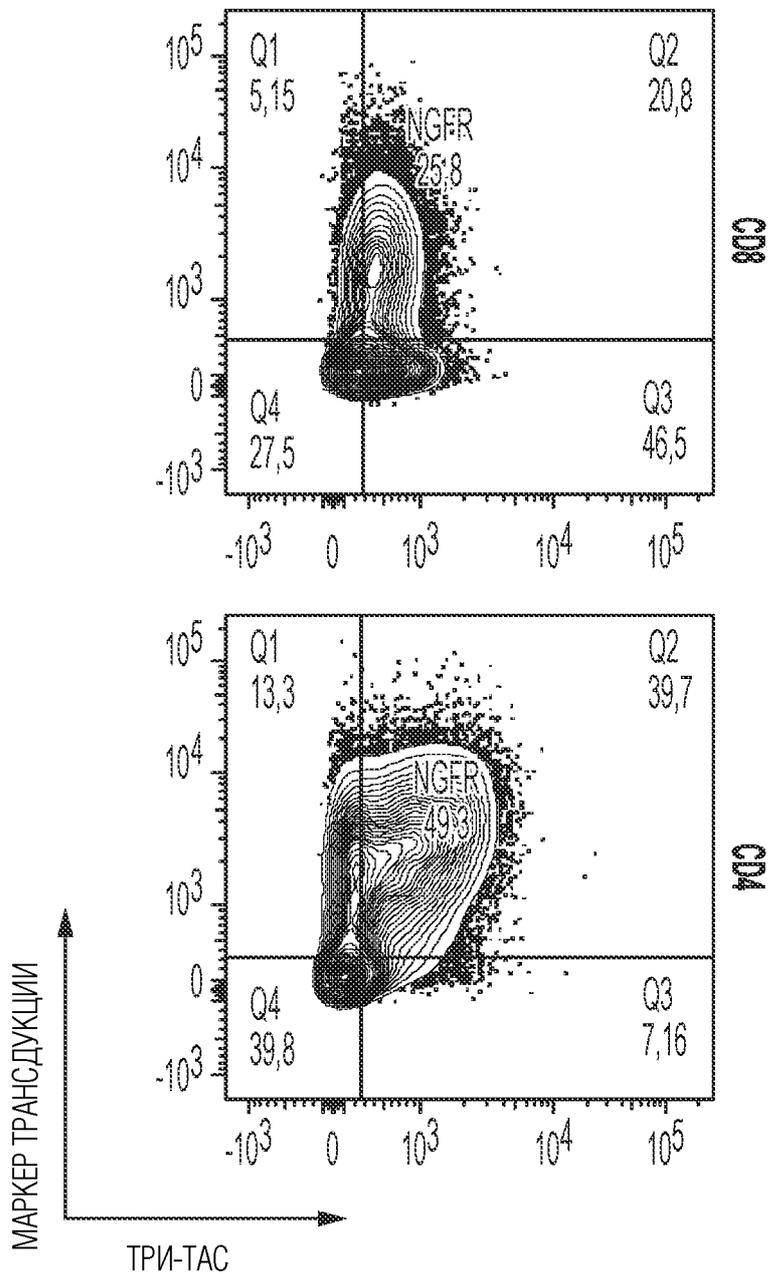


ФИГ. 11А

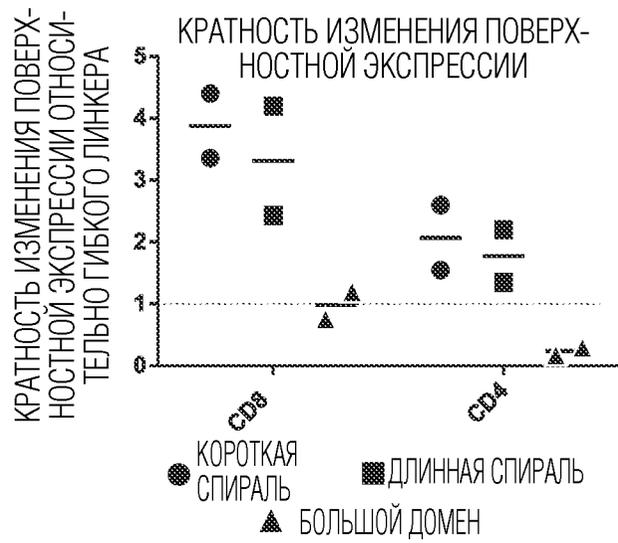


ФИГ. 11А  
ПРОДОЛЖЕНИЕ

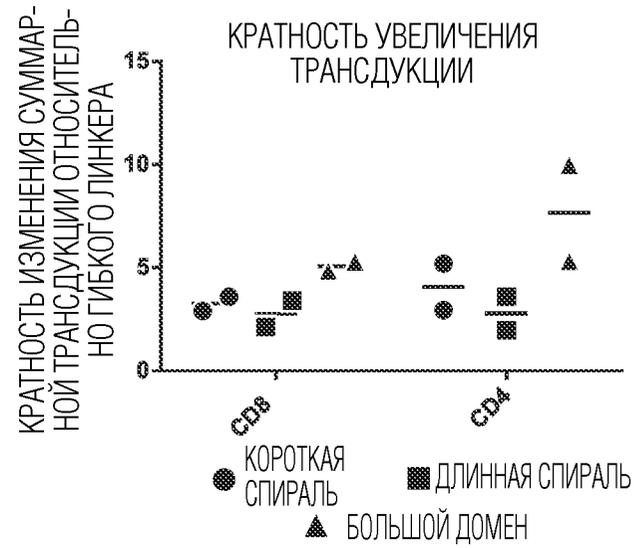
СОЕДИНИТЕЛЬ С  
ДОМЕНОМ



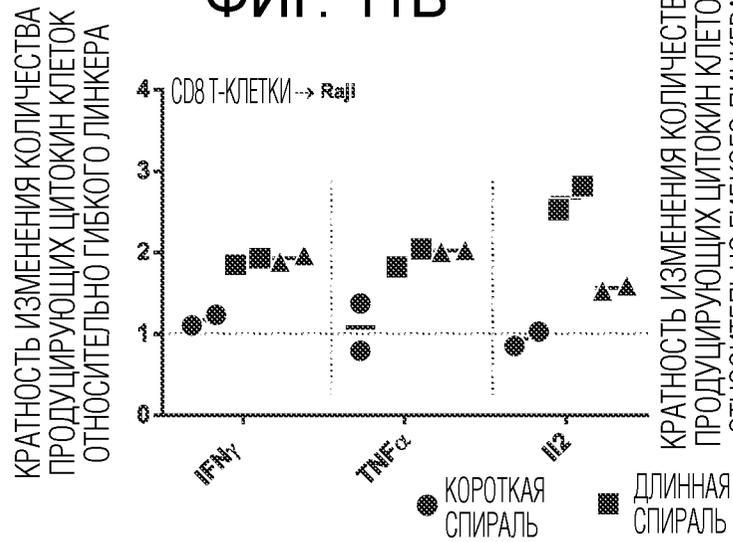
ФИГ. 11А  
ПРОДОЛЖЕНИЕ



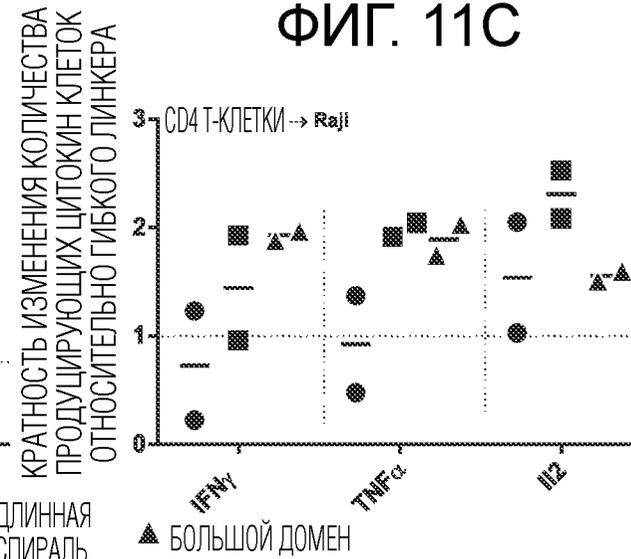
ФИГ. 11В



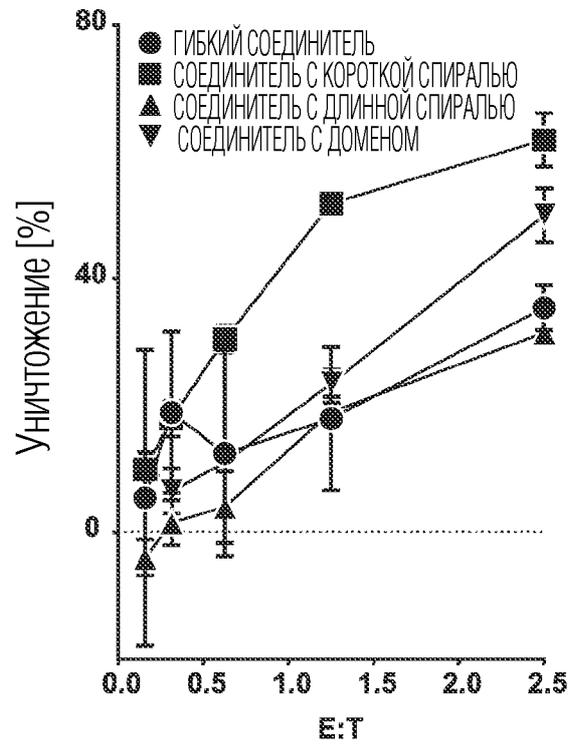
ФИГ. 11С



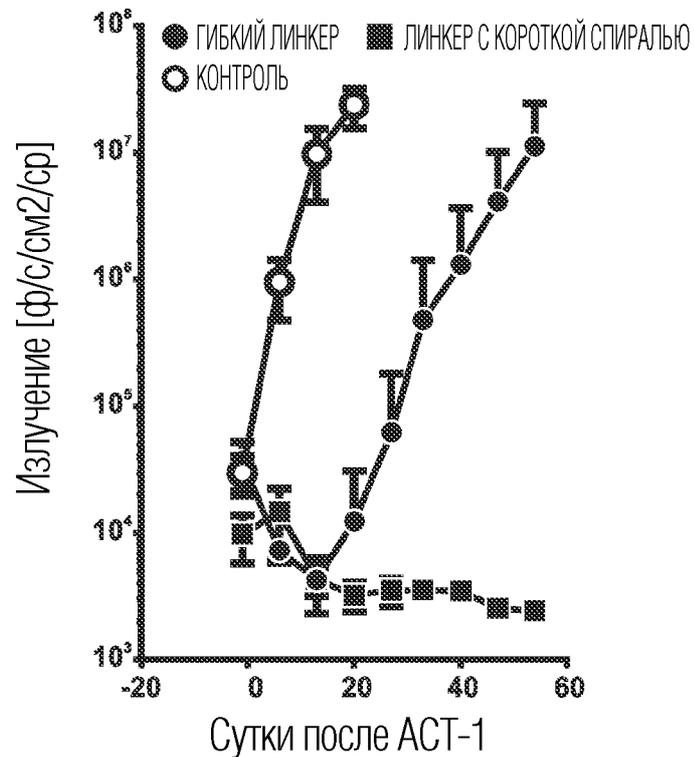
ФИГ. 11D



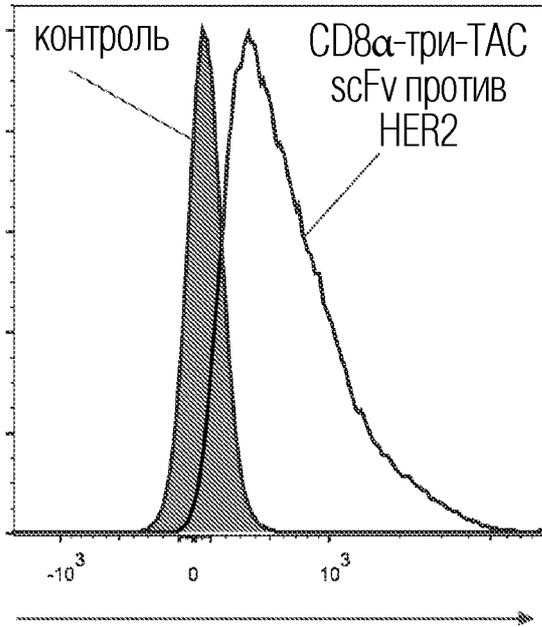
ФИГ. 11E

Цитотоксичность *in vitro*

ФИГ. 12А

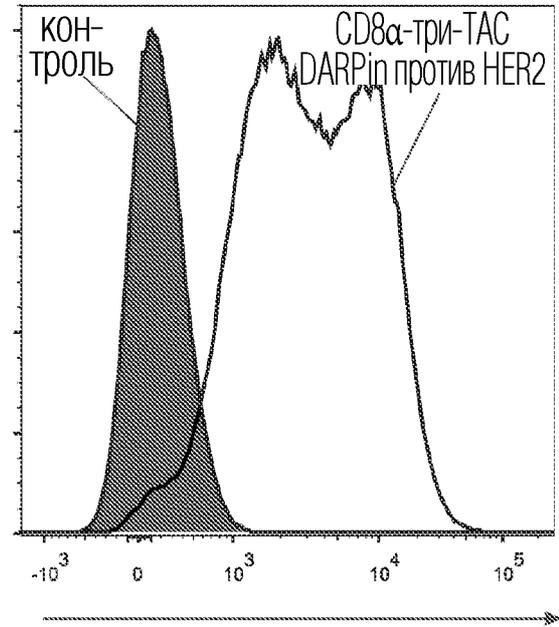
Контроль опухоли *in vivo*

ФИГ. 12В



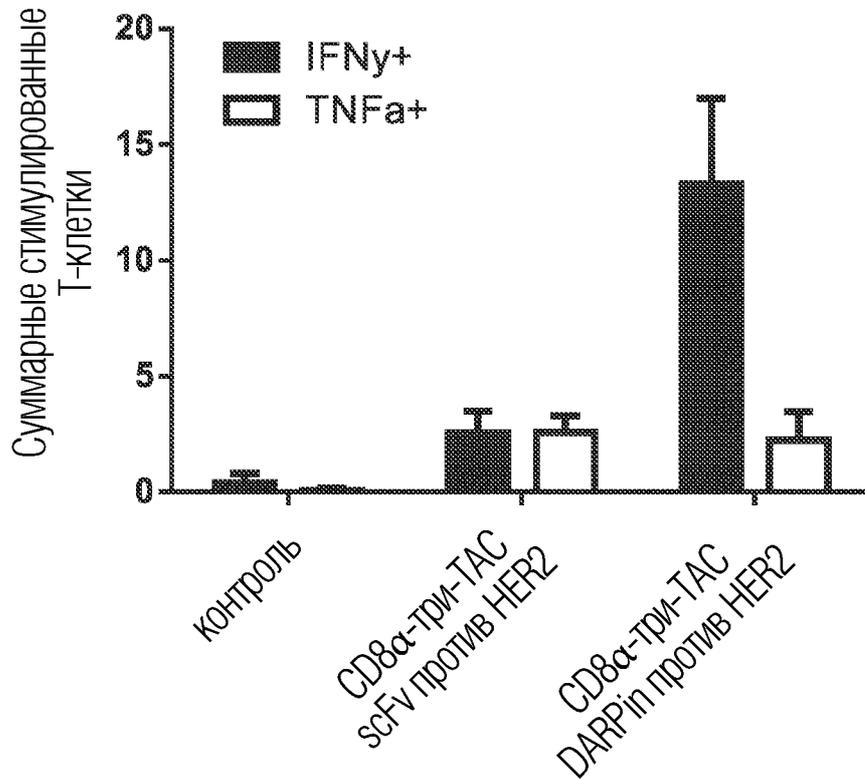
Три-TAC

ФИГ. 13А

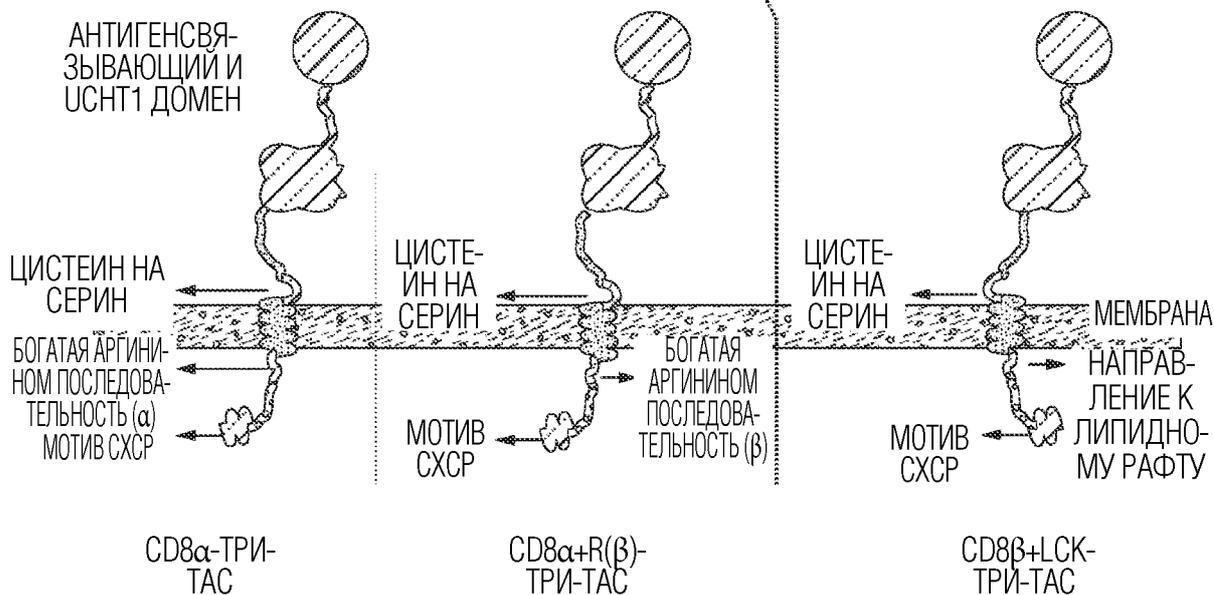
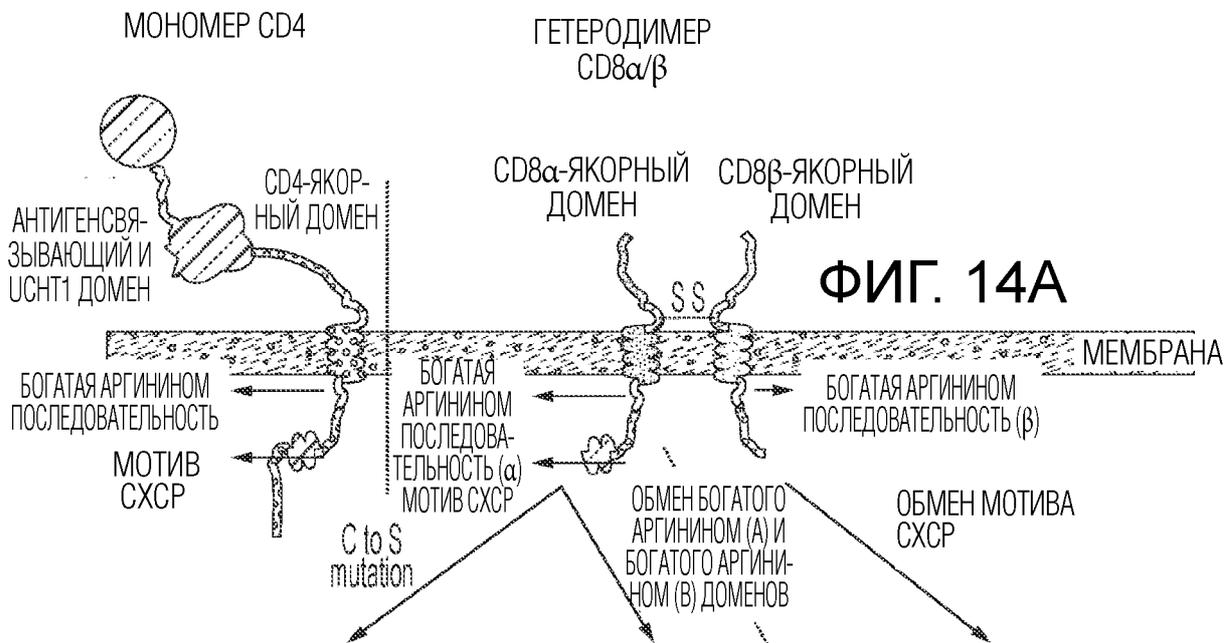


