

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190524** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.11.08

(22) Дата подачи заявки
2019.08.14

(51) Int. Cl. *C12N 5/10* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 35/14 (2015.01)

(54) **ПОЛИПЕПТИДЫ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ В КОМБИНАЦИИ С МОЛЕКУЛАМИ ТРАНС-МЕТАБОЛИЗМА, МОДУЛИРУЮЩИМИ ЦИКЛ КРЕБСА, И ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 62/718,579; 62/718,491

(32) 2018.08.14

(33) US

(86) PCT/US2019/046550

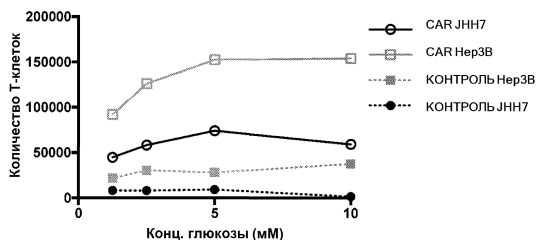
(87) WO 2020/037066 2020.02.20

(71) Заявитель:
СОТИО, ЭлЭлСи (US)

(72) Изобретатель:
Макгиннесс Кэтлин, Эттенберг Сет,
Бэррон Льюк, Фрей Майкл, Уилсон
Чарльз, Мотц Грегори (US)

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

(57) В изобретении предложены генетически сконструированные гемопоэтические клетки, которые экспрессируют один или более полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и, необязательно, полипептид химерного рецептора (например, полипептид Т-клеточного рецептора, связанного с антителом (ACTR - англ.: antibody-coupled T cell receptor), или полипептид химерного антигенного рецептора (CAR)), способный к связыванию с представляющим интерес целевым антигеном. В настоящем документе также предложено применение сконструированных гемопоэтических клеток для ингибирования клеток, экспрессирующих целевой антиген у нуждающегося в этом субъекта.



A1

202190524

202190524

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566930EA/019

ПОЛИПЕПТИДЫ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ В КОМБИНАЦИИ С МОЛЕКУЛАМИ ТРАНС-МЕТАБОЛИЗМА, МОДУЛИРУЮЩИМИ ЦИКЛ КРЕБСА, И ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет даты подачи по предварительной заявке на патент США № 62/718491, поданной 14 августа 2018 г., и предварительной заявке на патент США № 62/718579, поданной 14 августа 2018 г. Полное содержание каждой из предшествующих заявок включено в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Иммуноterapia рака, включая клеточную терапию, используется для того, чтобы вызвать иммунные реакции, атакующие опухолевые клетки, при сохранении нормальных тканей. Это многообещающий вариант лечения различных типов рака из-за его способности уклоняться от генетических и клеточных механизмов лекарственной устойчивости, а также воздействовать на опухолевые клетки, сохраняя при этом нормальные ткани.

Клеточная терапия может включать цитотоксические Т-клетки, реактивность которых смещена в сторону раковых клеток.. Eshhar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.; 1993; 90(2):720-724; Geiger et al., J Immunol. 1999; 162(10):5931-5939; Brentjens et al., Nat. Med. 2003; 9(3):279-286; Cooper et al., Blood. 2003; 101(4):1637-1644; и Imai et al., Leukemia. 2004; 18:676-684. Один из подходов заключается в экспрессии химерного рецептора, имеющего антигенсвязывающий домен, слитый с одним или более сигнальными доменами активации Т-клеток. Связывание ракового антигена посредством антигенсвязывающего домена приводит к активации Т-клеток и вызывает цитотоксичность. Недавние результаты клинических испытаний инфузий аутологичных Т-лимфоцитов, экспрессирующих химерные рецепторы, предоставили убедительные доказательства их клинического потенциала. Pule et al., Nat. Med. 2008;14(11):1264-1270; Porter et al., N Engl J Med; 2011; 25;365(8):725-733; Brentjens et al., Blood. 2011;118(18):4817-4828; Till et al., Blood. 2012;119(17):3940-3950; Kochenderfer et al., Blood. 2012;119(12):2709-2720; и Brentjens et al., Sci Transl Med. 2013;5(177):177ra138.

Другой подход заключается в экспрессии белка Т-клеточного рецептора, связанного с антителом (ACTR - англ.: antibody-coupled T cell receptor), в гемопоэтической клетке (*например*, гемопоэтической стволовой клетке, иммунной клетке, такой как НК-клетка или Т-клетка), белка ACTR, содержащего внеклеточный Fc-связывающий домен. Когда ACTR-экспрессирующие гемопоэтические клетки (*например*, ACTR-экспрессирующие Т-клетки, также называемые «ACTR-Т-клетки») вводятся субъекту вместе с противораковым антителом, они могут усиливать токсичность против раковых клеток, на которые нацелено это антитело, *посредством* их связывание с Fc-доменом антитела. Kudo et al., Cancer Research (2014) 74:93-103.

Клеточная иммунная терапия, хотя и является многообещающей, столкнулась с проблемами, вызванными специфическими характеристиками микроокружения опухоли (TME), которое представляет собой клеточную среду, созданную посредством взаимодействия между злокачественными опухолевыми клетками и нетрансформированными клетками. Поэтому очень важно разработать стратегии повышения эффективности клеточной иммунотерапии в свете TME.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано на разработке стратегий модуляции цикла Кребса в гемопоэтических клетках, таких как иммунные клетки, включая клетки, которые экспрессируют полипептид химерного рецептора, такой как полипептид Т-клеточного рецептора, связанный с антителом (ACTR), или полипептид химерного антигенного рецептора (CAR) для применения в клеточной иммунотерапии. Модуляция цикла Кребса может быть достигнута путем экспрессии (*например*, сверхэкспрессии) в гемопоэтических клетках (*например*, гемопоэтических стволовых клетках (ГСК) или иммунных клетках, таких как Т-клетки или естественные клетки-киллеры) одного или более полипептидов, модулирующих цикл Кребса, таких как полипептиды, описанные в данном документе. Ожидается, что такие генетически сконструированные иммунные клетки будут иметь модулированные (*например*, усиленные) реакции цикла Кребса, например, в среде с низким содержанием глюкозы, в среде с низким содержанием аминокислот, в среде с низким pH и/или в гипоксической среде (*например*, в микроокружении опухоли). Такие генетически сконструированные иммунные клетки также могут иметь модулированные эпигенетические состояния (*например*, состояния ацетилирования) и/или модулированные уровни иммуносупрессивных метаболитов (*например*, кинуренина). Таким образом, гемопоэтические клетки, такие как ГСК или иммунные клетки, которые совместно экспрессируют один или более полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и полипептид химерного рецептора, будут демонстрировать превосходящую биоактивность (*например*, в микроокружении опухоли, как например в условиях низкого содержания глюкозы, низкого содержания аминокислот, низкого pH и/или гипоксических условиях, необязательно в присутствии терапевтического антитела), например, в пролиферации клеток, активации (*например*, повышенной продукции цитокинов, *например*, продукции IL-2 или IFN γ), цитотоксичности и/или противоопухолевой активности *in vivo*.

Соответственно, в данном документе предложены модифицированные (*например*, генетически модифицированные) гемопоэтические клетки (*например*, гемопоэтические стволовые клетки, иммунные клетки, такие как Т-клетки или естественные клетки-киллеры), которые имеют модулированный цикл Кребса по сравнению с нативной иммунной клеткой того же типа, в частности, в условиях низкого содержания глюкозы, низкого содержания аминокислот, низкого pH и/или гипоксических условиях. Модифицированные иммунные клетки могут экспрессировать или сверхэкспрессировать полипептид, модулирующий цикл Кребса.

В некоторых вариантах осуществления полипептид, модулирующий цикл Кребса,

может представлять собой фермент, который катализирует реакцию цикла Кребса. Примеры включают изоцитратдегидрогеназу (IDH), такую как IDH1 или IDH2, малатдегидрогеназу (MDH), такую как MDH1 или MDH2, или фосфоглицератдегидрогеназу (PHGDH), но не ограничиваются ими. В других вариантах осуществления полипептид, модулирующий цикл Кребса, представляет собой фермент, который использует метаболит цикла Кребса в качестве субстрата. Примеры включают глутамин-щавелевоуксусную трансаминазу (GOT), такую как GOT1 или GOT2 (также известную как аспартаттрансаминаза или аспаратаминотрансфераза) или фосфоенолпируваткарбоксикиназу 1 (PCK1), но не ограничиваются ими. В еще других вариантах осуществления полипептид, модулирующий цикл Кребса, представляет собой фермент, который превращает предшественник в метаболит цикла Кребса. Примеры включают фосфосериаминотрансферазу (PSAT1), глутаматдегидрогеназу (GDH1), глутамин-пируваттрансаминазу 1 (GPT1) или глутаминазу (GLS), но не ограничиваются ими.

Модифицированные иммунные клетки могут дополнительно экспрессировать полипептид химерного рецептора, который может содержать (а) внеклеточный мишень-связывающий домен; (б) трансмембранный домен; и (с) цитоплазматический сигнальный домен (*например*, цитоплазматический домен, который содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM)). В некоторых вариантах осуществления полипептид химерного рецептора представляет собой Т-клеточный рецептор, связанный с антителом (ACTR), который содержит внеклеточный Fc-связывающий домен (а). В других вариантах осуществления химерный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), который содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен (а). В некоторых примерах (с) расположен на С-конце полипептида химерного рецептора. В некоторых случаях химерный полипептид может дополнительно содержать по меньшей мере один костимулирующий сигнальный домен. В других случаях полипептид химерного рецептора может не содержать костимулирующих сигнальных доменов.

Любой из полипептидов химерных рецепторов, описанных в данном документе (*например*, полипептид ACTR или полипептид CAR), может дополнительно содержать шарнирный домен, расположенный на С-конце (а) и N-конце (б). В других примерах полипептид химерного рецептора может не содержать какого-либо шарнирного домена. В еще других примерах полипептид химерного рецептора, *например* полипептид ACTR, может не содержать шарнирного домена любого рецептора, отличного от CD16A. Альтернативно или дополнительно, полипептид химерного рецептора дополнительно содержит сигнальный пептид на своем N-конце.

В некоторых вариантах осуществления полипептид химерного рецептора, описанный в данном документе, может представлять собой полипептид ACTR, содержащий Fc-связывающий домен (а). В некоторых примерах Fc-связывающий домен (а) может представлять собой внеклеточный лиганд-связывающий домен Fc-рецептора, *например*, внеклеточный лиганд-связывающий домен рецептора Fc-гамма, рецептора Fc-

альфа или рецептора Fc-эпсилон. В конкретных примерах Fc-связывающий домен представляет собой внеклеточный лиганд-связывающий домен CD16A(*например*, F158 CD16A или V158 CD16A), CD32A или CD64A. В других примерах Fc-связывающий домен (а) может представлять собой фрагмент антитела, который связывает Fc-часть иммуноглобулина. Например, фрагмент антитела может представлять собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (ScFv), однодоменное антитело (*например*, нанотело). Кроме того, Fc-связывающий домен (а) может представлять собой встречающийся в природе белок, который связывает Fc-часть иммуноглобулина или его Fc-связывающий фрагмент. Например, Fc-связывающий домен может представлять собой белок А или белок G, или их Fc-связывающий фрагмент. В дополнительных примерах Fc-связывающий домен (а) может быть синтетическим полипептидом, который связывает Fc-часть иммуноглобулина. Примеры включают пептид Кунитца, SMIP, авимер, аффитело, DARPIn или антикалин, но не ограничиваются ими.