Три-TAC

ФИГ. 13С



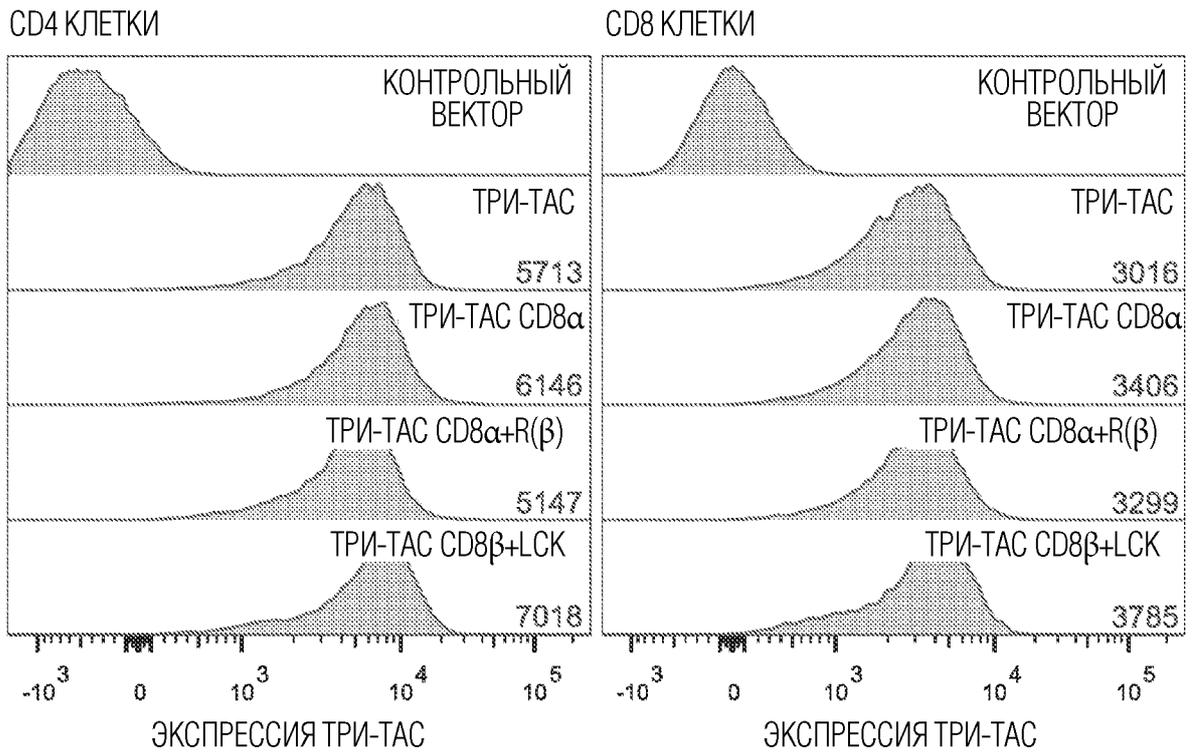
ФИГ. 13В



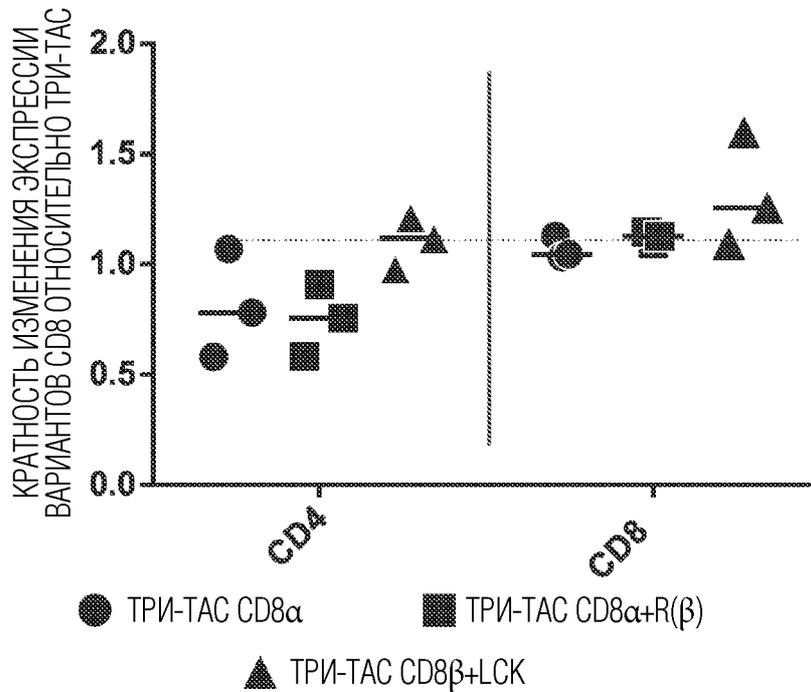
ФИГ. 14В

ФИГ. 14С

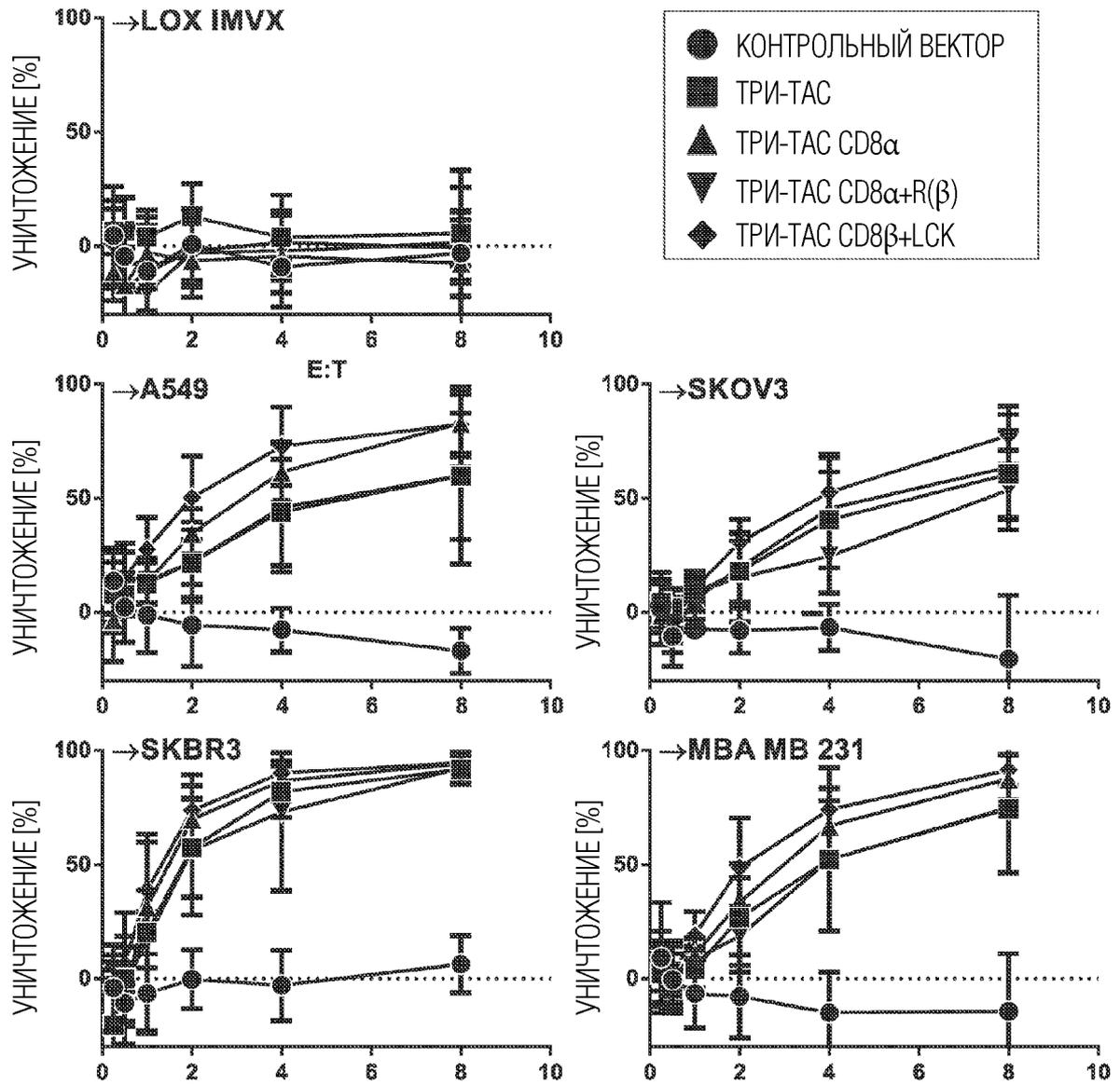
ФИГ. 14D



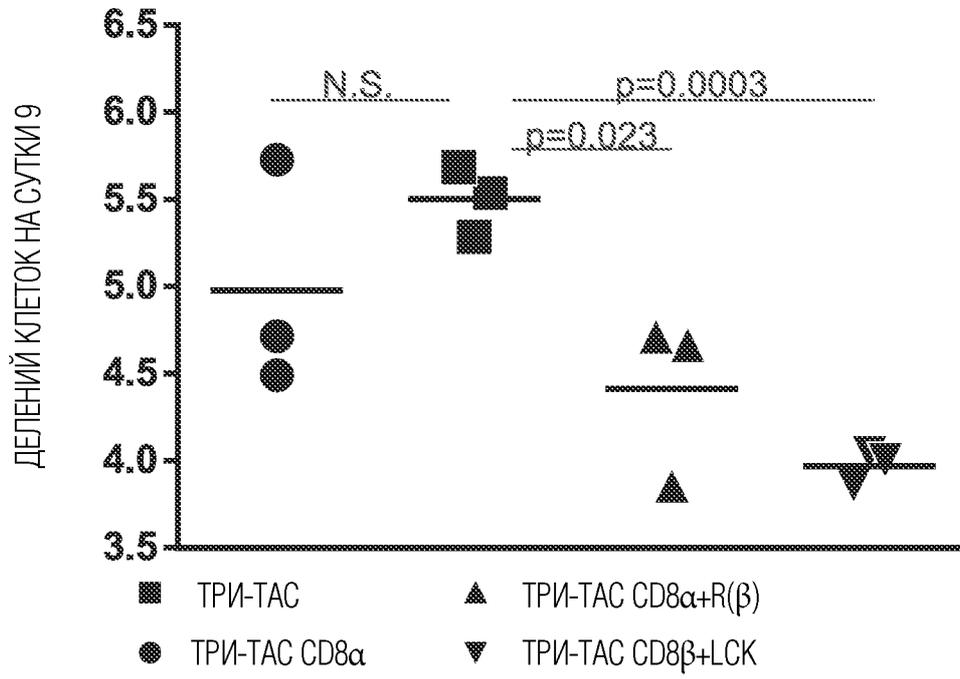
ФИГ. 15А



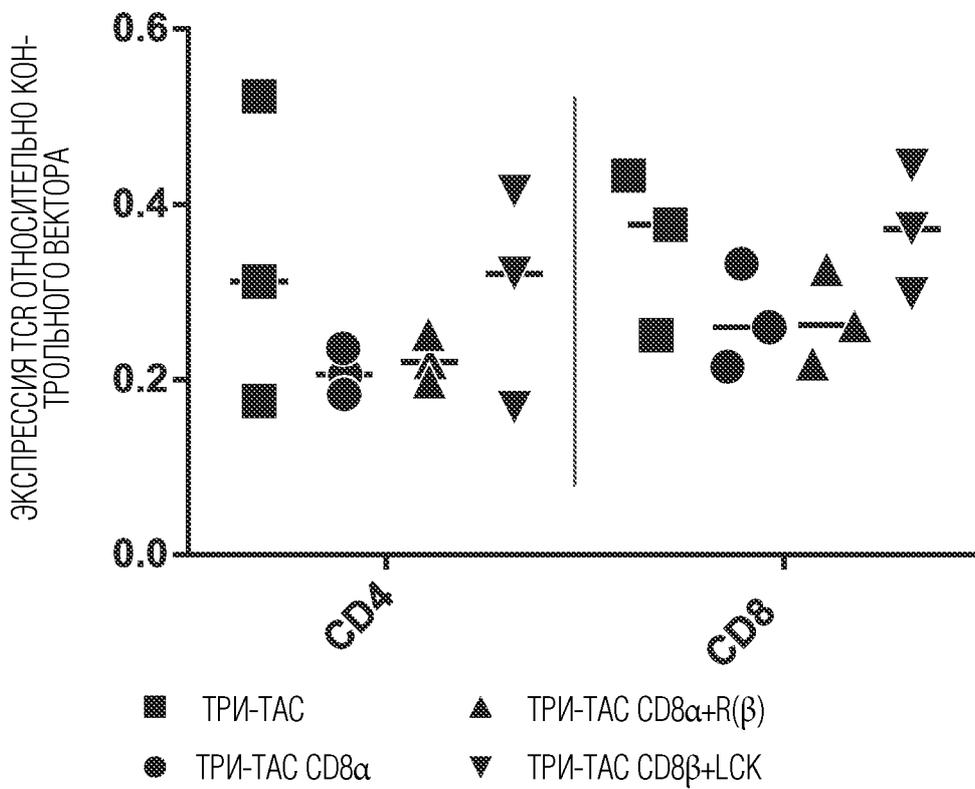
ФИГ. 15В



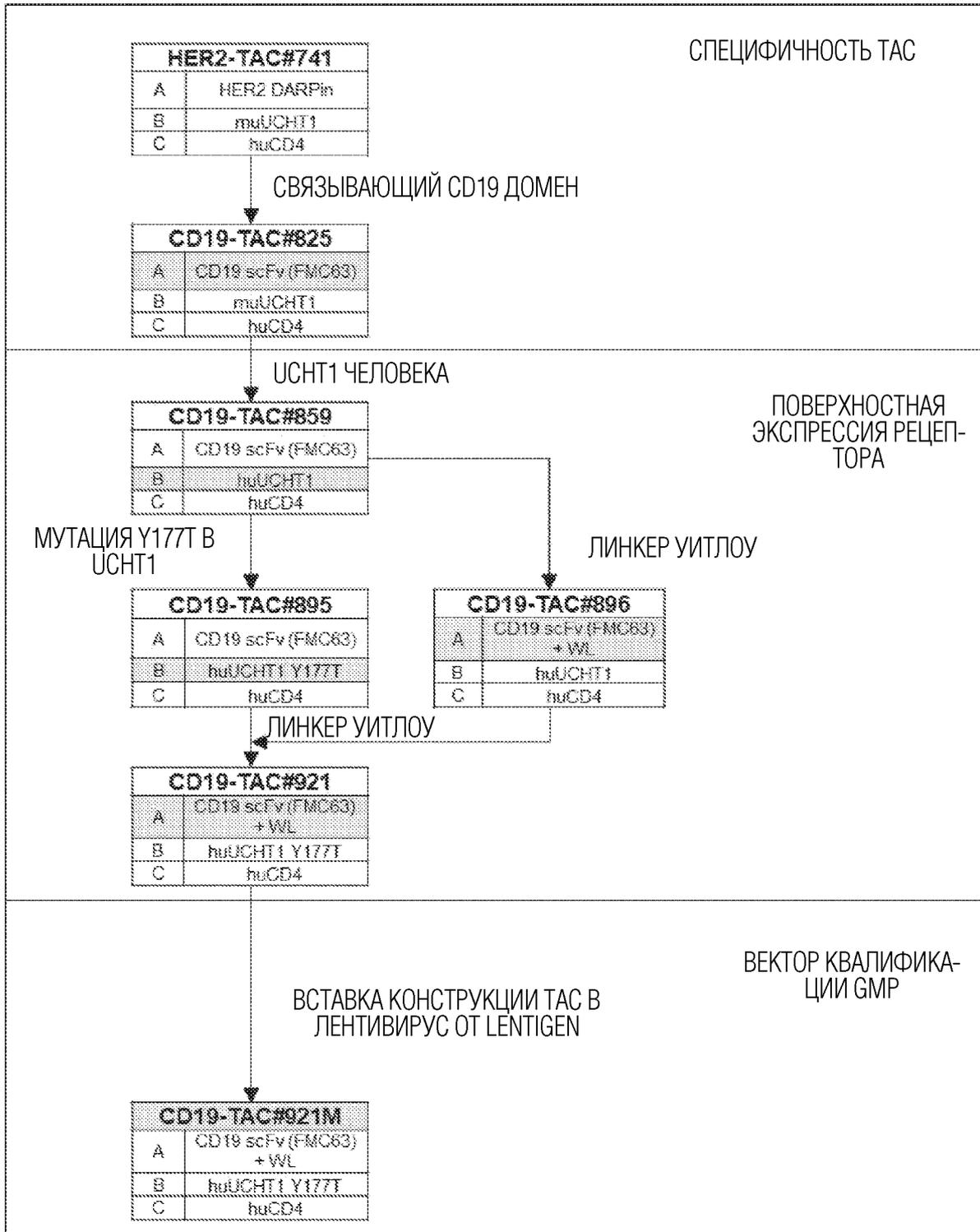
ФИГ. 15С



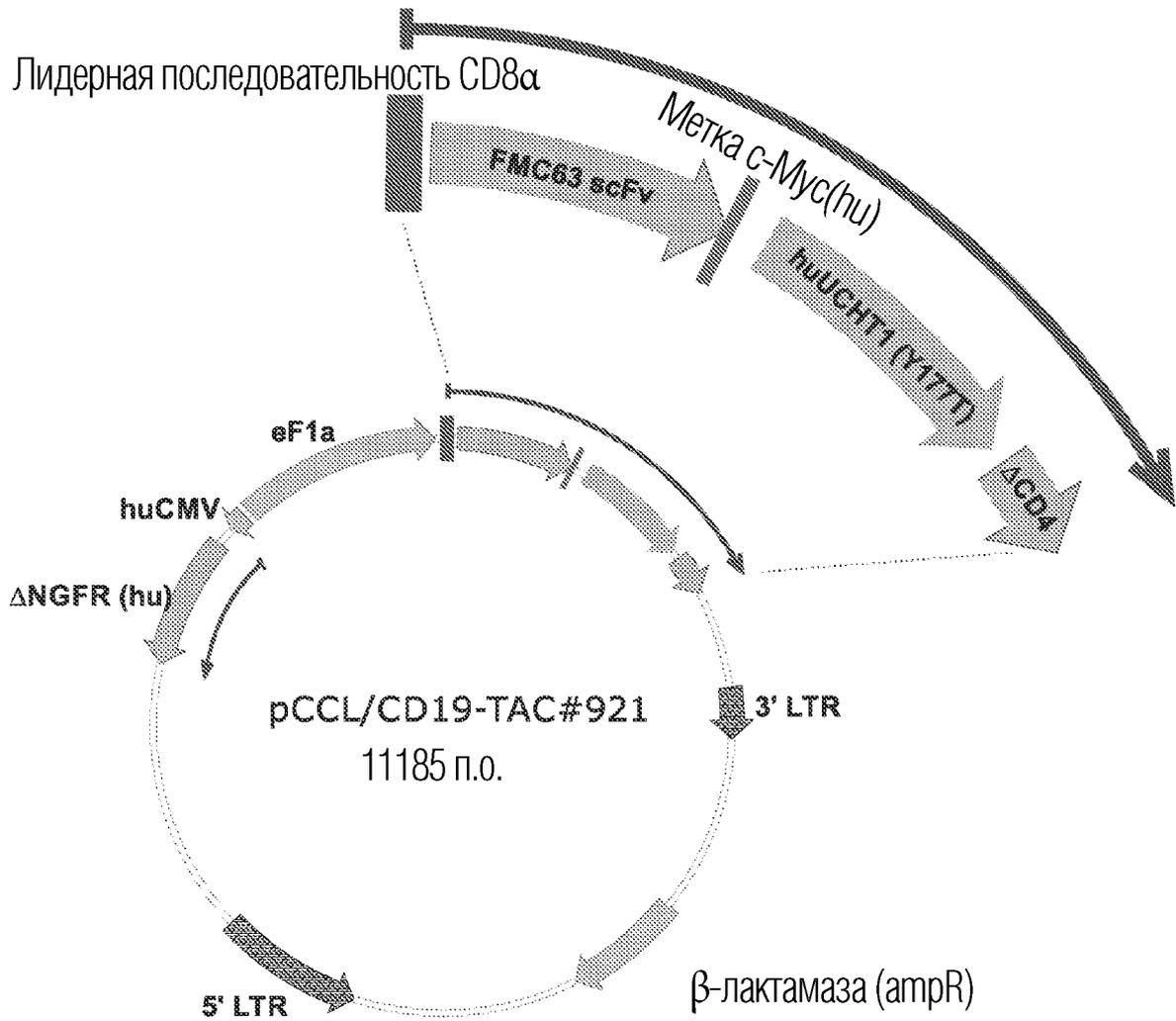
ФИГ. 15D



ФИГ. 15E