В некоторых вариантах осуществления полипептид химерного рецептора, описанный в данном документе, может представлять собой полипептид CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен (а). В некоторых примерах внеклеточный антигенсвязывающий домен (а) представляет собой одноцепочечный фрагмент антитела, который связывается с опухолевым антигеном, патогенным антигеном или иммунной клеткой, специфичной к аутоантигену. В определенных примерах опухолевый антиген связан с гематологической опухолью. Примеры включают CD19, CD20, CD22, каппа-цепь, CD30, CD123, CD33, LeY, CD138, CD5, BCMA, CD7, CD40 и IL-1RAP, но не ограничиваются ими. В определенных примерах опухолевый антиген связан с солидной опухолью. Примеры включают GD2, GPC3, FOLR(*например*, FOLR1 или FOLR2), HER2, EphA2, EGFRVIII, IL13RA2, VEGFR2, ROR1, NKG2D, EpCAM, CEA, мезотелин, MUC1, CLDN18.2, CD171, CD133, PSCA, cMET, EGFR, PSMA, FAP, CD70, MUC16, L1-CAM, B7H3 и CAIX, но не ограничиваются ими. В определенных примерах патогенный антиген представляет собой бактериальный антиген, вирусный антиген или грибковый антиген, например, описанные в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен (b) в любом полипептиде химерного рецептора(*например*, полипептида ACTR или CAR) может представлять собой белок, пронизывающий мембрану один раз, *например*, CD8 α , CD8 β , 4-1BB, CD28, CD34, CD4, Fc ϵ RI γ , CD16A, OX40, CD3 ζ , CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ , TCR α , CD32, CD64, VEGFR2, FAS и FGFR2B. Альтернативно, трансмембранный домен (b) может представлять собой не встречающийся в природе сегмент гидрофобного белка.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один костимулирующий сигнальный домен полипептидов химерного рецептора, описанных в данном документе (*например*, полипептидов ACTR или CAR), если это применимо, может представлять собой костимулирующую молекулу, которая может представлять собой 4-1BB, CD28, вариант CD28_{LL GG}, OX40, ICOS, CD27, GITR, ICOS, HVEM, TIM1, LFA1 и CD2. В некоторых примерах по меньшей мере один костимулирующий сигнальный домен

представляет собой костимулирующий сигнальный домен CD28 или костимулирующий сигнальный домен 4-1BB. В некоторых случаях полипептид ACTR может содержать два костимулирующих сигнальных домена. В некоторых случаях один из костимулирующих сигнальных доменов представляет собой костимулирующий сигнальный домен CD28; а другой костимулирующий домен может представлять собой костимулирующий сигнальный домен 4-1BB, костимулирующий сигнальный домен OX40, костимулирующий сигнальный домен CD27 или костимулирующий сигнальный домен ICOS. Конкретные примеры включают CD28 и 4-1BB; или вариант CD28_{LL1GG} и 4-1BB, но не ограничиваются ими. Альтернативно, любой из полипептидов химерного рецептора может не содержать какого-либо костимулирующего сигнального домена.

В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический сигнальный домен (с) в любом из полипептидов химерного рецептора, описанных в данном документе (*например*, полипептидов ACTR или CAR), может представлять собой цитоплазматический домен CD3 ζ или Fc ϵ R1 γ .

В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен любого из химерных полипептидов, описанных в данном документе (*например*, полипептидов ACTR или CAR), когда это применимо, может представлять собой CD28, CD16A, CD8 α , или IgG. В других примерах шарнирный домен является не встречающимся в природе пептидом. Например, не встречающийся в природе пептид может представлять собой удлиненный рекомбинантный полипептид (XTEN) или полипептид (Gly₄Ser)_n, в котором n является целым числом от 3 до 12 включительно. В некоторых примерах шарнирный домен представляет собой короткий сегмент, который может содержать до 60 аминокислотных остатков.

В конкретных примерах полипептид ACTR, как описано в данном документе, может содержать (i) костимулирующий домен CD28; и (ii) трансмембранный домен CD28, шарнирный домен CD28 или их комбинацию. Например, полипептид ACTR содержит компоненты (a)-(e), как показано в Таблице 3. В конкретных примерах полипептид ACTR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-80.

В конкретных примерах полипептид CAR, описанный в данном документе, может содержать (i) костимулирующий домен CD28 или костимулирующий домен 4-1BB; и (ii) трансмембранный домен CD28, шарнирный домен CD28 или их комбинацию. В дополнительных конкретных примерах полипептид CAR, описанный в данном документе, может содержать (i) костимулирующий домен CD28 или костимулирующий домен 4-1BB, (ii) трансмембранный домен CD8, шарнирный домен CD8 или их комбинацию. Например, полипептид CAR может содержать аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 104 и SEQ ID NO: 105.

Гемопозитические клетки, описанные в данном документе, экспрессирующие полипептид, модулирующий цикл Кребса, и, необязательно, полипептид химерного рецептора, могут представлять собой гемопозитическую стволовую клетку или ее потомство. В некоторых вариантах осуществления гемопозитические клетки могут

представлять собой иммунные клетки, такие как естественные клетки-киллеры, моноциты/макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы или Т-клетки. Иммунные клетки могут быть получены из моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК). В некоторых примерах иммунная клетка представляет собой Т-клетку, в которой экспрессия эндогенного Т-клеточного рецептора, эндогенного главного комплекса гистосовместимости, эндогенного бета-2-микроглобулина или их комбинации была ингибирована или устранена.

Любая из гемопоэтических клеток (*например*, ГСК или иммунных клеток), описанных в данном документе, может содержать нуклеиновую кислоту или набор нуклеиновых кислот, которые в совокупности содержат: (а) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, модулирующий цикл Кребса; и, необязательно (b) вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид химерного антигенного рецептора (CAR). Нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот представляет собой молекулу РНК или набор молекул РНК. В некоторых случаях иммунная клетка содержит нуклеиновую кислоту, которая содержит как первую нуклеотидную последовательность, так и вторую нуклеотидную последовательность. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность полипептида, модулирующего цикл Кребса, находится выше по ходу транскрипции по сравнению с кодирующей последовательностью полипептида CAR. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность полипептида CAR находится выше по ходу транскрипции по сравнению с кодирующей последовательностью полипептида, модулирующего цикл Кребса. Такая нуклеиновая кислота может дополнительно содержать третью нуклеотидную последовательность, расположенную между первой нуклеотидной последовательностью и второй нуклеотидной последовательностью, причем третья нуклеотидная последовательность кодирует участок проскока рибосомы (*например*, пептид Р2А), внутренний участок посадки рибосомы (IRES) или второй промотор.

В некоторых примерах нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот включены в вектор или набор векторов, которые могут быть вектором экспрессии или набором векторов экспрессии (*например*, вирусными векторами, такими как лентивирусные векторы или ретровирусные векторы). Набор нуклеиновых кислот или набор векторов относится к группе из двух или более молекул нуклеиновой кислоты или двух или более векторов, каждая(ый) из которых кодирует один из представляющих интерес полипептидов (*т. е.*, полипептида, модулирующего цикл Кребса, и полипептида CAR). Любая из описанных в данном документе нуклеиновых кислот также входит в объем настоящего изобретения.

В другом аспекте в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая любую из иммунных клеток, описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

Кроме того, в данном документе предложен способ ингибирования клеток, экспрессирующих целевой антиген (*например*, уменьшение количества таких клеток, блокирование пролиферации клеток и/или подавление активности клеток) у субъекта, при этом способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту популяции иммунных клеток, описанных в данном документе, которая может совместно экспрессировать полипептид, модулирующий цикл Кребса, и полипептид CAR. Субъект (*например*, *пациент*-человек, такой как пациент-человек, имеющий рак), возможно, лечился или лечится противораковой терапией (*например*, противораковым средством). В некоторых примерах, по крайней мере, некоторые из клеток, экспрессирующих целевой антиген, расположены в среде с низким содержанием глюкозы, среде с низким содержанием аминокислот (*например*, с низким содержанием глутамина), среде с низким pH и/или гипоксической среде, пример микроокружении опухоли.

В некоторых примерах иммунные клетки являются аутологичными. В других примерах иммунные клетки являются аллогенными. В любом из способов, описанных в данном документе, иммунные клетки могут быть активированы, размножены или и то, и другое *ex vivo*. В некоторых случаях иммунные клетки включают Т-клетки, которые активируются в присутствии одного или более из анти-CD3 антитела, анти-CD28 антитела, IL-2, фитогемагглютинаина и сконструированной искусственной стимулирующей клетки или частицы. В других случаях иммунные клетки включают естественные клетки-киллеры, которые активируются в присутствии одного или более из лиганда 4-1BB, анти-4-1BB антитела, IL-15, антитела к рецептору IL-15, IL-2, IL-12, IL-21 и клеток K562, сконструированной искусственной стимулирующей клетки или частицы.

В некоторых примерах субъект, подлежащий лечению способами, описанными в данном документе, может быть пациентом-человеком, имеющим рак, например, карциному, лимфому, саркому, бластому и лейкоз. Дополнительный пример целевого рака включает, но не ограничивается ими, рак В-клеточного происхождения, рак молочной железы, рак желудка, нейробластому, остеосаркому, рак легких, рак кожи, рак предстательной железы, рак толстой кишки, почечно-клеточную карциному, рак яичников, рабдомиосаркому, лейкемию, мезотелиому, рак поджелудочной железы, рак головы и шеи, ретинобластому, глиому, глиобластому, рак печени и рак щитовидной железы. Примеры рака В-клеточного происхождения выбирают из группы, состоящей из острого лимфобластного лейкоза В-линии, В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза и В-клеточной неходжкинской лимфомы.

В объем настоящего изобретения также входят применение генетически сконструированных иммунных клеток, описанных в данном документе, которые совместно экспрессируют полипептид, модулирующий цикл Кребса, и полипептид CAR, для лечения целевого заболевания или расстройства, такого как рак или инфекционное расстройство, и их применение для изготовления лекарственного средства для предполагаемого медицинского лечения.

Подробности одного или более вариантов осуществления изобретения изложены в

описании ниже. Другие признаки или преимущества настоящего изобретения будут очевидны из подробного описания нескольких вариантов осуществления, а также из приложенной формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Следующие графические материалы составляют часть настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения, которые можно лучше понять, обратившись к одному или более из этих графических материалов в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных в данном документе.

На *Фиг. 1* представлена диаграмма, показывающая пролиферацию Т-клеток, экспрессирующих CAR, нацеленный на GPC3 (SEQ ID NO: 104), или «контрольных» нетрансдуцированных Т-клеток в присутствии GPC3-экспрессирующих клеток-мишеней JHH7 или Нер3В и при различных концентрациях глюкозы. Пролиферация CAR-Т-клеток зависит от концентрации глюкозы.