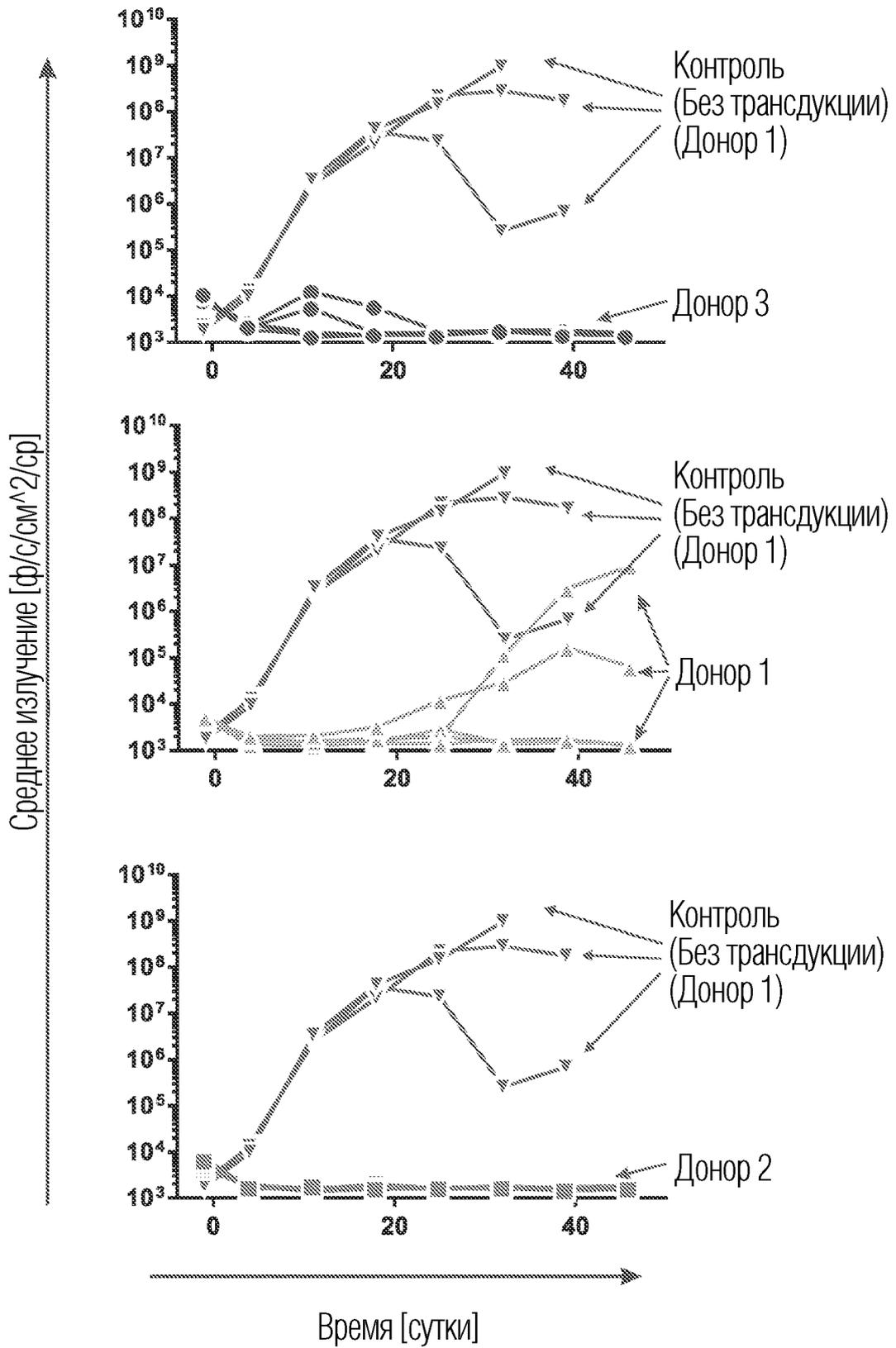


ФИГ. 16

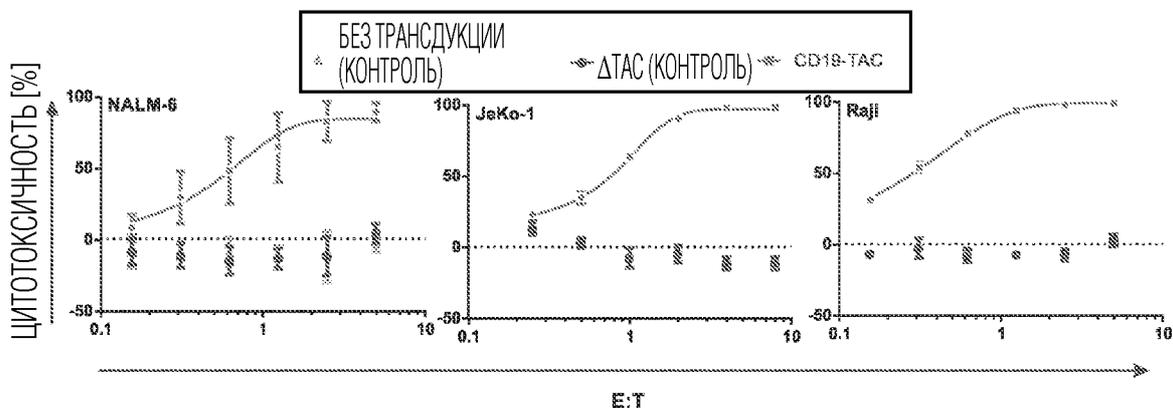


ФИГ. 17

38/57



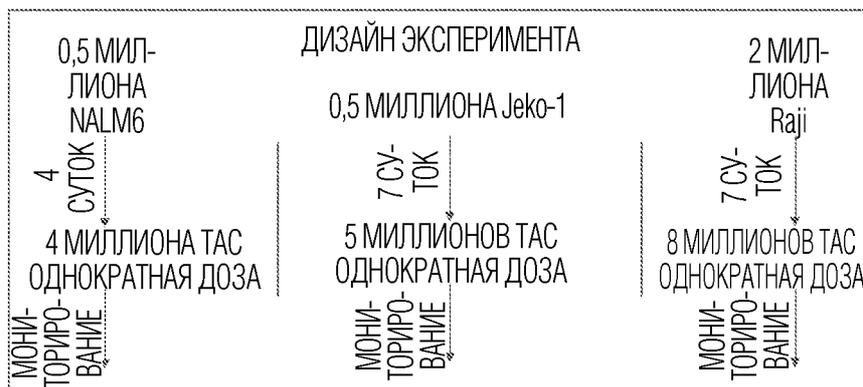
ФИГ. 18



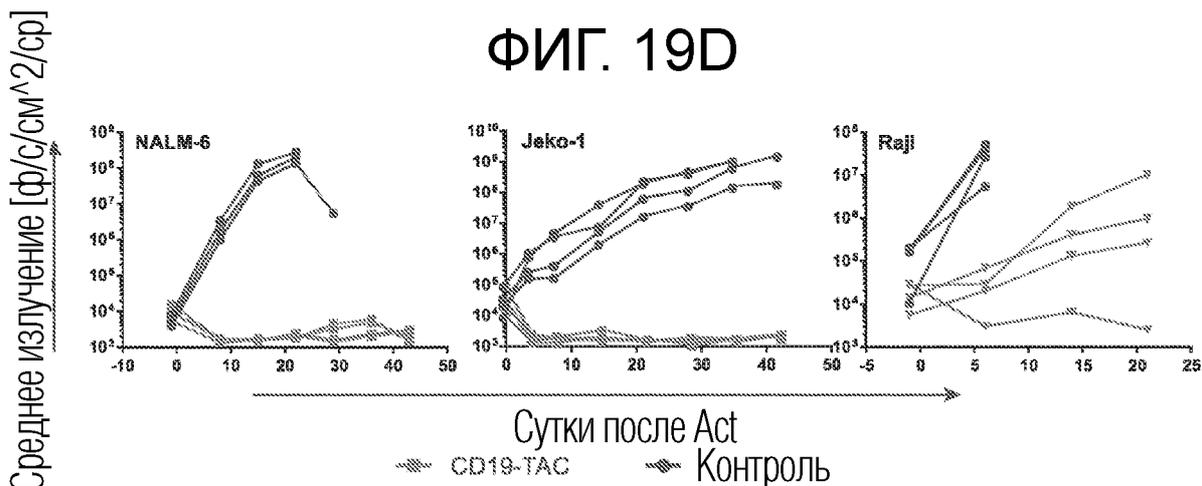
ФИГ. 19А

ФИГ. 19В

ФИГ. 19С



ФИГ. 19D

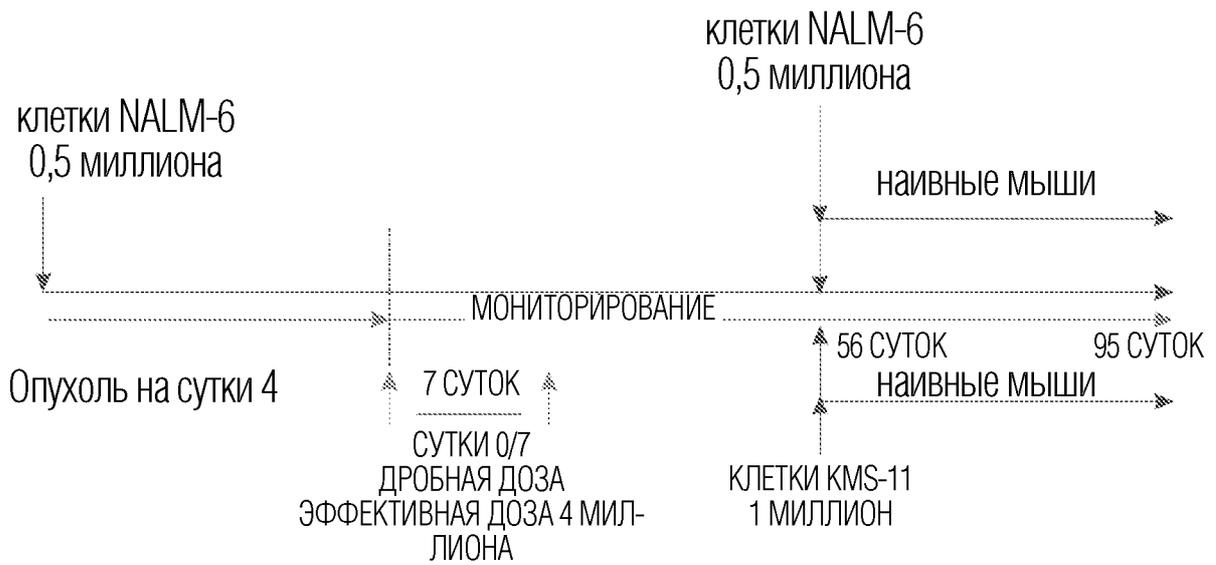


ФИГ. 19Е

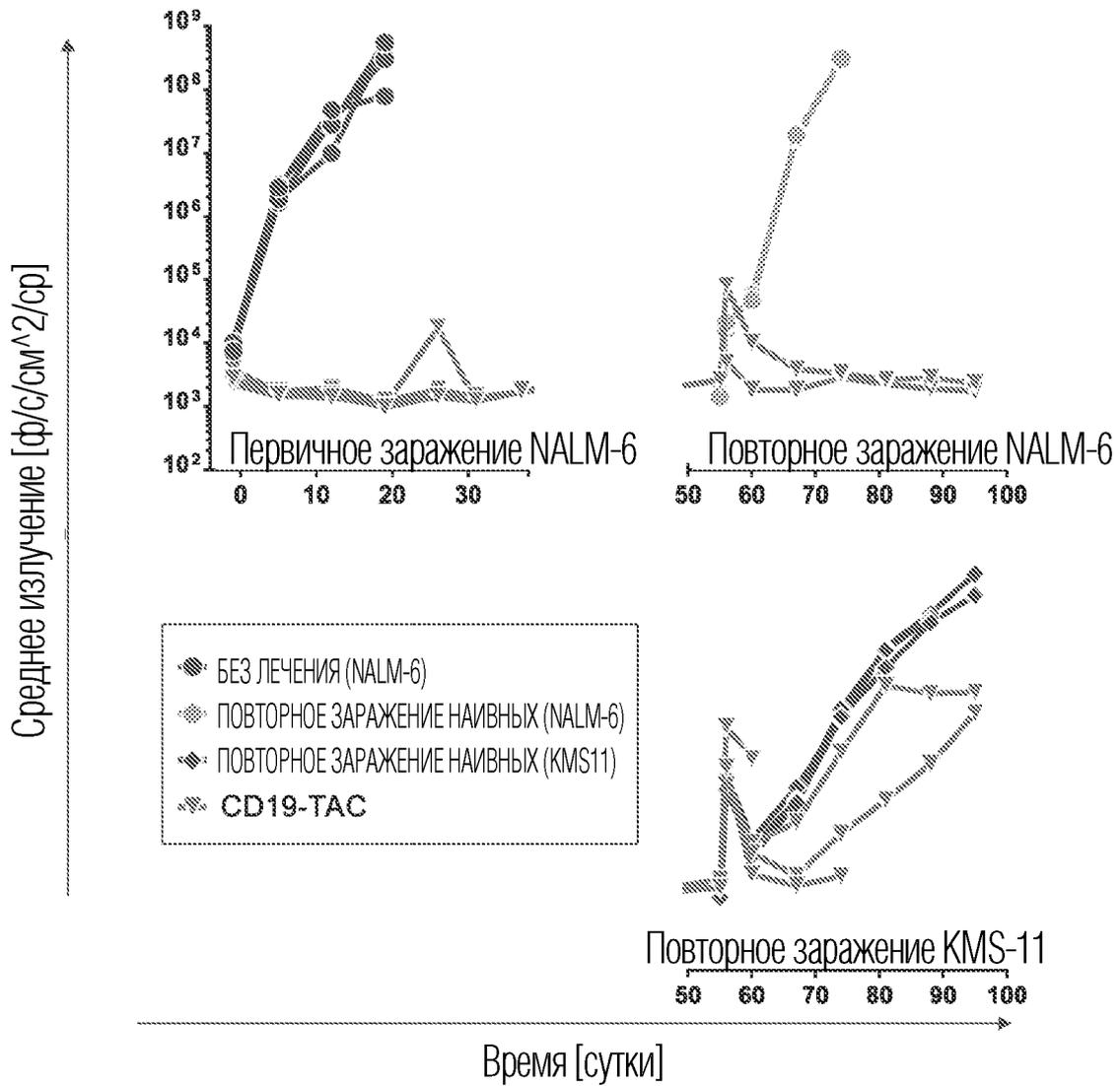
ФИГ. 19F

ФИГ. 19G

40/57

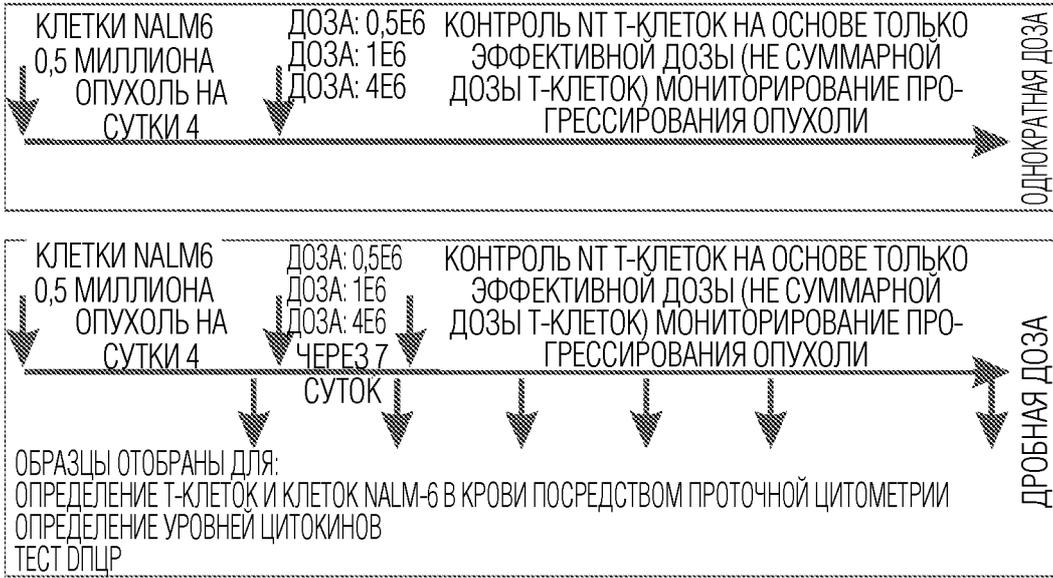


ФИГ. 20А