На *Фиг. 2А* и *Фиг. 2В* показаны диаграммы, которые демонстрируют пролиферацию Т-клеток, экспрессирующих CAR, нацеленный на GPC3 (SEQ ID NO: 104) или совместно экспрессирующих CAR, нацеленный на GPC3, и GOT1 (SEQ ID NO: 87) в присутствии GPC3-экспрессирующих клеток-мишеней JHH7. *Фиг. 2А*: 1,25 мМ глюкозы. *Фиг. 2В*: 10 мМ глюкозы. Пролиферация CAR-Т-клеток, совместно экспрессирующих GOT1, усиливается по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR, при 1,25 мМ и 10 мМ глюкозы.

На *Фиг. 3А* и *Фиг. 3В* показаны диаграммы, которые демонстрируют пролиферацию Т-клеток, экспрессирующих CAR, нацеленный на GPC3 (SEQ ID NO: 104) или совместно экспрессирующих CAR, нацеленный на GPC3, и GOT2 (SEQ ID NO: 88) в присутствии GPC3-экспрессирующих клеток-мишеней JHH7. *Фиг. 3А*: 1,25 мМ глюкозы. *Фиг. 3В*: 10 мМ глюкозы. Пролиферация CAR-Т-клеток, совместно экспрессирующих GOT2, усиливается по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR, при 1,25 мМ и 10 мМ глюкозы.

На *Фиг. 4* показана диаграмма, демонстрирующая ингибирующую активность на ксенотрансплантатную опухоль JHH7 Т-клеток, экспрессирующих CAR, нацеленный на GPC3, и Т-клеток, совместно экспрессирующих CAR, нацеленный на GPC3 (SEQ ID NO: 104), и GOT2 (SEQ ID NO: 88).

На *Фиг. 5* показана диаграмма, демонстрирующая ингибирующую активность на ксенотрансплантатную опухоль NCI-H446 Т-клеток, экспрессирующих CAR, нацеленный на GPC3, и Т-клеток, совместно экспрессирующих CAR, нацеленный на GPC3 (SEQ ID NO: 104), и GOT2 (SEQ ID NO: 88).

На *Фиг. 6* показана диаграмма, демонстрирующая ингибирующую активность на ксенотрансплантатную опухоль Нер3В Т-клеток, экспрессирующих CAR, нацеленный на GPC3, и Т-клеток, совместно экспрессирующих CAR, нацеленный на GPC3 (SEQ ID NO: 104), и GOT2 (SEQ ID NO: 88).

На Фиг. 7 показана диаграмма, показывающая количество Т-клеток в периферической крови мышей, с ксенотрансплантатной опухолью Нер3В, которых лечили Т-клетками, экспрессирующими CAR, нацеленный на GPC3, и Т-клетками, совместно экспрессирующими CAR, нацеленный на GPC3 (SEQ ID NO: 104), и GOT2 (SEQ ID NO: 88).

На Фиг. 8А и Фиг. 8В показана экспрессия белка и активность аминотрансферазы в Т-клетках, совместно экспрессирующих CAR к GPC3 и GOT2. Фиг. 8А: вестерн-блоттинг демонстрирует повышенную экспрессию GOT2 в Т-клетках, совместно экспрессирующих CAR к GPC3 (SEQ ID NO: 104) и GOT2 (SEQ ID NO: 88), по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR. Т-клетки активировали опухолевыми клетками Нер3В, экспрессирующими GPC3, в течение 4 дней. Блоты окрашивали антителом к GOT2 человека или антителом к GAPDH человека, соответственно, для контроля загрузки. Фиг. 8В: Т-клетки, совместно экспрессирующие CAR к GPC3 и GOT2, демонстрируют повышенную активность фермента аспартатаминотрансферазы (AST) по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR. Т-клетки активировали опухолевыми клетками Нер3В, экспрессирующими GPC3, в течение 8 дней и измеряли активность фермента аспартатаминотрансферазы, используя коммерчески доступный анализ активности аспартатаминотрансферазы (Abcam).

На Фиг. 9А и Фиг. 9В представлены диаграммы, которые показывают, что Т-клетки, совместно экспрессирующие GOT2 (SEQ ID NO: 88) и CAR к GPC3 (SEQ ID NO: 104) или ACTR (SEQ ID NO: 1), демонстрируют повышенную пролиферацию по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR или ACTR. Фиг. 9А: CAR-Т-клетки активировали опухолевыми клетками Нер3В, экспрессирующими GPC3, в течение 6 дней. Пролиферацию оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием разведения клеточного красителя фиолетового цвета в качестве меры клеточного деления CD3⁺ Т-клеток; Фиг. 9В: Т-клетки ACTR активировали опухолевыми клетками НерG2, экспрессирующими GPC3, плюс антитело к GPC3 (GPC3, 1 мкг/мл) в течение 3 дней. Пролиферацию оценивали по количеству CD3⁺ Т-клеток с помощью проточной цитометрии. Результаты представлены для конструкций, совместно экспрессирующих GOT2, по сравнению с исходной конструкцией.

Фиг. 10А-10С представляют собой диаграммы, которые показывают, что Т-клетки, совместно экспрессирующие GOT2 (SEQ ID NO: 88) и CAR к GPC3 (SEQ ID NO: 104) или ACTR (SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 57), демонстрируют повышенную продукцию IL-17А по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR или ACTR. Фиг. 10А: GPC3-CAR (SEQ ID NO: 104). Фиг. 10В: ACTR (SEQ ID NO: 1). Фиг. 10С: ACTR (SEQ ID NO: 57). Т-клетки активировали в течение 24 часов с клетками НерG2, экспрессирующими GPC3, с добавлением антитела к GPC3 к совместным культурам ACTR, IL-17А измеряли в супернатантах с использованием анализа MSD. Повышенная продукция IL-17А по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR или ACTR, наблюдалась для конструкций, совместно экспрессирующих GOT2, независимо от типа конструкции (CAR

или ACTR) и первичного костимулирующего домена (4-1BB или CD28).

Фиг. 11A-11C представляют собой диаграммы, которые показывают, что Т-клетки, совместно экспрессирующие GOT2 (SEQ ID NO: 88) и CAR к GPC3 (SEQ ID NO: 104) или ACTR (SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 57), демонстрируют повышенную полифункциональность CD4⁺ по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR или ACTR. *Фиг. 11A*: GPC3-CAR (SEQ ID NO: 104). *Фиг. 11B*: ACTR (SEQ ID NO: 1). *Фиг. 11C*: ACTR (SEQ ID NO: 57). Т-клетки инкубировали при 37 °C, 5% CO₂ в течение 6 часов с GPC3-экспрессирующими клетками HepG2, с добавлением антитела к GPC3 в совместных культурах ACTR, в присутствии ингибиторов транспорта белков Брефельдина А и Моненсина. Клетки фиксировали и оценивали внутриклеточное окрашивание на IFN γ , IL-2, TNF α и IL-17A с помощью проточной цитометрии. Более высокая частота встречаемости CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих более одного, двух или трех цитокинов одновременно, наблюдалась для Т-клеток, совместно экспрессирующих GOT2 и ACTR или CAR, по сравнению с клетками, экспрессирующими только CAR или ACTR, независимо от типа химерного рецептора (CAR или ACTR) и первичного костимулирующего домена (4-1BB или CD28).

Фиг. 12A-12C представляют собой диаграммы, которые показывают, что Т-клетки, совместно экспрессирующие GOT2 (SEQ ID NO: 88) и CAR к GPC3 (SEQ ID NO: 104) или ACTR (SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 57), показали большую популяцию менее дифференцированных, подобных наивным CD8⁺ Т-клеток по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR или ACTR. *Фиг. 12A*: GPC3-CAR (SEQ ID NO: 104). *Фиг. 12B*: ACTR (SEQ ID NO: 1). *Фиг. 12C*: ACTR (SEQ ID NO: 57). CAR (SEQ ID NO: 104) Т-клетки, полученные от 11 здоровых доноров, и Т-клетки ACTR, полученные от 2 здоровых доноров (первичный домен костимуляции 4-1BB, SEQ ID NO: 1; первичный домен костимуляции CD28, SEQ ID NO: 57) окрашивали на наличие панели поверхностных маркеров и анализировали проточной цитометрией на наличие подобных наивным фенотипических маркеров. Клетки были гейтированы по CD8⁺/CAR⁺ (CAR) или CD8⁺/CD16⁺ (ACTR⁺). Субпопуляция этих популяций с положительным окрашиванием на маркеры CD27, CD45RO и CD62L и отрицательным окрашиванием на CD45RA было обогащено Т-клетками, совместно экспрессирующими GOT2 и ACTR или CAR по сравнению с клетками, экспрессирующими только CAR или ACTR, независимо от типа химерного рецептора (CAR или ACTR) и первичного костимулирующего домена (4-1BB или CD28).

На *Фиг. 13* показана диаграмма, которая показывает, что Т-клетки, совместно экспрессирующие GOT2 (SEQ ID NO: 88) и CAR к GPC3 (SEQ ID NO: 104), демонстрируют менее дифференцированный (более молодой) фенотип Т-клеток CD8⁺ по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR. CAR-Т-клетки, полученные от 11 здоровых доноров, окрашивали на наличие панели поверхностных маркеров и анализировали с помощью проточной цитометрии. Клетки были гейтированы по CD8⁺/CAR⁺. Популяции с окрашиванием на CD27⁺CD45RO⁺, CD27⁺RO⁻,

CD27+CD45RA⁺ или CD27+CD45RA⁻ указывают на менее дифференцированный фенотип. Эти субпопуляции были обогащены CAR-T-клетками, совместно экспрессирующими GOT2, по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR.

Фиг. 14 представляет собой диаграмму, которая показывает, что Т-клетки, совместно экспрессирующие GOT2 (SEQ ID NO: 88) и CAR к GPC3 (SEQ ID NO: 104), продемонстрировали пролиферативное преимущество по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR, при хронической стимуляции антигеном и гипоксии. CAR-T-клетки активировали опухолевыми клетками Нер3В, экспрессирующими GPC3, в течение 3 дней; а затем повторно стимулировали свежими клетками-мишенями в течение 3 дней в условиях нормального содержания кислорода (20% кислорода) или гипоксических (1,5%) условиях для имитации стресса микроокружения опухоли при хронической стимуляции антигеном с дополнительным стрессом гипоксии и без него. Затем пролиферацию оценивали с помощью проточной цитометрии CD3⁺ Т-клеток с использованием разведения клеточного красителя фиолетового цвета в качестве меры клеточного деления, и строили график, обратный средней флуоресценции.

Фиг. 15 представляет собой диаграмму, которая показывает, что Т-клетки, совместно экспрессирующие GOT2 (SEQ ID NO: 88) и CAR к GPC3 (SEQ ID NO: 104), продемонстрировали пролиферативное преимущество по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR, при ограниченном содержании глюкозы. CAR-T-клетки активировали опухолевыми клетками НерG2, экспрессирующими GPC3, в присутствии 10 мМ или 1,25 мМ глюкозы в течение 7 дней. Затем пролиферацию оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием разведения клеточного красителя фиолетового цвета в качестве меры клеточного деления, и строили график, обратный средней флуоресценции. CAR, экспрессирующие GOT2, обладают пролиферативным преимуществом в обоих условиях содержания глюкозы.

Фиг. 16 представляет собой диаграмму, которая показывает, что Т-клетки, совместно экспрессирующие GOT2 (SEQ ID NO: 88) и ACTR (SEQ ID NO: 57), демонстрируют усиленную пролиферацию в присутствии кинуренина, ингибитора Т-клеток, по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только ACTR.