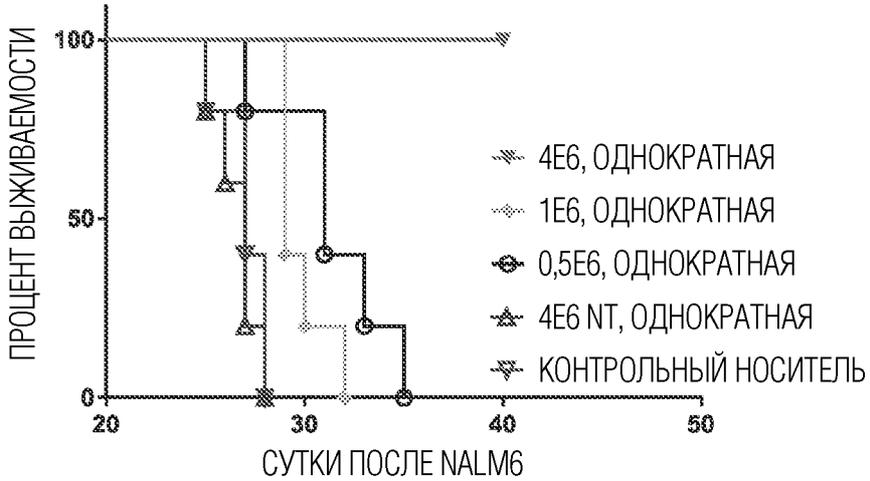
ФИГ. 20В

Дизайн эксперимента

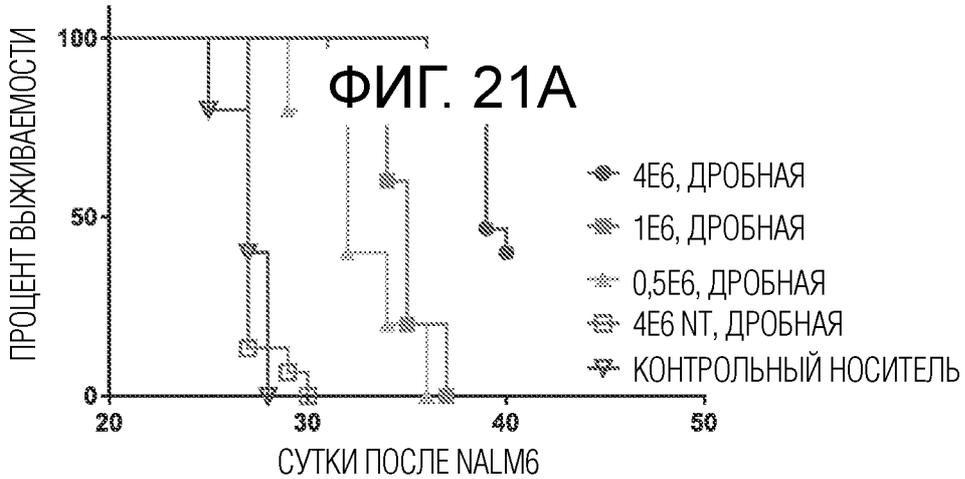


ФИГ. 21А

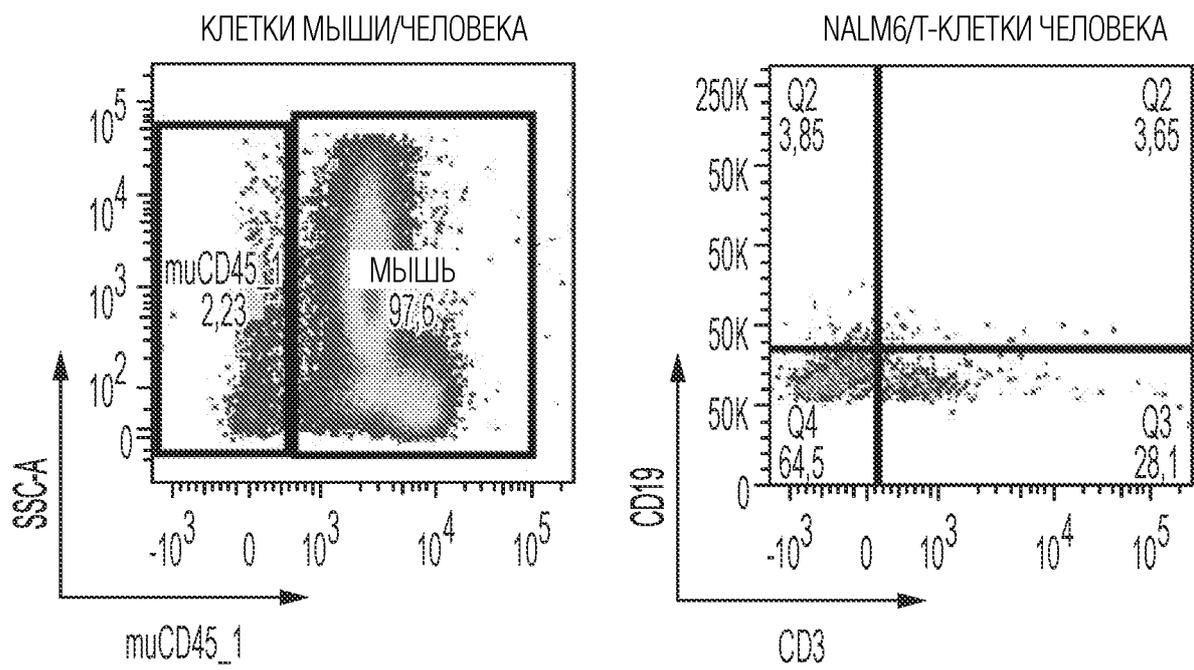
ОДНОКРАТНАЯ ДОЗА



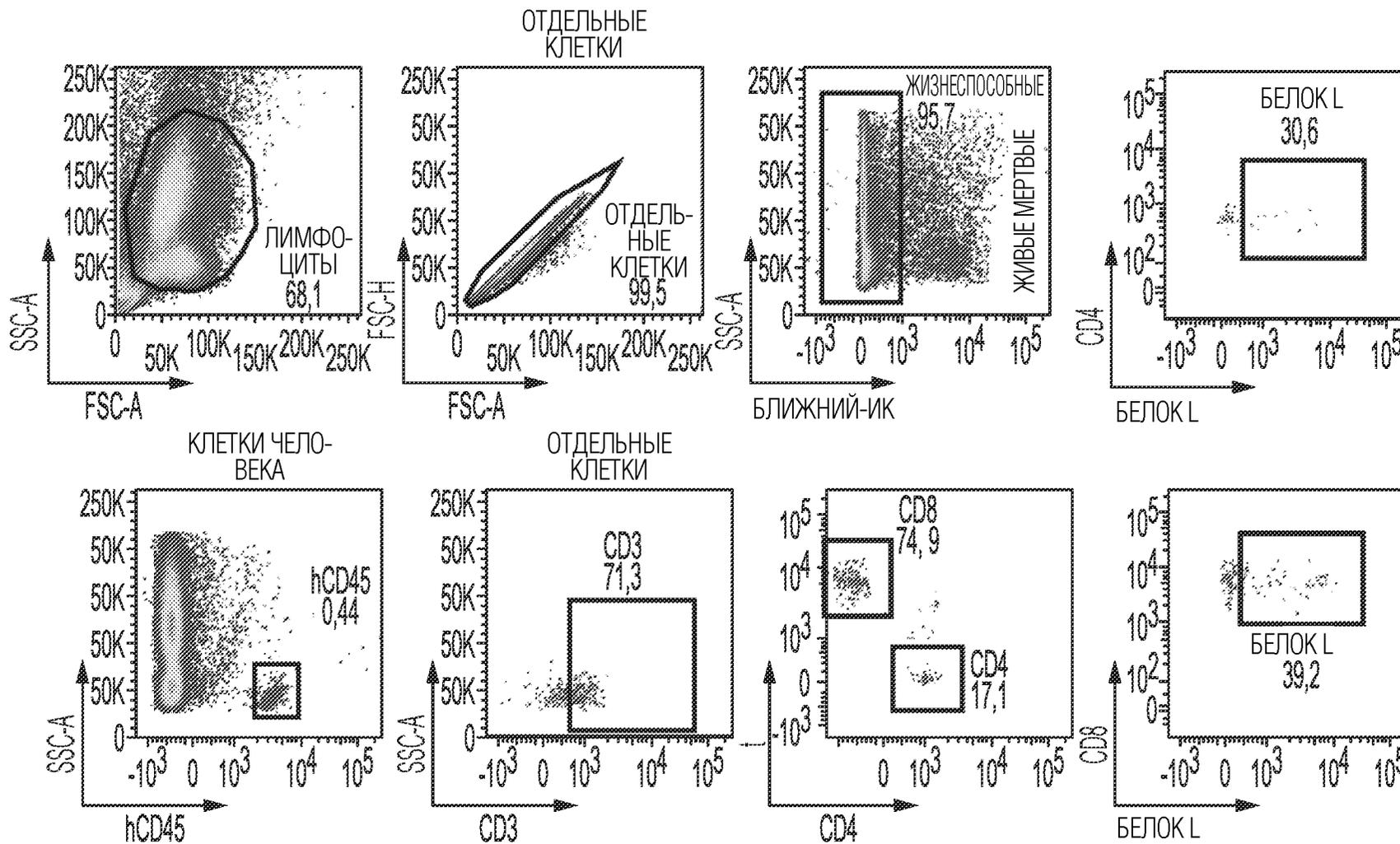
ДРОБНАЯ ДОЗА



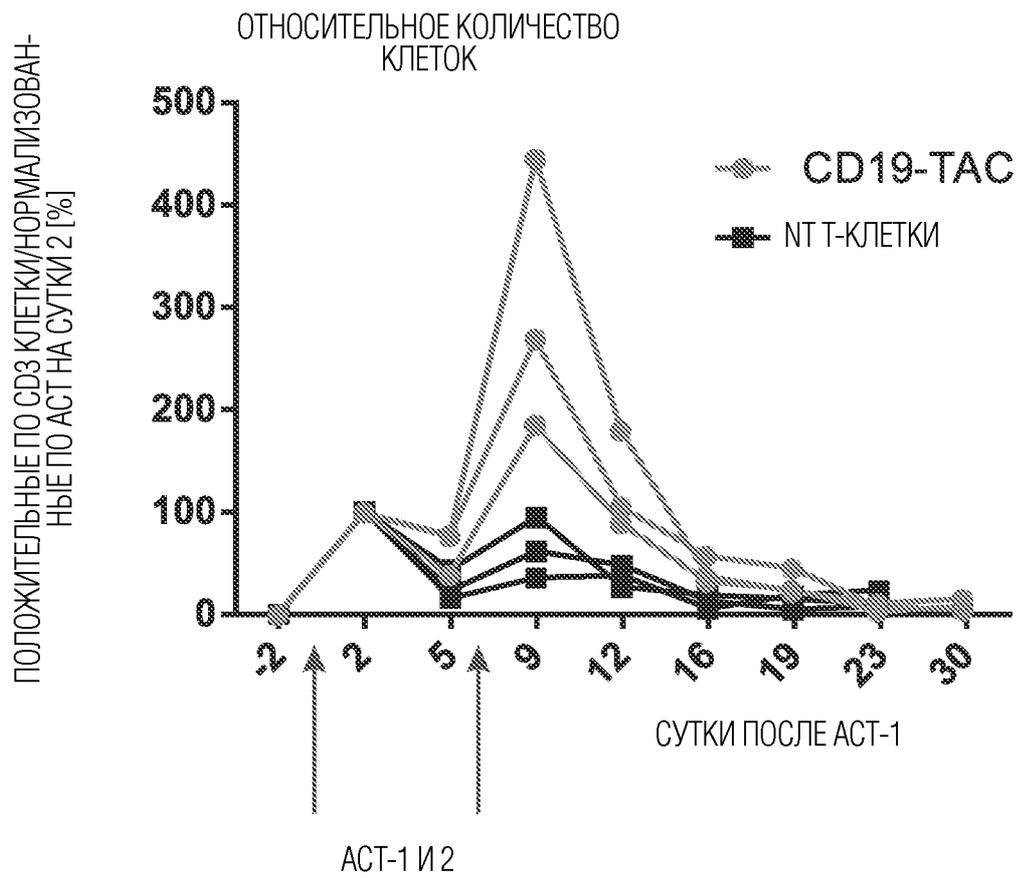
ФИГ. 21В



ФИГ. 22А

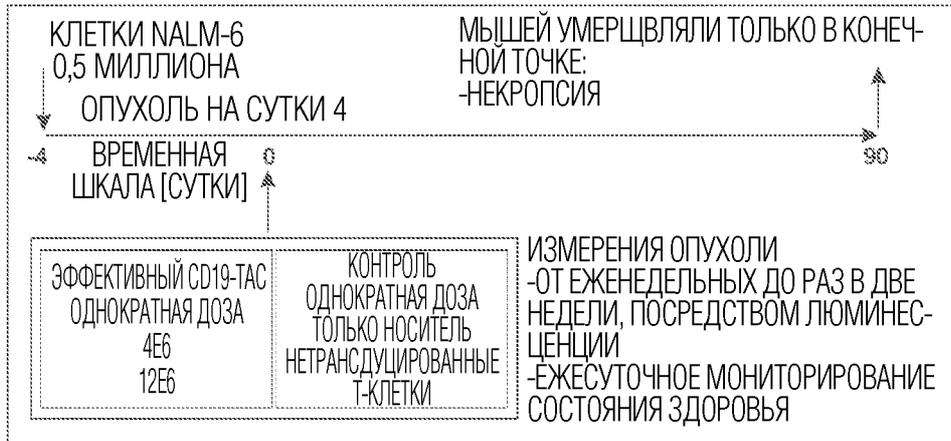


ФИГ. 22А ПРОДОЛЖЕНИЕ

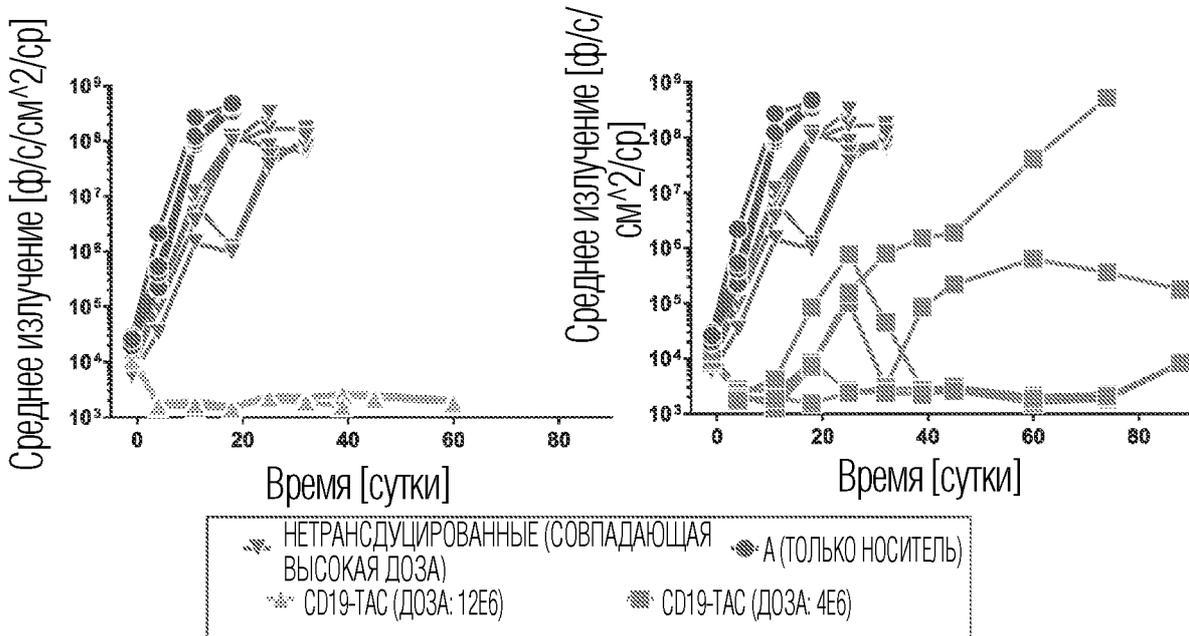


ФИГ. 22В