Фиг. 17A-17C представляют собой диаграммы, которые показывают, что Т-клетки, совместно экспрессирующие GOT2 (SEQ ID NO: 88) и CAR к GPC3 (SEQ ID NO: 104), продемонстрировали повышенную активацию в опухоли по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR. *Фиг. 17A*: CD69. *Фиг. 17B*: CD25. *Фиг. 17C*: ICOS. Т-клетки, совместно экспрессирующие CAR и GOT2, продемонстрировали повышенную экспрессию маркеров активации по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR.

Фиг. 18A и *Фиг. 18B* представляют собой диаграммы, которые показывают, что Т-клетки, совместно экспрессирующие GOT2 (SEQ ID NO: 88) и CAR к GPC3 (SEQ ID NO: 104), продемонстрировали большую устойчивость к истощению в опухолях по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR. *Фиг. 18A*: субпопуляция CD4⁺ Т-клеток.

Фиг. 18B: субпопуляция CD8⁺ Т-клеток.

Фиг. 19A-19D представляют собой диаграммы, на которых показано, что CAR при совместной экспрессии с GOT2 устойчивы к истощению в GPC3-экспрессирующей опухоли; активация CAR специфична для опухоли по сравнению с антиген-отрицательной селезенкой. *Фиг. 19A*: день 6, субпопуляция CD4⁺ Т-клеток. *Фиг. 19B*: день 6, субпопуляция CD8⁺ Т-клеток. *Фиг. 19C*: день 13, субпопуляция CD4⁺ Т-клеток. *Фиг. 19D*: день 13, субпопуляция CD8⁺ Т-клеток.

Фиг. 20A и *Фиг. 20B* представляют собой диаграммы, которые показывают, что Т-клетки, совместно экспрессирующие GOT2 (SEQ ID NO: 88) и CAR к GPC3 (SEQ ID NO: 104), демонстрируют большую функцию после воздействия на опухоли *in vivo* по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR. *Фиг. 20A*: IL-17A. *Фиг. 20B*: IFN γ .

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Микроокружение опухоли имеет специфические характеристики, такие как низкое содержание глюкозы, низкое содержание аминокислот, низкий pH и/или гипоксические условия, некоторые из которых могут ограничивать активность эффекторных иммунных клеток, таких как эффекторные Т-клетки. Настоящее изобретение основано, по крайней мере частично, на разработке различных подходов для усиления активности эффекторных иммунных клеток в микроокружении опухоли посредством модуляции (*например*, усиления) реакций цикла Кребса эффекторными иммунными клетками, тем самым повышая их рост и биоактивность. Цикл Кребса может модулироваться различными факторами, включая уровень экспрессии ферментов цикла Кребса (*например*, естественных ферментов или их функциональных эквивалентов), статус активации таких ферментов, уровень экспрессии и активность ферментов, которые используют метаболиты цикла Кребса в качестве субстратов и/или уровень экспрессии и активность ферментов, которые превращают предшественников в метаболиты цикла Кребса.

Исследования, раскрытые в настоящем документе, неожиданно демонстрируют, что совместная экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, такого как GOT1 или GOT2, и полипептида химерного рецептора, такого как CAR (*например*, имеющего костимуляторный домен 4-1BB) или ACTR (*например*, имеющего костимуляторный домен 4-1BB или CD28) в иммунных клетках, таких как Т-клетки, проявляет превосходные свойства как *in vitro*, так и *in vivo* по сравнению с иммунными клетками, экспрессирующими только CAR или ACTR. Например, совместная экспрессия GOT1 или GOT2 с CAR или ACTR усиливает пролиферацию/размножение Т-клеток и функцию Т-клеток, особенно в условиях микроокружения солидной опухоли (*например*, гипоксии, условиях низкого содержания глюкозы и присутствие ингибиторов TME). Например, совместная экспрессия GOT2 способствует устойчивости к долговременной экспрессии ингибирующих рецепторов (*например*, PD1) и поддерживает функцию Т-клеток в микроокружении опухоли. Кроме того, совместная экспрессия GOT1 или GOT2 с CAR или ACTR усиливала противоопухолевые эффекты.

Соответственно, в настоящем изобретении предложены модифицированные (*например*, генетически сконструированные) гемопоэтические клетки (*например*, ГСК или иммунные клетки), которые обладают повышенной активностью модулирования цикла Кребса. Модификация цикла Кребса в иммунных клетках может быть достигнута любыми подходящими подходами. Например, модифицированные иммунные клетки могут экспрессировать один или более факторов, модулирующих цикл Кребса, которые могут быть молекулами любого типа, которые либо непосредственно участвуют в цикле Кребса (*например*, фермент, катализирующий одну или более реакций цикла Кребса), либо косвенно модулируют цикл Кребса, влияя на уровень экспрессии, активность и/или деградацию одного или более ферментов цикла Кребса. В некоторых вариантах осуществления фактор, модулирующий цикл Кребса, может быть полипептидом, модулирующим цикл Кребса, как описано в данном документе, который усиливает модуляцию цикла Кребса в экспрессирующих иммунных клетках, например, относительно их нативного аналога. В других вариантах осуществления фактор, модулирующий цикл Кребса, может представлять собой нуклеиновую кислоту (*например*, микроРНК, интерферирующую РНК, такую как миРНК или кшРНК или антисмысловая нуклеиновая кислота), которая регулирует экспрессию одного или более ферментов, катализирующих одну или более реакций цикла Кребса. В дополнительных вариантах осуществления фактор, модулирующий цикл Кребса, может представлять собой фактор транскрипции, который регулирует экспрессию одного или более ферментов цикла Кребса.

Такая генетически сконструированная иммунная клетка может дополнительно экспрессировать полипептид химерного рецептора, *например*, полипептид Т-клеточного рецептора, связанного с антителом (ACTR), или полипептид рецептора химерного антигена (CAR). В настоящем документе также предложены варианты применения генетически сконструированных иммунных клеток, необязательно в комбинации с Fc-содержащим агентом, когда это необходимо (*например*, когда иммунные клетки экспрессируют полипептид ACTR), для улучшения пролиферации иммунных клеток и/или ингибирования или уменьшения количества клеток-мишеней (*например*, раковых клеток-мишеней) у субъекта (*например*, больного раком человека), *например*, посредством ADCC. В настоящем описании также предложены фармацевтические композиции и наборы, содержащие описанные генетически сконструированные иммунные клетки.

Описанные в данном документе генетически сконструированные иммунные клетки, экспрессирующие (*например*, сверхэкспрессирующие) полипептид, модулирующий цикл Кребса, могут давать по меньшей мере следующие преимущества. Экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, может усилить метаболическую активность Т-клетки. Таким образом, генетически сконструированные иммунные клетки могут лучше пролиферировать, продуцировать больше цитокинов, проявлять большую противоопухолевую цитотоксичность, проявлять меньше иммунодепрессивных метаболитов и/или проявлять большую выживаемость Т-клеток в окружении опухоли

(например, при низком содержании глюкозы, низком содержании аминокислот, низком pH и/или гипоксической среде) по сравнению с иммунными клетками, которые не экспрессируют (или не сверхэкспрессируют) полипептид, модулирующий цикл Кребса, что приводит к усиленной продукции цитокинов, выживаемости, цитотоксичности и/или противоопухолевому действию.

Полипептиды, модулирующие цикл Кребса

Используемый в данном документе полипептид, модулирующий цикл Кребса, относится к любому полипептиду, который модулирует цикл Кребса, который связывает различные метаболические пути, такие как метаболические пути для обработки глюкозы, аминокислот и/или жирных кислот. Цикл Кребса, также известный как цикл лимонной кислоты и цикл трикарбоновых кислот (ТСА), представляет собой метаболический путь, который начинается с добавления ацетил-КоА, образующегося при гликолизе, к оксалоацетату с образованием цитрата. Такой полипептид может регулировать одну или более обратимых ферментативных реакций в цикле Кребса в пользу одного направления относительно другого, чтобы регулировать образующиеся из него метаболиты. Повышенный вклад в цикл Кребса одного источника метаболизма может перенаправить выходящие метаболиты другого пути. Например, полипептид, модулирующий цикл Кребса, может перенаправлять аланин в гликолитический путь, повышать уровень α -кетоглутарата (α KG) в пути синтеза ТСА и/или серина, например, посредством PSAT1, способствовать циклу ТСА в митохондриях и/или цитоплазме; выводить глюкозу из цикла ТСА, чтобы получить серин посредством PSAT1 или PSPH.

Кроме того, полипептид, модулирующий цикл Кребса, может увеличивать активность цикла Кребса в митохондриях и/или цитоплазме. Полипептид, модулирующий цикл Кребса, может также преобразовывать ингибирующие метаболиты, такие как лактат, в пируват, чтобы способствовать активности цикла Кребса. Любой такой полипептид, модулирующий цикл Кребса, который может происходить из любого подходящего вида (например, млекопитающего, такого как человек), может рассматриваться для использования в композициях и способах, описанных в настоящем документе.

Альтернативно, полипептид, модулирующий метаболит цикла Кребса, может быть молекулой, которая мутирована, чтобы имитировать активированный полипептид, модулирующий цикл Кребса (например, имитатор фосфорилирования), или мутирована, чтобы влиять на ее внутриклеточную миграцию (например, миграцию к митохондриям), так что активность Кребса цикл модулируется. Альтернативно, экспрессию эндогенного полипептида цикла Кребса можно модулировать, например, путем экспрессии фактора транскрипции или микроРНК, или путем модуляции стабильности или деградации полипептида, например, путем модуляции факторов, которые опосредуют его деградацию, например, лигазы E3, которая является частью пути убиквитина/протеасомы. Кроме того, миграцию эндогенного полипептида цикла Кребса можно модулировать, например, путем экспрессии полипептида, который увеличивает его миграцию в желаемый субклеточный компартмент, например, митохондрии. Кроме того, полипептид, модулирующий цикл

Кребса, может быть полипептидом, который ферментативно превращает субстраты, обнаруженные в больших количествах в микроокружении опухоли, которые ингибируют или ограничивают активность иммунных клеток, в молекулы, которые больше не обладают ингибирующими эффектами, таким образом улучшая функцию иммунных клеток.

Полипептиды, модулирующие цикл Кребса, могут быть полипептидами, обладающими ферментативной активностью, чтобы катализировать реакцию в цикле Кребса, например, естественными ферментами, которые катализируют реакцию цикла Кребса, или их функциональными вариантами/гомологами, которые катализируют ту же реакцию цикла Кребса. Примеры включают изоцитратдегидрогеназу (IDH, включая IDH1 или IDH2), малатдегидрогеназу (MDH, включая MDH1 или MDH2) или фосфоглицератдегидрогеназу (PHGDH), но не ограничиваются ими.

Изоцитратдегидрогеназа (IDH) относится к любому полипептиду (ферменту), который катализирует окислительное декарбоксилирование изоцитрата, приводящее к образованию α -кетоглутарата и CO_2 . Малатдегидрогеназа (MDH) относится к любому полипептиду (ферменту), который катализирует окисление малата до оксалоацетата с использованием восстановления NAD^+ до NADH. Фосфоглицератдегидрогеназа (PHGDH) относится к любому полипептиду (ферменту), который катализирует реакции преобразования 3-фосфо-D-глицерата в 3-фосфоноксипироват и превращения 2-гидрозиглутарата в 2-оксоглутарат с использованием восстановления NAD^+ до NADH. Аминокислотные последовательности примерных IDH, MDH и PHGDH представлены ниже:

IDH1 (SEQ ID NO: 81)

MSKKISGGSVVEMQGDDEMTRIIEWELIKEKLIFPYVELDLHSYDLGIENRDATNDQ
VTKDAAEAIAKKHNVGVKCATITPDEKRVVEEFKLKQMWKSPNGTIRNILGGTVFREAIICK
NIPRLVSGWVKPIIIGRHAYGDQYRATDFVVPGPVKVEITYTPSDGTQKVTYLVHNFEEG
GGVAMGMYNQDKSIEDFAHSSFQMALSKGWPLYLSTKNTILKKYDGRFKDIFQEIYDK
QYKSQFEAQKIWYEHRLIDDMVAQAMKSEGGFIWACKNYDGDVQSDSVAQGYGSLG
MMTSVLVCPDGKTVEAEAAHGTVTRHYRMYQKGQETSTNPIASIFAWTRGLAHRACL
DNNKELAFFANALEEVSIETIEAGFMTKDLAACIKGLPNVQRSDYLNTEFMDKLGLENL
KIKLAQAKL

IDH2 (SEQ ID NO: 82)

MAGYLRVVRSLCRASGSRPAWAPAALTAPTSQEPPRRHYADKRIKVAKPVVEM
DGDDEMTRIIEWQFIKEKLILPHVDIQLKYFDLGLPNRDQTDDQVTIDSALATQKYSVAVKC
ATITPDEARVEEFKLKKMWKSPNGTIRNILGGTVFREPIICKNIPRLVPGWTKPITIGRHA
HGDQYKATDFVADRAGTFKMVFTPKDGSVKEWEVYNFPAGGVGMGMYNNTDESISG
FAHSCFYAIQKKWPLYMSTKNTILKAYDGRFKDIFQEIFDKHYKTDFDKNKIWYEHRL
IDDMVAQVLKSSGGFVWACKNYDGDVQSDILAQGFGLGLMTSVLVCPDGKTIEAEAA
HGTVTRHYREHQKGRPTSTNPIASIFAWTRGLEHRGKLDGNQDLIRFAQMLEKVCVETV
ESGAMTKDLAGCIHGLSNVKNLNEHFLNTTDFLDTIKSNLDRALGRQ

MDH1 (SEQ ID NO: 83)

MSEPIRVLTGAAGQIAYSLLYSIGNGSVFGKDQPIILVLLDITPMMGVLDGVLM
ELQDCALPLLKDVIATDKEDVAFKDLDAVILVGSMPRREGMERKDLLKANVKIFKSQG
AALDKYAKKSVKVIVVGNPANTNCLTASKSAPSIPKENFSCLTRLDHNRAKAQIALKLG
VTANDVKNVHWNHSSSTQYPDVNHAKVKLQGKEVGVYEALKDDSWLKGEFVTTVQQ
RGA AVIKARKLSSAMSAKAICDHVRDIWFGTPEGEFVSMGVISDGNSYGVPPDLLYSF
PVVIKNKTWKFEGLPINDFSREKMDLTAKELTEEKESAFEFLSSA

MDH2 (SEQ ID NO: 84)

MLSALARPASAAARRSFSTSAQNNAKVAVLGASGGIGQPLSLLLKNSPLVSRLTL
YDIAHTPGVAADLSHIETKAAVKGYLGPEQLPDCLKGCDVVVIPAGVPRKPGMTRDDLF
NTNATIVATLTAACAQHCPEAMICVIANPNVNSTIPITAEVFKKHGVYNPNKIFGVTTLDIV
RANTFVAELKGLDPA RVNVPVIGGHAGKTIPLISQCTPKVDFPQDQLTALTGRIQEAGT
EVVKAKAGAGSATLSMAYAGARFVFSLV DAMNGKEGVVECSFVKSQETECTYFSTPLL
LGKKGIEKNLGIGKVSSFEEMISDAIPELKASIKKGEDFVKTLK

PHGDH (SEQ ID NO: 85)

MAFANLRKVLISDSLDPCCRKILQDGGGLQVVEKQNLSKEELIAELQDCEGLIVRS
ATKVTADVINA AEKLQVVGRAGTGVDNVDLEAATRKGILVMNTPNGNSLSAAELTCG
MIMCLARQIPQATASMKGKWERKKFMGTENGLKTLGILGLGRIGREVATRMQSFGM
KTIGYDPIISPEVSASFVQQLPLEEIWPLCDFITVHTPLLPSTTGLLNDNTFAQCKKGV RV
VNCARGGIVDEGALLRALQSGQCAGAALDVFTTEPPRDRALVDHENVISCPHLGASTKE
AQSRCGEEIAVQFVDMVKGKSLTG VVNAQALTSAFSPHTKPWIGLAEALGTLMRAWA
GSPKGTIQVITQGTSLKNAGNCLSPAVIVGLLKEASKQADVNLVNAKLLVKEAGLNVTT
SHSPAAPGEQGFGECLLAVALAGAPYQAVGLVQGTTPVLQGLNGAVFRPEVPLRRDLP
LLLFRQTQSDPAMLPTMIGLLAEAGVRLLSYQTSLSVSDGETWHVMGISSLLPSLEAWKQ
HVTEAFQFHF

Полипептиды, модулирующие цикл Кребса, также могут быть полипептидами, которые используют метаболит цикла Кребса в качестве субстрата, например глутамино-щавелевоуксусную трансаминазу (GOT, включая GOT1 и GOT2) или фосфоенолпируваткарбоксикиназу 1 (PCK1). Глутамино-щавелевоуксусная трансаминаза (GOT), также известная как аспартатаминотрансфераза (AST), относится к любому пиридоксальфосфат (PLP)-зависимому ферменту, который катализирует обратимую реакцию по переносу α -аминогруппы между аспартатом и глутаматом. В некоторых случаях GOT существует в цитоплазматической и внутримембранной митохондриальных формах, GOT1 и GOT2, соответственно. GOT также известен как. Различные PLP-зависимые ферменты, помимо GOT1 и GOT2, также могут быть полипептидами, модулирующими цикл Кребса, например, аминотрансферазой, триптофансинтазой, аланинрацемазой, аминотрансферазой D-аминокислот и гликогенфорилазой. Все эти ферменты входят в объем настоящего описания. Фосфоенолпируваткарбоксикиназа 1 (PCK1) относится к любому полипептиду (ферменту), который превращает оксалоацетат в фосфоенолпируват и диоксид углерода. Аминокислотные последовательности типичных

GOT и PCK1 представлены ниже:

PCK1 (SEQ ID NO: 86)

MPPQLQNGLNLSAKVVQGSLSLPQAVREFLENNALCQPDHIIHICDGSEEENGR
LLGQMEEEGILRRLKKYDNCWLALTDPRDVARIESTVIVTQEQRDTVPIPKTGLSQLGR
WMSEEDFEKAFNARFPGCMKGRTMYVIPFSMGPLGSPLSKIGIELTDSFYVVASMRIMT
RMGTPVLEAVGDGEFVKCLHSVGCPLPLQKPLVNNWPCNPETLIAHLPDRREIISFGSG
YGGNSLLGKKCFALRMASRLAKEEGWLAEHMLILGITNPEGEKKYLAAPPSACGKTN
LAMMNPSLPGWKVECVGDDIAWMKFDAQGHLRAINPENGFFGVAPGTSVKTNPNAIK
TIQKNTIFTNVAETSDGGVYWEGIDEPLASGVTTITSWKNKEWSSSEGEPCAHPSRFCTP
ASQCPIIDA AWESPEGVPIEGIIIFGGRRPAGVPLVYEALSWQHGVFVGAAMRSEATAAAE
HKGKIIMHDPFAMRPFYFGYNFGKYLAHWLSMAQHPAAKLPIFHVNWFRKDKEGKFL
WPGFGENSRVLEWMFNRIDGKASTKLTPIGYIPKEDALNLKGLGHINMMELFSISKEFW
EKEVEDIEKYLEDQVNADLPCEIEREILALKQRISQM

GOT1 (SEQ ID NO: 87)

MAPPSVFAEVPQAQPVLVFKLTADFREDPDPRKVN LGVGAYRTDDCHPWVLPV
VKKVEQKIANDNSLNHEYLPILGLAEFRSCASRLALGDDSPALKEKRVGGVQSLGGTGA
LRIGADFLARWYNGTNNKNTPVYVSSPTWENHNAVFSAAAGFKDIRSYRYWDAEKRL
DLQGFLNDLENAPEFSIVVLHACAHNPTGIDPTPEQWKQIASVMKHRFLFPFFDSAYQGF
ASGNLERDAWAIRYFVSEGFEEFCAQSFSKNFGLYNERVGNLTVVGKEPESILQVLSQM
EKIVRITWSNPPAQGARIVASTLSNPOLFEEWTGNVKTMA DRILTMRSELRARLEALKTP
GTWNHITDQIGMFSFTGLNPKQVEYLVNEKHIYLLPSGRINVSGLTTKNLDYVATSIHEA
VTKIQ

GOT2 (SEQ ID NO: 88)

MALLHSGRVLPGIAAAFHPGLAAAASARASSWWTHVEMGPPDPILGVTEAFKR
DTNSKKMNLGVGAYRDDNGKPYVLPVSRKAEAQIAAKNLDKEYLPIGGLAEFCKASAE
LALGENSEVLKSGRFVTVQTISGTGALRIGASFLQRFFKFSRDVFLPKPTWGNHTPIFRDA
GMQLQGYRYYPKTCGFDFTGAVEDISKIPEQSVLLHACAHNPTGVDPRPEQWKEIAT
VVKKRNLF AFFDMAYQGFASGDGKDAWAVRHFIEQGINVCLCQSYAKNMGLYGERV
GAFTMVCKDADEAKRVESQLKILIRPMYSNPPLNGARIAAAILNTPDLRKQWLQEVKV
MADRIIGMRTQLVSNLKKEGSTHNWQHITDQIGMFCFTGLKPEQVERLIKEFSIYMTKD
GRISVAGVTSSNVGYLAHAHQVTK

Кроме того, полипептид, модулирующий цикл Кребса, может быть ферментом, который превращает предшественника в метаболит цикла Кребса, например, фосфосерин аминотрансферазой (PSAT1), глутаматдегидрогеназой (GDH1; также известной как GLUD1), глутамат-пируваттрансаминазой 1 (GPT1) или глутаминазой (GLS). Фосфосерин аминотрансфераза (PSAT1) относится к любому полипептиду (ферменту), который катализирует обратимое превращение 3-фосфогидроксипирувата в фосфосерин и 3-гидрокси-2-оксо-4-фосфоноксипирувата в фосфогидрокситреонин. PSAT1 производит 2-оксоглутарат и О-фосфо-L-серин. Глутаматдегидрогеназа (GDH1) относится к любому полипептиду (ферменту), который превращает глутамат в α -кетоглутарат, и наоборот.