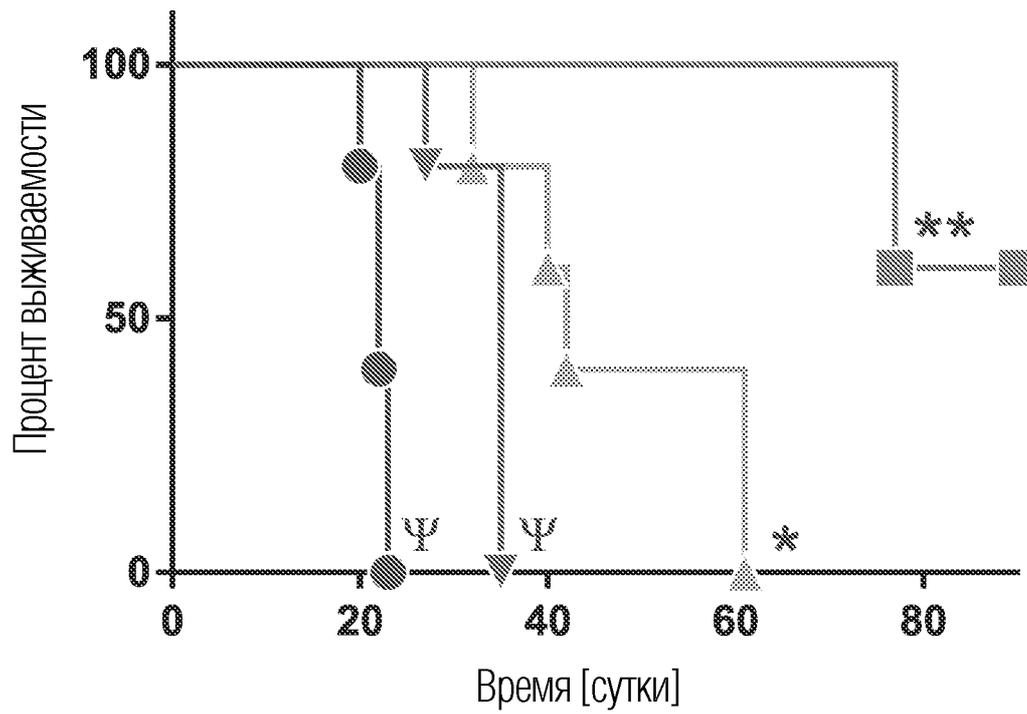
ДЛИТЕЛЬНОЕ



ФИГ. 23А

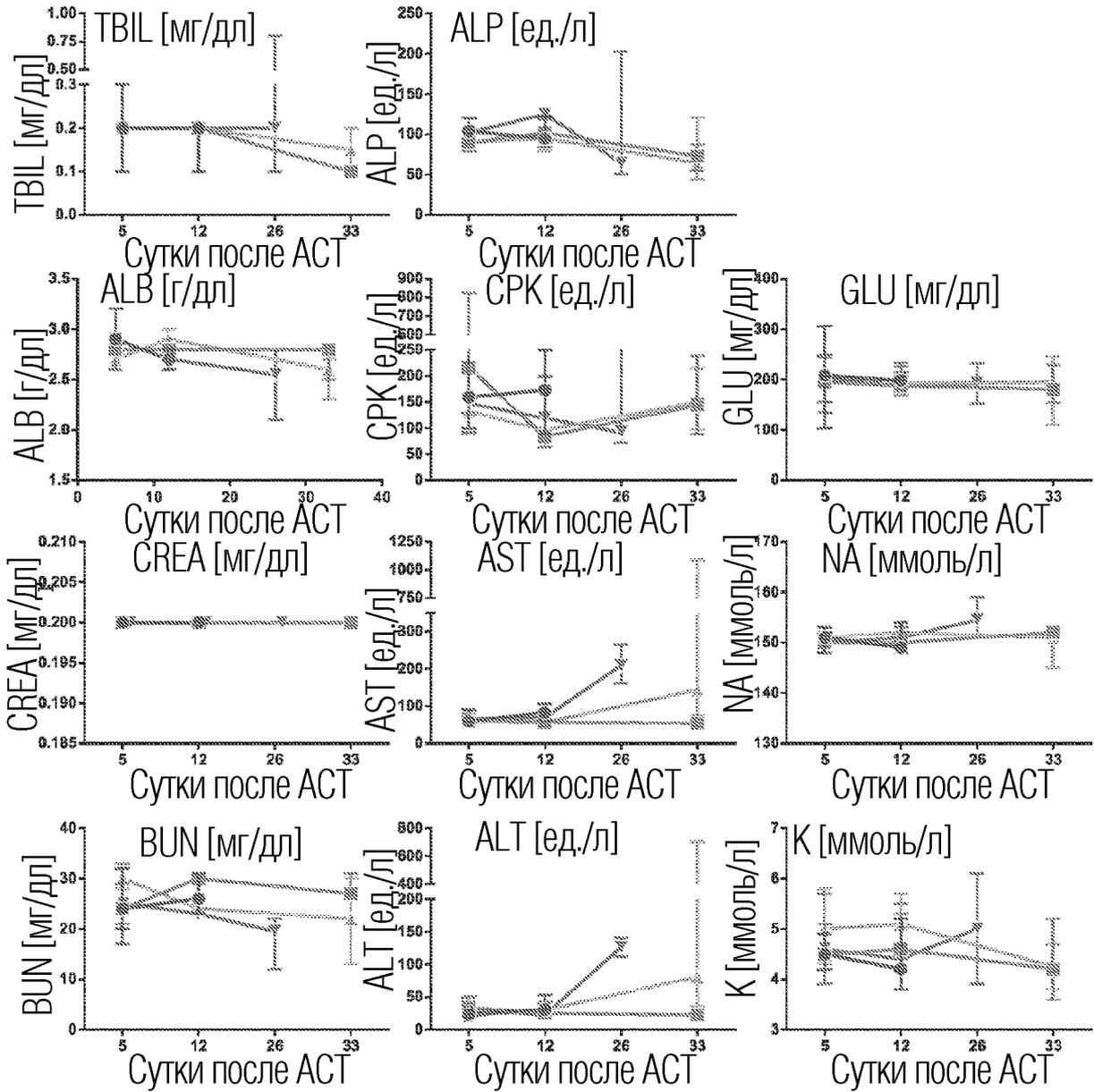


ФИГ. 23В



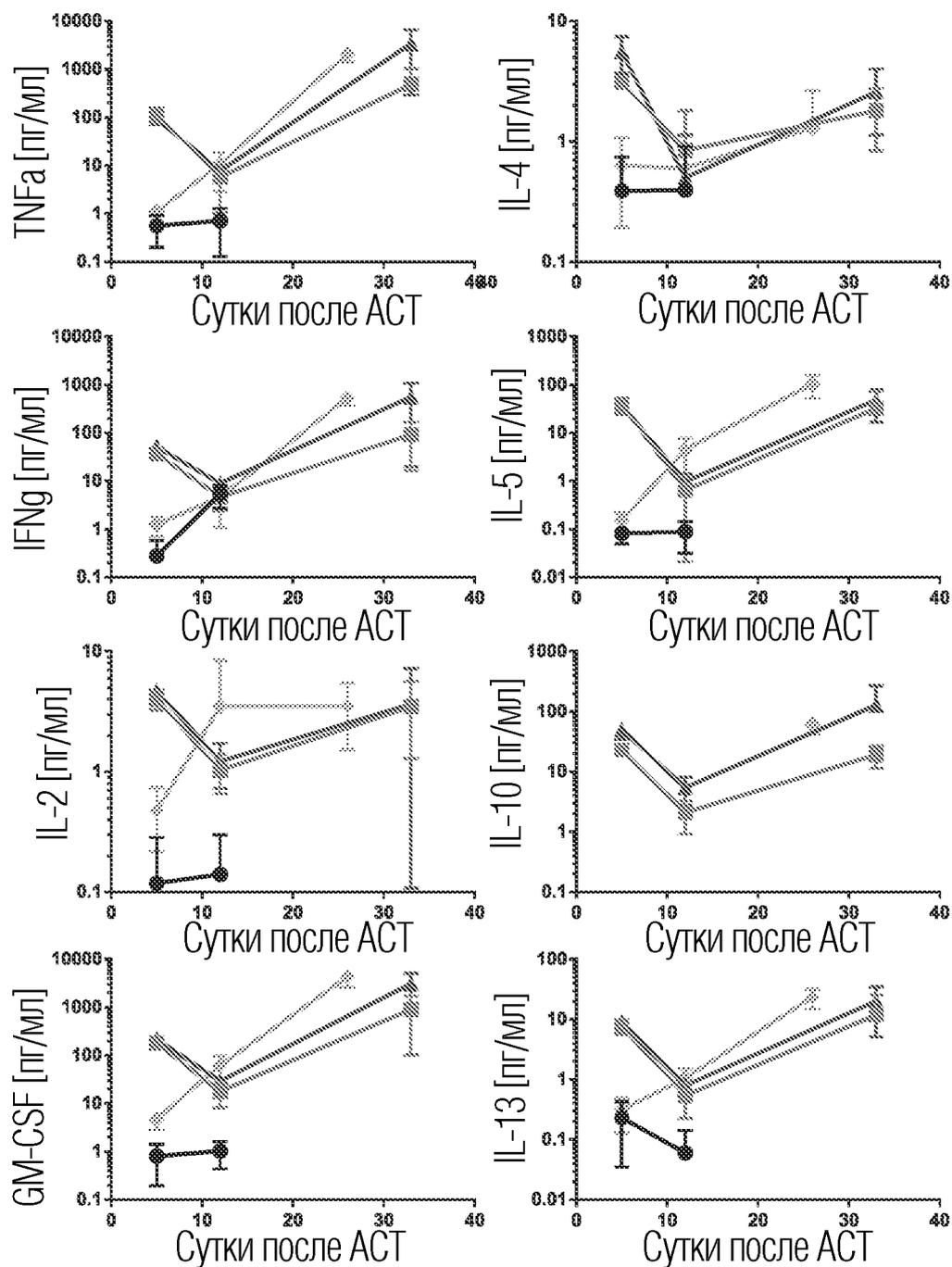
Ψ : КОНЕЧНАЯ ТОЧКА НАГРУЗКИ ОПУХОЛИ  
 \* : КОНЕЧНАЯ ТОЧКА GVHD  
 \*\* : 1 КОНЕЧНАЯ ТОЧКА GVHD И 1 КОНЕЧНАЯ ТОЧКА ОПУХОЛИ

ФИГ. 23С

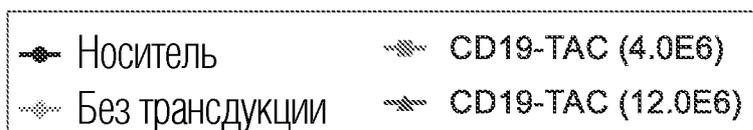


◆ Контрольный носитель    ■ CD19-TAC 4e6  
 ▲ Контроль без трансдукции    ● CD19-TAC 12e6

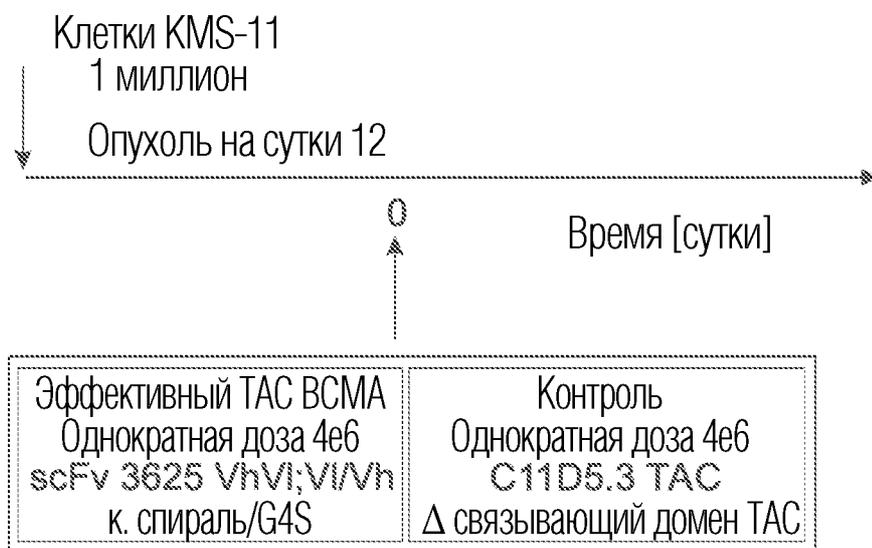
ФИГ. 24



IL-6 был ниже уровня детекции во всех временных точках



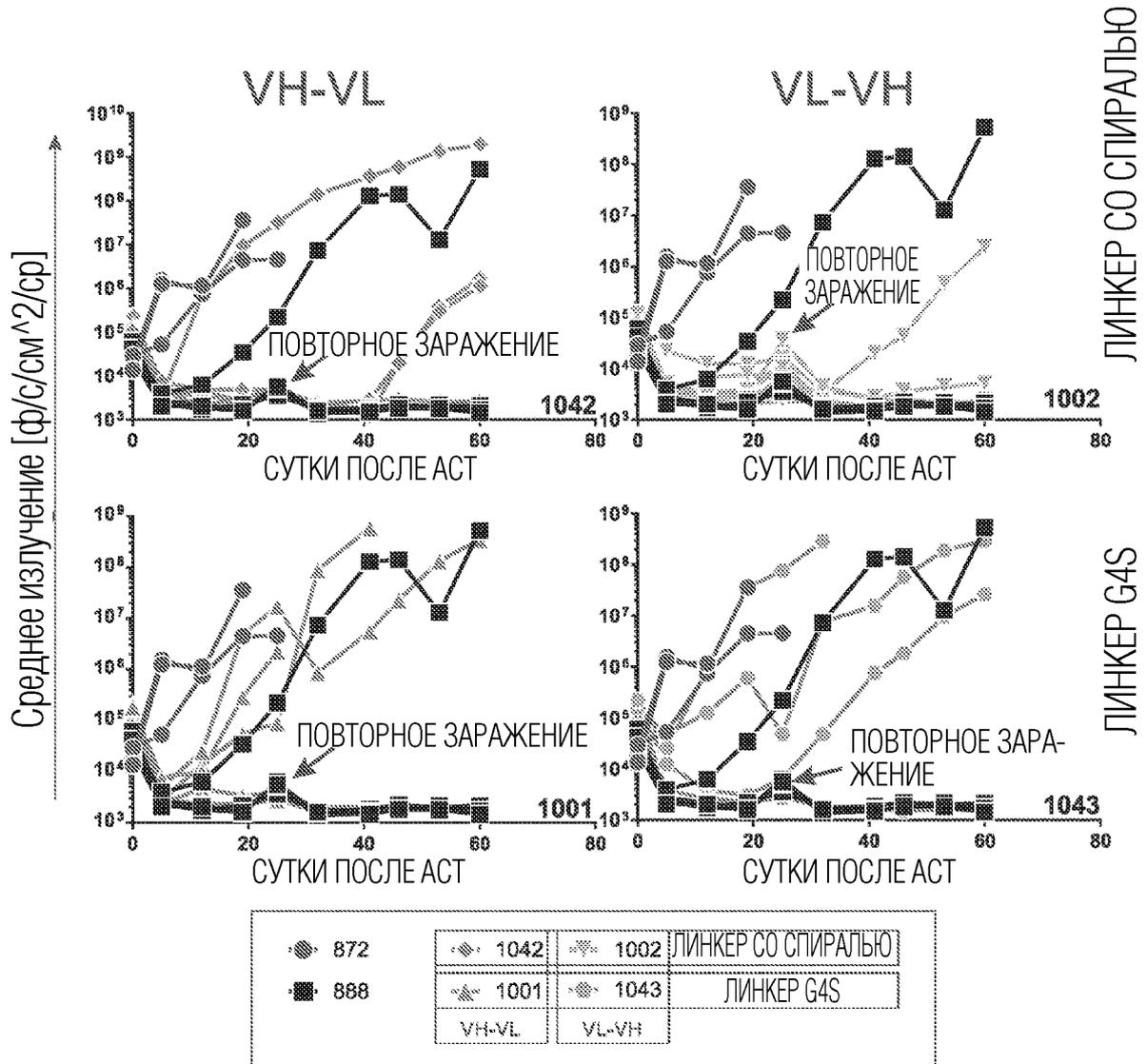
ФИГ. 25



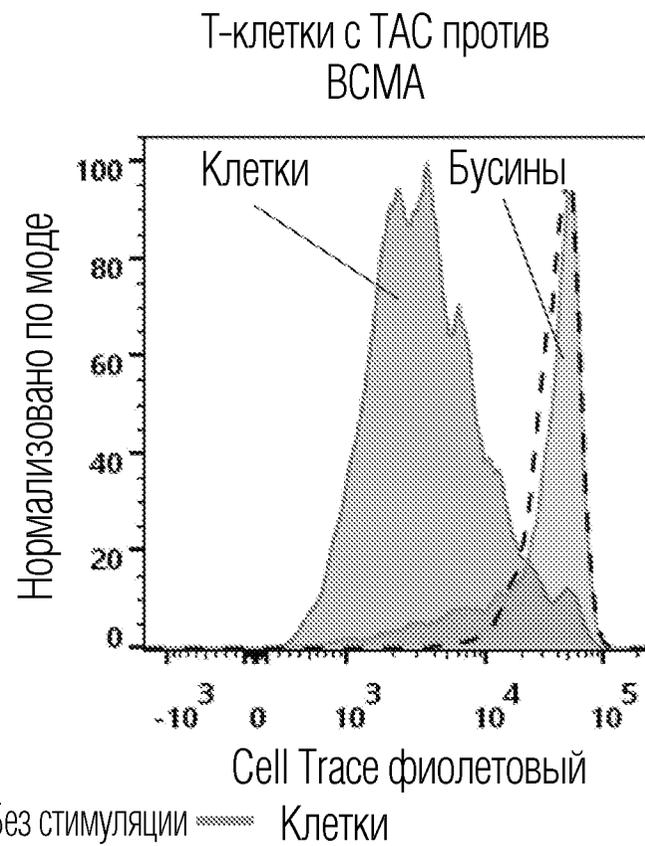
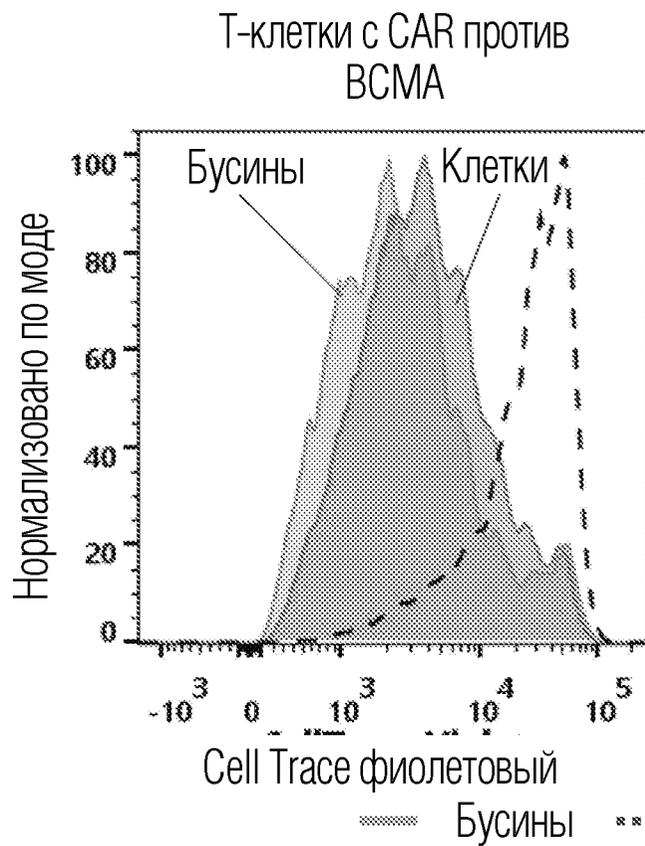
ФИГ. 26А

ID	Линкер	Одиночная цепь
872	G4S	-----
888	G4S	C11D5.3
1001	G4S	3625 H-L
1002	Короткая спираль	3625 L-H
1042	Короткая спираль	3625 H-L
1043	G4S	3625 L-H