GDH1 превращает глутамат в 2-оксоглутарат (альфа-кетоглутарат). Глутамат-пируваттрансаминаза 1 (GPT1) относится к любому полипептиду (ферменту), который катализирует обратимое трансаминирование между аланином и 2-оксоглутаратом с образованием пирувата и глутамата. Глутаминаза (GLS) относится к любому полипептиду (ферменту), который генерирует глутамат из глутамина. Аминокислотные последовательности типичных PSAT1, GDH1, GPT1 и GLS представлены ниже:

GPT1 (SEQ ID NO: 89)

MASSTGDRSQAVRHGLRAKVLTLTGDMNPRVRRVEYAVRGPIVQRALELEQELR
QGVKKPFTEVIRANIGDAQAMGQRPITFLRQVLALCVNPDLLSSPNFPDDAKKRAERILQ
ACGGHSLGAYSVSSGIQLIREDVARYIERRDGGIPADPNNVFLSTGASDAIVTVLKLLVA
GEGHTRTGVLPIPIQYPLYSATLAELGAVQVDYYLDEERAWALDVAELHRALGQARDH
CRPRALCVINPGNPTGQVQTRECIEAVIRFAFEERLFLLADEVYQDNVYAAGSQFHSFKK
VLMEMGPPYAGQQELASFHSTSKGYMGECGFRGGYVEVVNMDAAVQQQMLKLMSVR
LCPPVPGQALLDLVVSPAPTDPSTFAQFQAEKQAVLAELA AAKAKLTEQVFNEAPGISCNP
VQGAMYSFPRVQLPPRAVERAQELGLAPDMFFCLRLLEETGICVVPGSGFGQREGTYHF
RMTILPPLEKLRLLEKLSRFHAKFTLEYS

GLS (SEQ ID NO: 90)

MMRLRGSGMLRDLLLRSPAGVSATLRRSQPLVTLCRRPRGGGRPAAGPAAAAR
LHPWWGGGGWPAEPLARGLSSSPSEILQELGKGSTHPQPGVSPPAAPAAPGPKDGPGET
DAFGNSEGKELVASGENKIKQGLLPSLEDLLFYTIAEGQEKIPVHKFITALKSTGLRTSDP
RLKECMDMLRLTLQTTS DGVM LDKDLFKKCVQSNIVLLTQAFRRKFVIPDFMSFTSHID
ELYESAKKQSGGKVADYIPQLAKFSPDLWGVSVCTVDGQRHSTGDTKVPFCLQSCVKP
LK Y A I A V N D L G T E Y V H R Y V G K E P S G L R F N K L F L N E D D K P H N P M V N A G A I V V T S L I K Q G
V N N A E K F D Y V M Q F L N K M A G N E Y V G F S N A T F Q S E R E S G D R N F A I G Y Y L K E K K C F P E G T D
M V G I L D F Y F Q L C S I E V T C E S A S V M A A T L A N G G F C P I T G E R V L S P E A V R N T L S L M H S C G M
Y D F S G Q F A F H V G L P A K S G V A G G I L L V V P N V M G M M C W S P P L D K M G N S V K G I H F C H D L V
S L C N F H N Y D N L R H F A K K L D P R R E G G D Q R V K S V I N L L F A A Y T G D V S A L R R F A L S A M D M E
Q R D Y D S R T A L H V A A A E G H V E V V K F L L E A C K V N P F P K D R W N N T P M D E A L H F G H H D V F K
I L Q E Y Q V Q Y T P Q G D S D N G K E N Q T V H K N L D G L L

PSAT1 (SEQ ID NO: 91)

MDAPRQVVNFPGPAKLPHSVLLEIQKELLDYKGVGISVLEMSHRSSDFAKIINN
TENLVRELLAVPDNYKVIFLQGGGCGQFSAVPLNLIGLKAGRCADYVVTGAWSAKAAE
EAKKFGTINIVHPKLGSYTKIPDPSTWNLPDASYVYYCANETVHGVEFDFIPDVKGAV
LVCDMSSNFLSKPVDVSKFGVIFAGAQKNVGSAGVTVVIVRDDLLGFALRECPSVLEYK
VQAGNSSLYNTPPCFYSIYVMGLVLEWIKNNGGAAAMEKLSSIKSQTIYEIINDNSQGFYVC
PVEPQNRSKMNIPFRIGNAKGDDALEKRFLDKALELNMLSLKGHRVGGIRASLYNAV
TIEDVQKLAAFMKKFLEMHQL

GDH1 (SEQ ID NO: 92)

MTYKCAVVDVPFGGAKAGVKINPKNYTDNELEKITRRFTMELAKKGFIPGIDV
PAPDMSTGEREMSWIADTYASTIGHYDINAHACVTGKPISQGGIHRISATGRGVFHGIE

NFINEASYMSILGMTPGFGDKTFVQVQFGNVGLHSMRYLHRFGAKCIAVGESDGSIWNP
 DGIDPKELEDFKLQHGSI LGFPKAKPYEGSILEADCDILIPAASEKQLTKSNAPRVKAKIIA
 EGANGPTTPEADKIFLERNIMVIPDLYLNAGGVTVSYFEWLKNLNHVSYGRLTFKYERD
 SNYHLLMSVQESLERKFGKHGGTIPIVPTAEFQDRISGASEKDIVHSGLAYTMERSARQI
 MRTAMKYNLGLDLRTAAYVNAIEKVKVYNEAGVTFT

Полипептид, модулирующий цикл Кребса, может быть встречающимся в природе полипептидом подходящего вида, например полипептидом, модулирующим цикл Кребса, млекопитающего, таким как полипептид, полученный от человека или приматов, не являющихся человеком. Такие встречающиеся в природе полипептиды известны в данной области и могут быть получены, например, с использованием любой из вышеупомянутых аминокислотных последовательностей в качестве запроса для поиска в общедоступной базе данных генов, например GenBank. Полипептид, модулирующий цикл Кребса, для применения в настоящем изобретении, может иметь по меньшей мере 85% (*например*, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или выше) идентичности последовательности, как и любой из типичных белков, указанных выше.

«Процент идентичности» двух аминокислотных последовательностей определяют с использованием алгоритма, описанного в Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, измененного, как описано в Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. Белковый поиск BLAST можно осуществлять с помощью программы XBLAST, показатель=50, длина слова=3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных с белковыми молекулами по изобретению. Если между двумя последовательностями существуют пробелы, можно использовать BLAST с гэпами, как описано в Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402, 1997. При использовании программ BLAST и BLAST с гэпами можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (*например*, XBLAST и NBLAST).

В некоторых вариантах осуществления полипептид, модулирующий цикл Кребса, может быть конъюгирован с сигнальным пептидом субклеточной локализации компартмента (*например*, сигнальным пептидом митохондриальной локализации) для доставки полипептида в желаемый субклеточный компартмент. *Например*, полипептид GOT2 может содержать сигнальный пептид митохондриальной локализации, так что он может быть доставлен в митохондрии в иммунной клетке хозяина.

Альтернативно, полипептид, модулирующий цикл Кребса, может быть функциональным вариантом нативного аналога. Такой функциональный вариант может содержать одну или более мутаций вне функционального домена(ов) нативного аналога. Функциональные домены нативного полипептида, модулирующего цикл Кребса, могут быть известны в данной области или могут быть предсказаны на основе его аминокислотной последовательности. Не ожидается, что мутации вне функционального домена(ов) существенно повлияют на биологическую активность белка. В некоторых

случаях функциональный вариант может демонстрировать повышенную модуляцию цикла Кребса по сравнению с нативным аналогом. Альтернативно функциональный вариант может демонстрировать пониженную модуляцию цикла Кребса по сравнению с нативным аналогом.

Функциональный вариант полипептида, модулирующего цикл Кребса, может быть функциональным вариантом полипептида дикого типа, который может содержать одну или более мутаций по сравнению с нативным аналогом и сохранять по существу такую же биологическую активность, что и нативный аналог. В некоторых вариантах осуществления функциональный вариант полипептида, модулирующего цикл Кребса, содержит по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть или более мутаций по сравнению с нативным аналогом.

Например, функциональный вариант GOT может содержать по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть или более мутаций по сравнению с нативным аналогом. В некоторых вариантах осуществления функциональный вариант GOT содержит мутацию остатка лизина в положении 159 (*например*, K159Q) в SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления функциональный вариант GOT содержит мутацию остатка лизина в положении 185 (*например*, K185Q) в SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления функциональный вариант GOT содержит мутацию остатка лизина в положении 404 (*например*, K404Q) в SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления функциональный вариант GOT содержит мутацию остатка лизина в положении 159 (*например*, K159Q) и положении 185 (*например*, K185Q) в SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления функциональный вариант GOT содержит мутацию остатка лизина в положении 185 (*например*, K185Q) и положении 404 (*например*, K404Q) в SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления функциональный вариант GOT содержит мутацию остатка лизина в положении 159 (*например*, K159Q) и положении 404 (*например*, K404Q) в SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления функциональный вариант GOT содержит мутацию остатка лизина в положении 159 (*например*, K159Q), положении 185 (*например*, K185Q) и положении 404 (*например*, K404Q) в SEQ ID NO: 88. См. также Yang et al., The EMBO Journal (2015) 34: 1100-1125, соответствующие раскрытия которых включены в настоящий документ посредством ссылки для целей или объекта изобретения, упомянутых в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления функциональный вариант полипептида, модулирующего цикл Кребса, может проявлять одно или более биологических свойств (*например*, статус модификации, каталитическую активность, расположение в клетке и/или партнеров по связыванию), которые могут быть изменены по сравнению с нативным аналогом. Неограничивающие примеры функционального варианта полипептида, модулирующего цикл Кребса, включают функциональный вариант фермента, который катализирует реакцию в цикле Кребса (*например*, функциональный вариант IDH, MDH

или PHGDH), функциональный вариант фермента, который использует метаболит цикла Кребса в качестве субстрата (*например*, функциональный вариант GOT или PCK1) и функциональный вариант фермента, который превращает предшественник в метаболит цикла Кребса (*например*, функциональный вариант PSAT1, GDH1, GPT1 или GLS).

Альтернативно или дополнительно, функциональный вариант может содержать консервативную мутацию(и) в одном или более положениях в нативном аналоге (*например*, до 20 положений, до 15 положений, до 10 положений, до 5, 4, 3, 2, 1 положения(й)). В данном контексте «консервативная аминокислотная замена» относится к аминокислотной замене, которая не изменяет характеристики заряда или размера белка, в котором производится аминокислотная замена. Варианты могут быть получены в соответствии со способами изменения полипептидной последовательности, известными среднему специалисту в данной области, например, которые можно найти в ссылках, в которых собраны такие методы, *например*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, или Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Консервативные замены аминокислот включают замены, сделанные среди аминокислот в следующих группах: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; и (g) E, D.