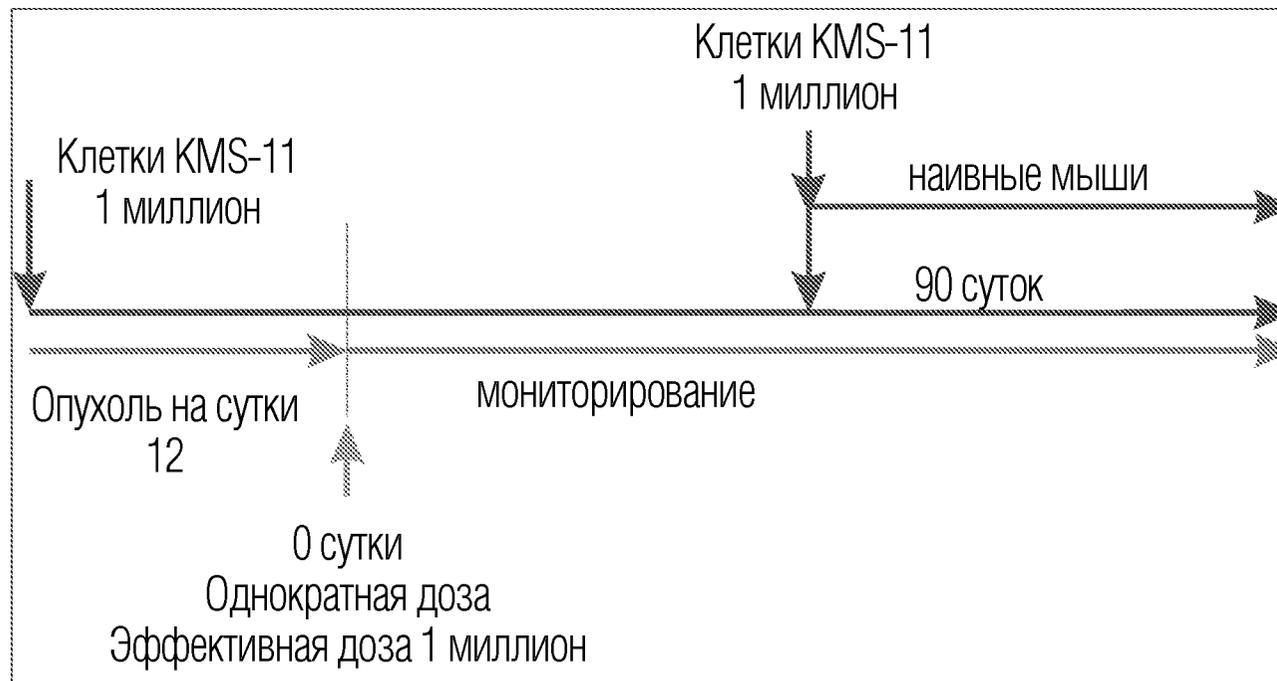
ФИГ. 26В



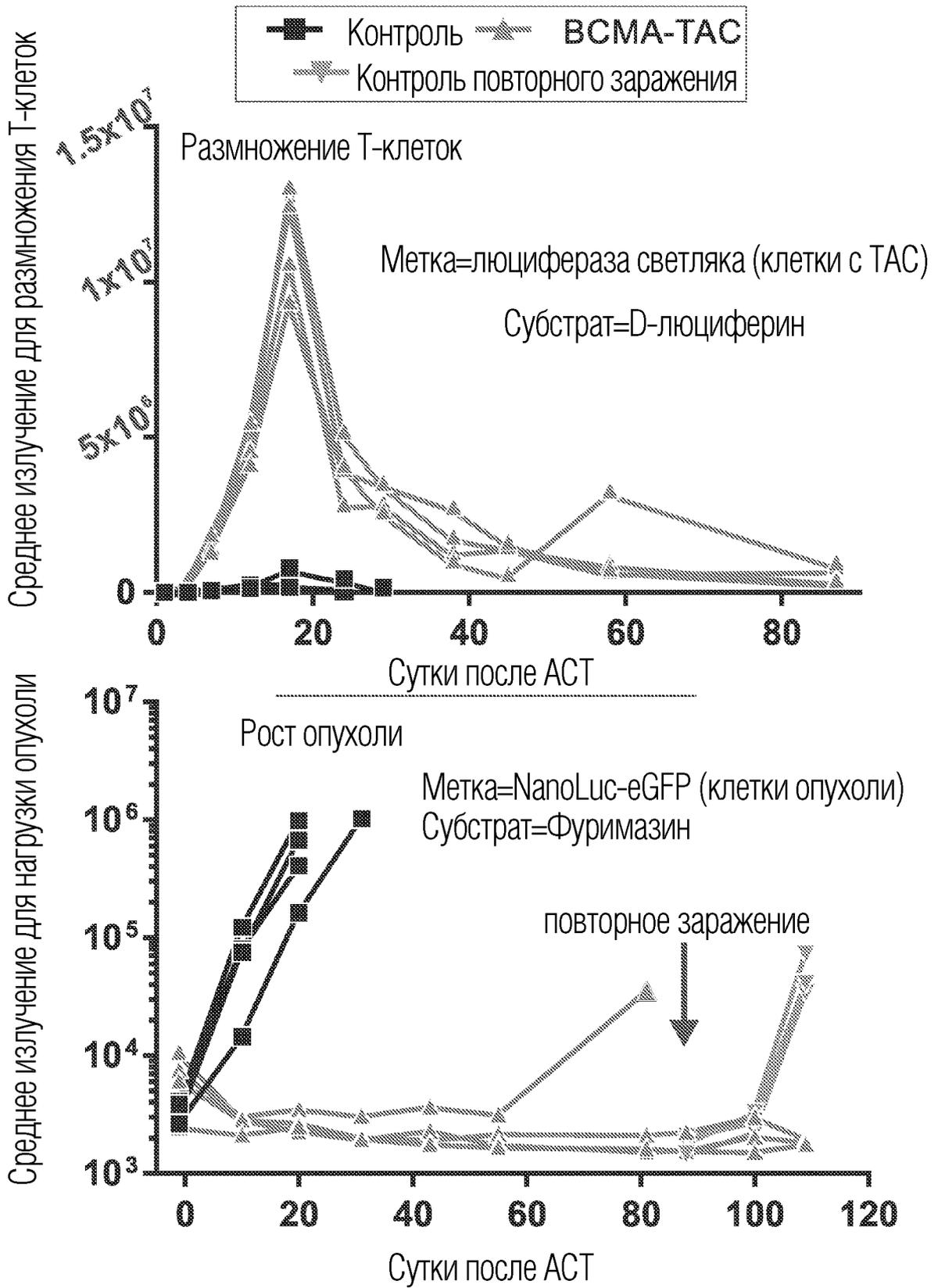
ФИГ. 26С



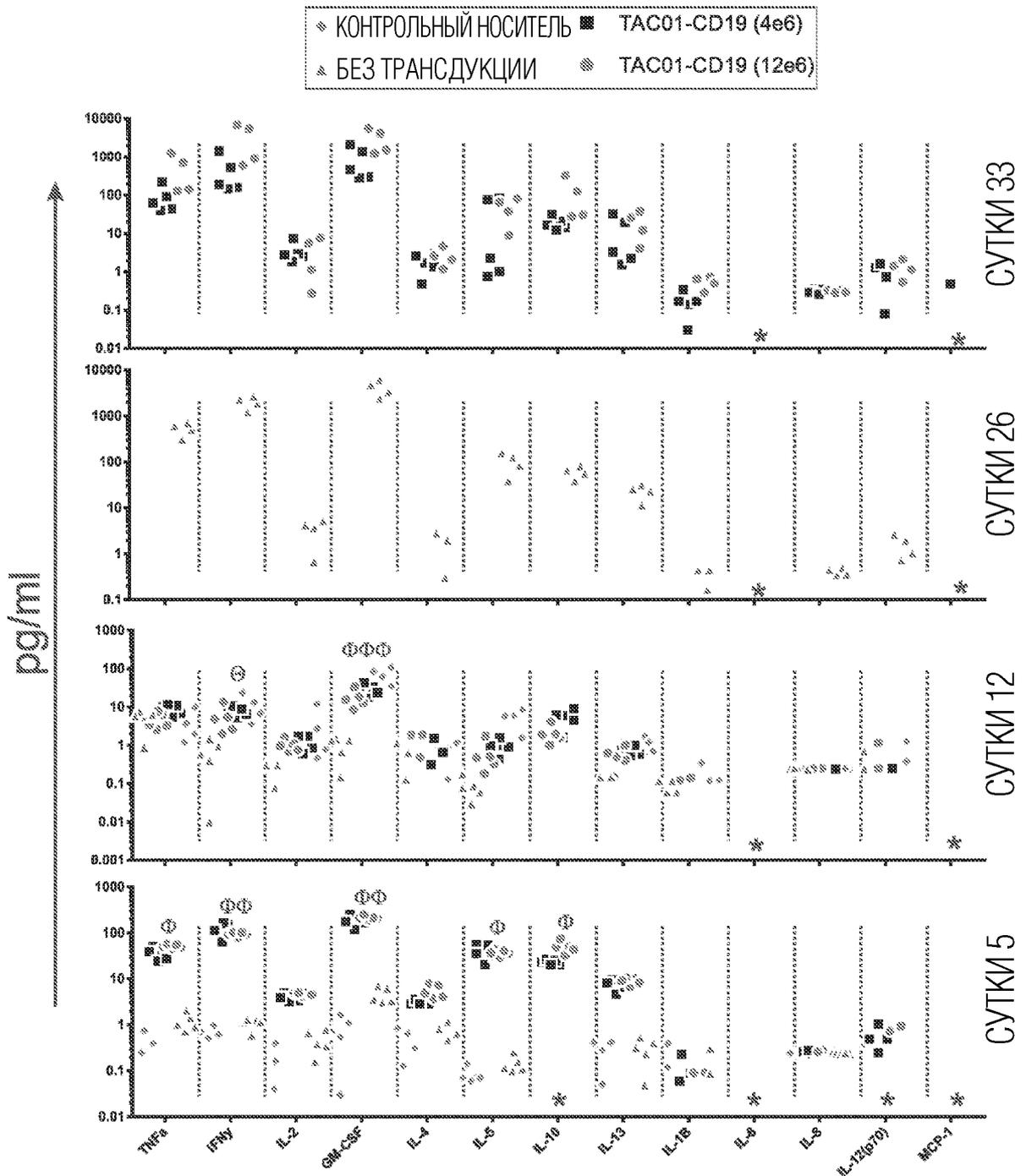
ФИГ. 27



ФИГ. 28-А



ФИГ. 28-В



\*Значения ниже предела детекции не показаны

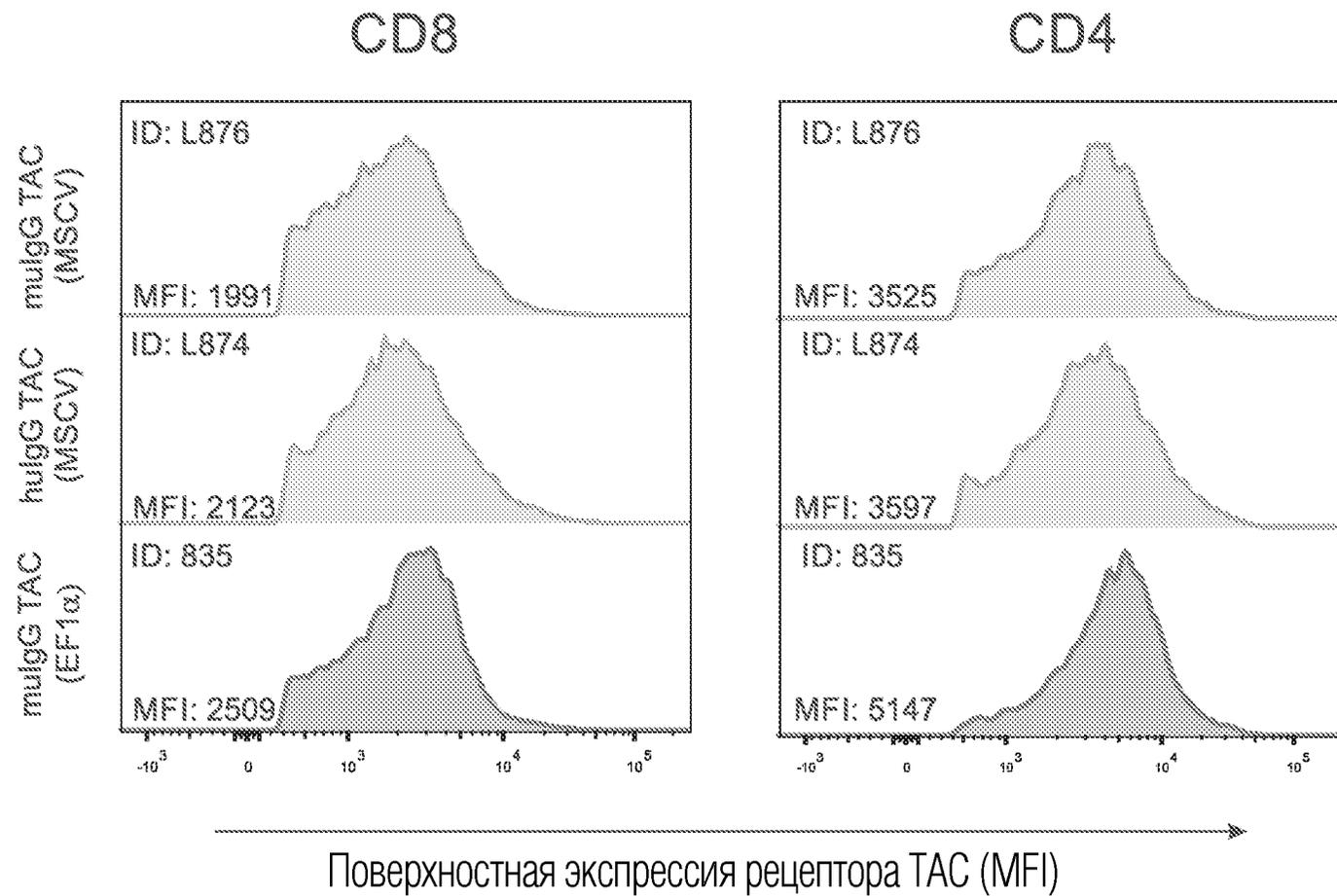
Φ Подвергнутые лечению мыши, значимо отличающиеся от контроля