Полипептиды химерных рецепторов

Используемый в данном документе термин полипептид химерного рецептора относится к не встречающейся в природе молекуле, которая может экспрессироваться на поверхности клетки-хозяина. Полипептид химерного рецептора содержит внеклеточный мишень-связывающий домен, который может нацеливаться на интересующий антиген (*например*, антиген, связанный с таким заболеванием, как рак, или антиген, связанный с патогеном; см. обсуждение в данном документе). Внеклеточный мишень-связывающий домен может напрямую связываться с представляющим интерес антигеном (*например*, с внеклеточным антигенсвязывающим доменом в полипептиде CAR, как описано в данном документе). Альтернативно, внеклеточный мишень-связывающий домен может связываться с представляющим интерес антигеном *посредством* промежуточного соединения, например, Fc-содержащего агента, такого как антитело. Полипептид химерного рецептора может дополнительно содержать трансмембранный домен, шарнирный домен, цитоплазматический сигнальный домен, один или более костимулирующих доменов, цитоплазматический сигнальный домен или их комбинацию. В некоторых случаях полипептид химерного рецептора может не содержать костимулирующих доменов. Полипептиды химерного рецептора сконфигурированы так, что при экспрессии на клетке-хозяине внеклеточный мишень-связывающий домен располагается внеклеточно для связывания с целевым антигеном, прямо или косвенно. Необязательно, костимулирующий сигнальный домен может быть расположен в цитоплазме для запуска активации и/или эффекторной передачи сигналов.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды химерного рецептора,

описанные в настоящем документе, могут дополнительно содержать шарнирный домен, который может располагаться на С-конце внеклеточного мишень-связывающего домена и на N-конце трансмембранного домена. Шарнир может быть любой подходящей длины. В других вариантах осуществления полипептид химерного рецептора, описанный в данном документе, может вообще не иметь шарнирного домена. В еще других вариантах осуществления полипептид химерного рецептора, описанный в настоящем документе, может иметь укороченный шарнирный домен (*например*, включающий до 25 аминокислотных остатков).

В некоторых вариантах осуществления полипептид химерного рецептора, описанный в настоящем документе, может содержать от N-конца до С-конца внеклеточный мишень-связывающий домен, трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления полипептид химерного рецептора, описанный в настоящем документе, содержит от N-конца до С-конца внеклеточный мишень-связывающий домен, трансмембранный домен, по меньшей мере один костимулирующий сигнальный домен и цитоплазматический сигнальный домен. В других вариантах осуществления полипептид химерного рецептора, описанный в настоящем документе, содержит от N-конца до С-конца внеклеточный мишень-связывающий домен, трансмембранный домен, цитоплазматические сигнальные домены и по меньшей мере один костимулирующий сигнальный домен.

В некоторых вариантах осуществления полипептид химерного рецептора может представлять собой полипептид Т-клеточного рецептора, связанного с антителом (ACTR). В данном контексте полипептид ACTR (*также известный как* конструкция ACTR) относится к не встречающейся в природе молекуле, которая может экспрессироваться на поверхности клетки-хозяина и содержит внеклеточный домен с аффинностью связывания и специфичностью к Fc-части иммуноглобулина («домен связывания Fc» или «Fc-связывающий домен»), трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления полипептиды ACTR, описанные в настоящем документе, могут дополнительно содержать по меньшей мере один костимулирующий сигнальный домен.

В других вариантах осуществления полипептид химерного рецептора, раскрытый в данном документе, может быть полипептидом химерного рецептора антигена (CAR). В данном контексте полипептид CAR (*также известный как* конструкция CAR) относится к не встречающейся в природе молекуле, которая может экспрессироваться на поверхности клетки-хозяина и содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен. Описанные в данном документе полипептиды CAR могут дополнительно включать по меньшей мере один костимулирующий сигнальный домен.

Внеклеточный антигенсвязывающий домен может представлять собой любой пептид или полипептид, который специфически связывается с целевым антигеном, включая природные антигены, которые связаны с медицинским состоянием (*например*,

заболеванием), или антигенный фрагмент, конъюгированный с терапевтическим агентом, который нацелен на ассоциированный с заболеванием антиген.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды CAR, описанные в настоящем документе, могут дополнительно содержать по меньшей мере один костимулирующий сигнальный домен. Полипептиды CAR сконфигурированы так, что при экспрессии на клетке-хозяине внеклеточный антигенсвязывающий домен расположен внеклеточно для связывания с молекулой-мишенью и цитоплазматическим сигнальным доменом. Необязательно, костимулирующий сигнальный домен может быть расположен в цитоплазме для запуска активации и/или эффекторной передачи сигналов.

В данном контексте фраза «трансмембранный домен белка X» (*например*, трансмембранный домен CD8) относится к любой части данного белка, *т.е.* трансмембранному белку X, который термодинамически стабилен в мембране.

В данном контексте фраза «цитоплазматический сигнальный домен белка X», *например* цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ , относится к любой части белка (белка X), которая взаимодействует с внутренней частью клетки или органеллы и способна передавать первичный сигнал, известный в данной области, который приводит к пролиферации и/или активации иммунных клеток. Цитоплазматический сигнальный домен, описанный в данном документе, отличается от костимулирующего сигнального домена, который передает вторичный сигнал для полной активации иммунных клеток.

В данном контексте фраза «костимулирующий сигнальный домен белка X», *например*, костимулирующий сигнальный домен CD28, относится к части данного костимулирующего белка (белка X, такого как CD28, 4-1BB, OX40, CD27 или ICOS), которые могут передавать костимуляторные сигналы (вторичные сигналы) в иммунные клетки (*например*, Т-клетки), что приводит к полной активации иммунных клеток.

А. Внеклеточный мишень-связывающий домен

Полипептиды химерного рецептора, раскрытые в настоящем документе, содержат внеклеточный домен, который нацелен на интересующий антиген (*например*, описанные в данном документе) *посредством* прямого связывания или косвенного связывания (через посредника, такого как антитело). Полипептиды химерного рецептора могут быть полипептидами ACTR, которые содержат Fc-связывающий домен. Альтернативно, полипептиды химерного рецептора могут быть полипептидами CAR, которые содержат внеклеточный антигенсвязывающий домен.

Fc-связывающие домены

Полипептиды ACTR, описанные в данном документе, содержат внеклеточный домен, который представляет собой Fc-связывающий домен, *т.е.* способный связываться с Fc-частью иммуноглобулина (*например*, IgG, IgA, IgM или IgE) подходящего млекопитающего (*например*, человека, мыши, крысы, козы, овцы или обезьяны). Подходящие Fc-связывающие домены могут происходить из природных белков, таких как Fc-рецепторы млекопитающих, или определенных бактериальных белков (*например*, белка А, белка G). Кроме того, Fc-связывающие домены могут быть синтетическими

полипептидами, специально сконструированными для связывания Fc-части любого из описанных в данном документе антител с высокой аффинностью и специфичностью. Например, такой Fc-связывающий домен может быть антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который специфически связывает Fc-часть иммуноглобулина. Примеры включают одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), доменное антитело или однодоменные антитела (*например*, нанотела), но не ограничиваются ими. Альтернативно, Fc-связывающий домен может представлять собой синтетический пептид, который специфически связывает Fc-часть, такую как домен Кунитца, малое модульное иммунофармацевтическое средство (SMIP), аднектин, авимер, аффитело, DARPIn или антикалин, который может быть идентифицированным путем скрининга пептидной комбинаторной библиотеки на активность связывания с Fc.

В некоторых вариантах осуществления Fc-связывающий домен представляет собой внеклеточный лиганд-связывающий домен Fc-рецептора млекопитающего. В данном контексте «Fc-рецептор» представляет собой рецептор, связанный с клеточной поверхностью, который экспрессируется на поверхности многих иммунных клеток (включая В-клетки, дендритные клетки, естественные киллерные (NK) клетки, макрофаги, нейтрофилы, тучные клетки и эозинофилы) и проявляет специфичность связывания с Fc-доменом антитела. Fc-рецепторы обычно содержат по меньшей мере два иммуноглобулин (Ig)-подобных домена со специфичностью связывания с Fc (кристаллизующимся фрагментом)-частью антитела. В некоторых случаях связывание Fc-рецептора с Fc-частью антитела может запускать эффекты антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). Fc-рецептор, используемый для конструирования полипептида АСТР, как описано в данном документе, может быть вариантом природного полиморфизма (*например*, вариантом V158 CD16), который может иметь повышенную или пониженную аффинность к Fc по сравнению с аналогом дикого типа. Альтернативно, Fc-рецептор может быть функциональным вариантом аналога дикого типа, который несет одну или более мутаций (*например*, замен до 10 аминокислотных остатков, включая 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мутаций), которые изменяют аффинность связывания с Fc-частью молекулы Ig. В некоторых случаях мутация может изменить характер гликозилирования Fc-рецептора и, таким образом, аффинность связывания с Fc.

В таблице ниже перечислен ряд типичных полиморфизмов внеклеточных доменов Fc-рецептора (см., *например*, Kim et al., J. Mol. Evol. 53:1-9, 2001), которые можно использовать в любом из способов или конструкций, описанных в данном документе:

Таблица 1. Иллюстративные полиморфизмы в Fc-рецепторах

Номер аминокислоты	19	48	65	89	105	130	134	141	142	158
FCR10	R	S	D	I	D	G	F	Y	T	V
P08637	R	S	D	I	D	G	F	Y	I	F
S76824	R	S	D	I	D	G	F	Y	I	V

Номер аминокислоты	19	48	65	89	105	130	134	141	142	158
J04162	R	N	D	V	D	D	F	H	I	V
M31936	S	S	N	I	D	D	F	H	I	V
M24854	S	S	N	I	E	D	S	H	I	V
X07934	R	S	N	I	D	D	F	H	I	V
X14356 (FcγRII)	N	N	N	S	E	S	S	S	I	I
M31932 (FcγRI)	S	T	N	R	E	A	F	T	I	G
X06948 (FcαεI)	R	S	E	S	Q	S	E	S	I	V

Fc-рецепторы классифицируются на основе изотипа антитела, с которым они способны связываться. Например, рецепторы Fc-гамма (FcγR) обычно связываются с антителами IgG, такими как один или более их подтипов (*например*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4); рецепторы Fc-альфа (FcαR) обычно связываются с антителами IgA; и рецепторы Fc-эпсилон (FcεR) обычно связываются с антителами IgE. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой рецептор Fc-гамма, рецептор Fc-альфа или рецептор Fc-эпсилон. Примеры рецепторов Fc-гамма включают, без ограничения, CD64A, CD64B, CD64C, CD32A, CD32B, CD16A и CD16B. Примером рецептора Fc-альфа является FcαRI/CD89. Примеры рецепторов Fc-эпсилон включают, без ограничения, FcεRI и FcεRII/CD23. В таблице ниже перечислены типичные Fc-рецепторы для применения при конструировании полипептидов АСТР, описанных в данном документе, и их активность связывания с соответствующими Fc-доменами:

Таблица 2. Примеры Fc-рецепторов

Название рецептора	Основной лиганд антитела	Аффинность к лиганду
FcγRI (CD64)	IgG1 и IgG3	Высокая ($K_d \sim 10^{-9}$ М)
FcγRIIA (CD32)	IgG	Низкая ($K_d > 10^{-7}$ М)
FcγRIIB1 (CD32)	IgG	Низкая ($K_d > 10^{-7}$ М)
FcγRIIB2 (CD32)	IgG	Низкая ($K_d > 10^{-7}$ М)
FcγRIIIA (CD16a)	IgG	Низкая ($K_d > 10^{-6}$ М)
FcγRIIIB (CD16b)	IgG	Низкая ($K_d > 10^{-6}$ М)
FcεRI	IgE	Высокая ($K_d \sim 10^{-10}$ М)
FcεRII (CD23)	IgE	Низкая ($K_d > 10^{-7}$ М)
FcαRI (CD89)	IgA	Низкая ($K_d > 10^{-6}$ М)
Fcα/μR	IgA и IgM	Высокая для IgM, средняя для

		IgA
FcRn	IgG	

Выбор лиганд-связывающего домена Fc-рецептора для применения в полипептидах ACTR, описанных в данном документе, будет очевиден специалисту в данной области. Например, это может зависеть от таких факторов, как изотип антитела, с которым желательно связывание Fc-рецептора, и желаемая аффинность связывающего взаимодействия.