ΦΦ Подвергнутые лечению мыши, значимо отличающиеся от контроля и между собой

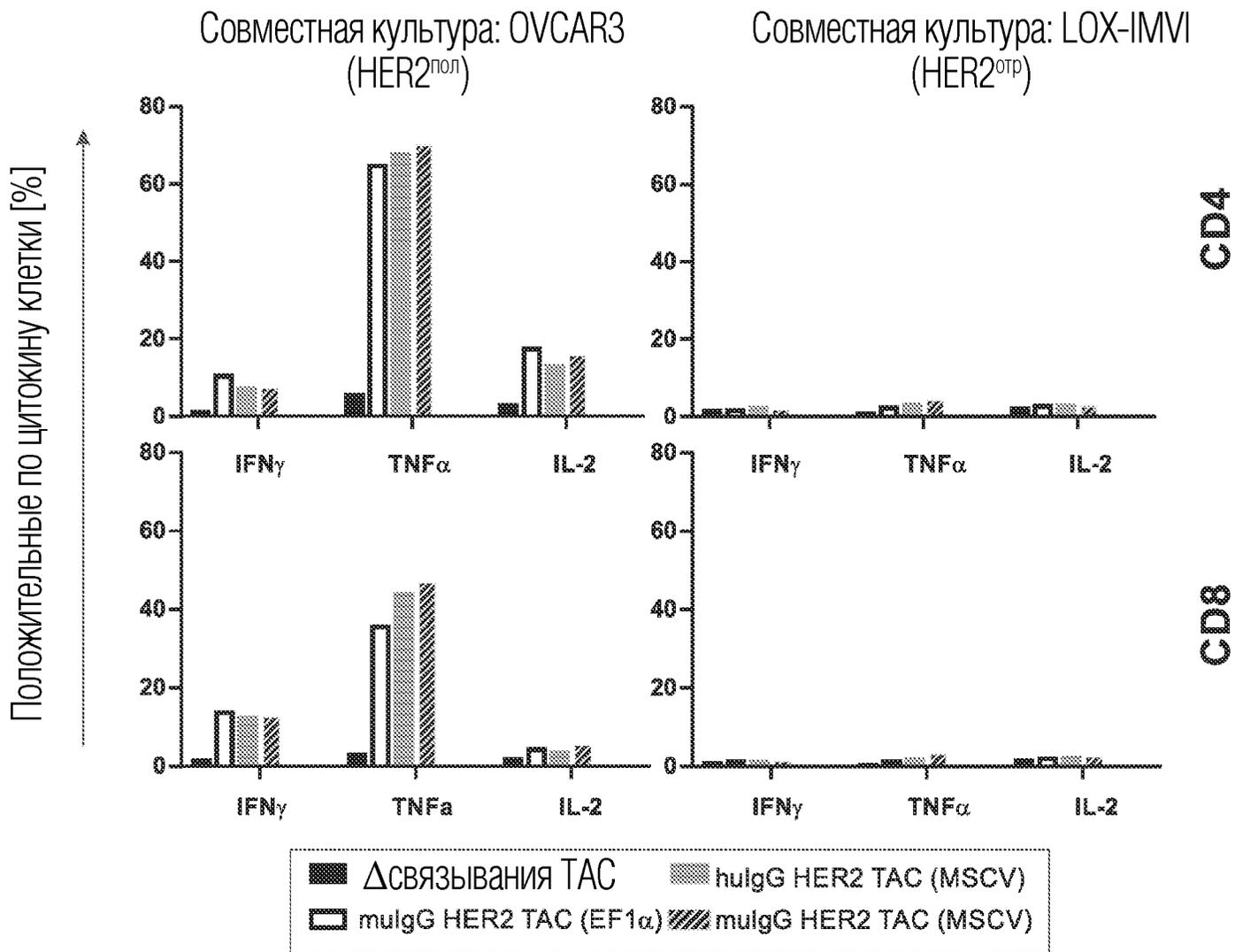
ΦΦΦ Все группы значимо отличаются друг от друга

⊕ Только носитель, значимо отличающийся от нетрансдуцированных мышей

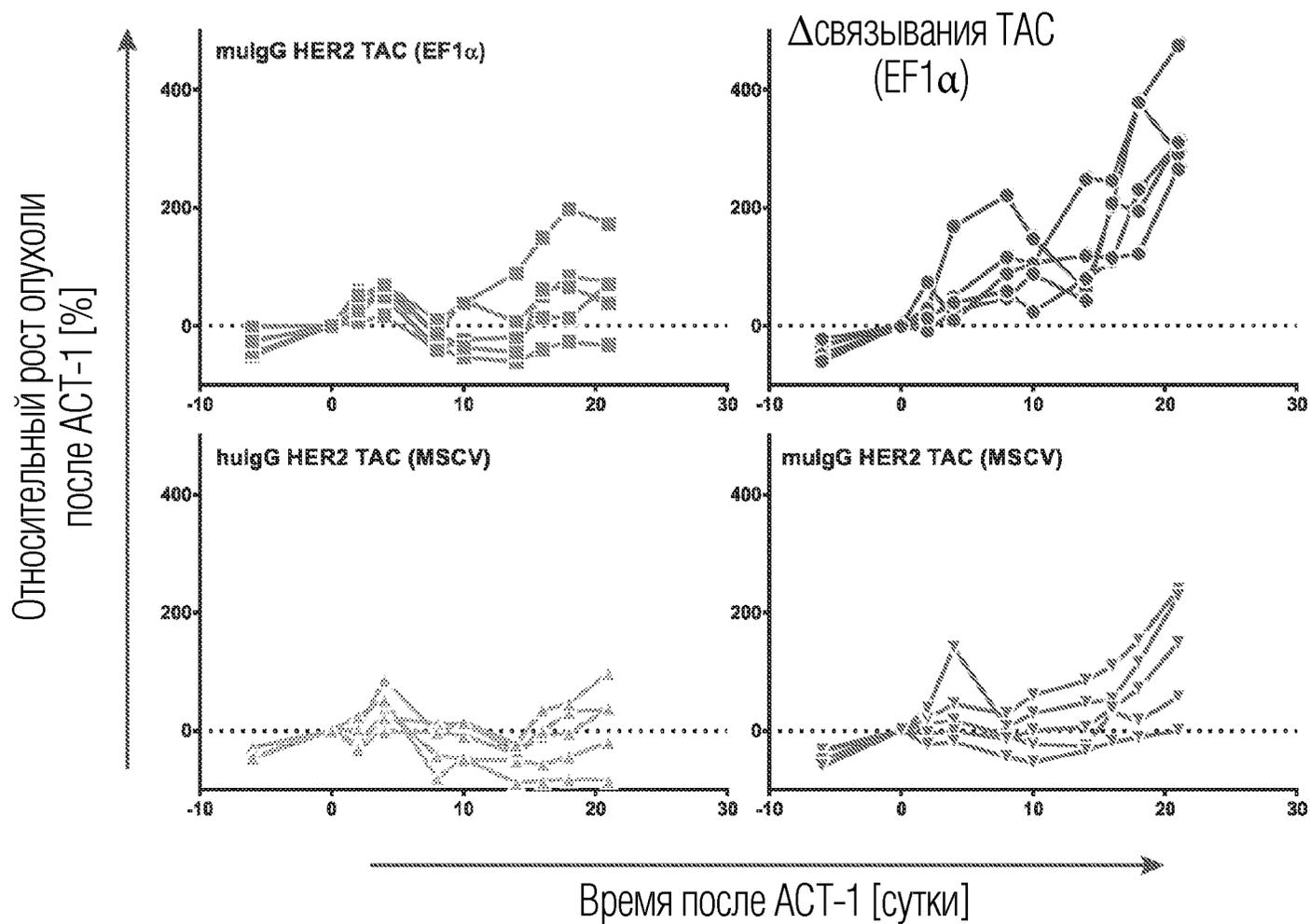
ФИГ. 29



ФИГ. 30



ФИГ. 31



ФИГ. 32