Внеклеточный антигенсвязывающий домен любого из полипептидов CAR. В некоторых примерах Fc-связывающий домен представляет собой внеклеточный лиганд-связывающий домен CD16, который может включать природный полиморфизм, который может модулировать аффинность к Fc. В некоторых примерах Fc-связывающий домен представляет собой внеклеточный лиганд-связывающий домен CD16, включающий полиморфизм в положении 158 (*например*, валин или фенилаланин). В некоторых вариантах осуществления Fc-связывающий домен продуцируется в условиях, которые изменяют его состояние гликозилирования и его аффинность к Fc.

Аминокислотные последовательности вариантов F158 CD16A и V158 CD16A человека представлены ниже, причем остатки F158 и V158 выделены жирным шрифтом и подчеркнуты (сигнальный пептид выделен курсивом):

F158 CD16A (SEQ ID NO: 93):

MWQLLLPTALLLVSA
GMRTE^DLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPE
DNS
TQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLQ
APR
WVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYF
CRGLFGSKNVSSETVNI TITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYF
SVKTNIRSSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK

V158 CD16A (SEQ ID NO: 94):

MWQLLLPTALLLVSA
GMRTE^DLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPE
DNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLQAP
RWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFC
RGLVGSKNVSSETVNI TITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYF SVKTNIR
SSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK

В некоторых вариантах осуществления Fc-связывающий домен представляет собой внеклеточный лиганд-связывающий домен CD16, включающий модификации, которые делают полипептид ACTR специфичным к субпопуляции антител IgG. Например, могут быть включены мутации, которые увеличивают или уменьшают аффинность к подтипу IgG (*например*, IgG1).

Любой из Fc-связывающих доменов, описанных в настоящем документе, может

иметь подходящую аффинность связывания с Fc-частью терапевтического антитела. Используемый в данном документе термин «аффинность связывания» относится к явной константе ассоциации или K_A . K_A является обратной величиной константы диссоциации K_D . Внеклеточный лиганд-связывающий домен Fc-рецепторного домена полипептидов ACTR, описанных в настоящем документе, может иметь аффинность связывания K_d по меньшей мере 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} М или ниже с Fc-частью антитела. В некоторых вариантах осуществления Fc-связывающий домен имеет высокую аффинность связывания с антителом, изотипом(ами) антител или их подтипом(ами) по сравнению с аффинностью связывания Fc-связывающего домена с другим антителом, изотипом(ами) антител или их подтипом(ами). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный лиганд-связывающий домен Fc-рецептора имеет специфичность к антителу, изотипу(ам) антител или их подтипу(ам) по сравнению со связыванием внеклеточного лиганд-связывающего домена Fc-рецептора с другим антителом, изотипом(ами) антител или их подтипом(ами).

Другие Fc-связывающие домены, известные в данной области, также могут быть использованы в конструкциях ACTR, описанных в данном документе, включая, например, описанные в WO 2015058018 A1 и заявке РСТ №: РСТ/US2018/015999, соответствующие описания каждого из которых включены посредством ссылки для цели и объекта изобретения, упомянутых в данном документе.

Внеклеточные антигенсвязывающие домены

Описанные в данном документе полипептиды CAR содержат внеклеточный антигенсвязывающий домен, который перенаправляет специфичность иммунных клеток, экспрессирующих полипептид CAR. Используемый в данном документе термин «внеклеточный антигенсвязывающий домен» относится к пептиду или полипептиду, обладающему специфичностью связывания с представляющим интерес целевым антигеном, который может быть природным антигеном, связанным с медицинским состоянием (*например*, заболеванием), или антигенному фрагменту, конъюгированному с терапевтическим агентом, который нацелен на ассоциированный с заболеванием антиген. Внеклеточный антигенсвязывающий домен, описанный в настоящем документе, не содержит внеклеточного домена Fc-рецептора и может не связываться с Fc-частью иммуноглобулина. Внеклеточный домен, который не связывается с Fc-фрагментом, означает, что активность связывания между ними не определяется с помощью обычного анализа или только фоновая или биологически незначимая активность связывания определяется с помощью обычного анализа.

В некоторых случаях внеклеточный антигенсвязывающий домен любого полипептида CAR, описанного в данном документе, представляет собой пептид или полипептид, способный связываться с антигеном клеточной поверхности (*например*, опухолевым антигеном), или антигеном (или его фрагментом), который находится в комплексе с главным комплекс гистосовместимости и представлен на клеточной поверхности антигенпрезентирующей клетки. Такой внеклеточный антигенсвязывающий

домен может представлять собой одноцепочечный фрагмент антитела (scFv), который может происходить из антитела, которое связывает целевой антиген клеточной поверхности с высокой аффинностью связывания. В таблице 1 ниже перечислены типичные целевые антигены на клеточной поверхности и типичные антитела, связывающиеся с ними.

Таблица 3. Типичный целевой антиген на клеточной поверхности и типичные антитела, связывающиеся с ним

Иллюстративные целевые антигены	Иллюстративные антитела		Иллюстративные целевые антигены	Иллюстративные антитела и Fc- слитые агенты
CD137 (4-1BB)	утомилумаб		CD74	милатузумаб
Гикопроtein трофобласта (5T4)	наптумомаб эстафенатокс		HLA-DR	IMMU-114
Рецептор аденозина A2a (A2aR)	mAb к A2aR		Hsp70	mi-TUMEXtx
Протеинкиназа Alk-1 (ACVRL1)	аскринваумаб		HSP 90	ZSG-102
ADAM-10 (ADAM10)	8C7		ICAM-1	BI-505
TACE (ADAM17)	MEDI-3622		Индукцибельный костимулятор Т- клеток (ICOS)	GSK-3359609
ADAM-28 (ADAM28)	GFC-201		Иммуноглобулин каппа (Ig каппа)	КарпаMab
CD156; иммуноглобулин G1; иммуноглобулин G2 (ADAM8)	MAB-1031		Антиген иммуноглобулина (Ig лямбда)	LambdaMab
ADAM-9 (ADAM9)	AEX-6003		Рецептор IL-6 (IL- 6R)	тоцилизумаб
Гомолог белка переднего градиента 2	агузумаб		Рецептор IL-7 (IL- 7R)	mAb к IL7R

(AGR2)				
Киназа анапластической лимфомы (ALK)	KTN-0125		Субъединица 1 альфа-рецептора IL-13 (IL13RA1)	ASLAN-004
Лиганд 2 ангиопоэтина (Ang-2); фактор А роста сосудистого эндотелия (VEGF- А)	вануцизумаб		Субъединица 2 альфа-рецептора IL-13 (IL13RA2)	mAb к IL13RA2
Лактадгерин (антиидиотипическ ое антитело)	TriAb (11D10)		Акцессорный белок рецептора IL-1 (IL1RAP)	CAN-04
Лиганд 13 фактора некроза опухоли (APRIL)	BION-1301		Бета-рецептор IL-2 (IL2R бета)	Mikbeta1
Бета-гидроксилаза аспартата (ASPH)	PAN-622		Иммуноглобулино подобный домен рецептора 2 (ILDR2)	BAY-1905254
Axl тирозинкиназа (AXL)	BA-3011		Интегрин альфа- X/бета-1 (Интегрин a10b1)	mAb к интегрину a10b1
Антиген CD276 (B7-H3)	BVD m276; hu8H9		Интегрин альфа- 3/бета-1 (Интегрин a3b1)	BCMab-1
Ингибитор 1 активации Т- клеток, содержащий иммуноглобулиноп одобный домен (VTCN1; также B7- H4)	FPA-150		Интегрин альфа- 6/бета-4 (Интегрин a6b4)	90Y-ITGA6B4

Фактор активации В-клеток; (BAFF; также TNFSF13B и CD257)	блисибимод	Интегрин альфа-9 (Интегрин α9)	GND-001
Рецептор фактора активации В-клеток; (BAFF-R; также TNFSF13C и CD268)	VAY736	CD49b (Интегрин альфа 2)	Ватлизумаб
Регулятор молекулярного шаперона BAG 3 (BAG3)	mAb к BAG3	CD49c (Интегрин альфа 3)	mAb к CD49c
Базигин (BSG; CD147)	cHAb18	CD49d; (Интегрин альфа 4)	mAb к CD49d
Антиген созревания В-клеток (BCMA; также TNFRSF17)	SEA-BCMA	CD51	абитузумаб
АДФ-рибозилциклаза-2 (BST1)	OX-001	CD29 (Интегрин бета 1)	OS-2966
Аттенуатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA)	40E4	CD61 (Интегрин бета 3)	mAb к CD61
Рецептор комплемента C5a (C5aR)	нейтразумаб	Jagged-1	mAb к Jagged-1
Субъединица кальциевого канала CACNA2D1 (CACNA2D1)	mAb к CACNA2D1	Связанный с почками антиген 1 (KAAG1)	AB-3A4
Карбоангидраза-IX (CAIX)	G250	Член 9 подсемейства К	Y-4

		калиевых каналов (KCNK9)	
Кальретикулин (CALR)	mAb к CALR	KIR2DL1/2L3	лирилумаб
Кавеолин 1 (CAV1)	mAb к CAV1	набор тирозин- протеинкиназы (KIT)	CDX-0158
Карбоангидраза- XII (CA XII)	¹⁷⁷ Lu-6A10-Fab; mAb к CA XII	L1CAM	mAb к L1CAM
Рецептор хемокинов CCR2 (CCR2)	позализумаб	Рецептор смерти 5 (DR5)	APOMAB
Рецептор хемокинов CCR3 (CCR3)	mAb к CCR3	CD223 (LAG3)	релатимаб
Рецептор хемокинов CCR4 (CCR4)	могамулизумаб	Льюис Y	hu3S193; MB311
Рецептор хемокинов CCR5 (CCR5)	PRO 140; CCR5mAb004	Транспортер цинка SLC39A6 (LIV1)	SGN-LIV1
Рецептор хемокинов CCR7 (CCR7)	mAb к CCR7	Лизилоксидазоподо- бный белок 2 (LOXL2)	AB-0023
Рецептор хемокинов CCR9 (CCR9)	mAb к CCR9	Содержащий богатые лейцином повторы белок 15 (LRRC15)	ABBV-085
Рецептор альфа интерлейкина-3 (IL3RA; CD123)	CSL362; KHK2823	Содержащий богатые лейцином повторы белок 32 (LRRC32)	ARGX-115
Аминопептидаза N (CD13)	MI-130110	Антиген лимфоцитов 75	MEN-1309

		(LY75)	
Проминин 1 (CD133)	mAb к CD133	Белок 3, содержащий домен Ly6/PLAUR (LYPD3)	BAY-1129980
Синдекан-1 (CD138)	индатуксимабората нзин	Антиген, ассоциированный с меланомой (пептид MAGE, презентованный ГКГС)	LxC-002
CD160	ELB-021	Матриптаза (ST14)	mAb к ST14
Активированная молекула клеточной адгезии лейкоцитов (CD166)	CX-2009	MICA/B	IPH4301
В-лимфоцитарный антиген CD19	MOR208	MIF/HLA-A2 (пептид MIF, презентованный ГКГС)	RL21A
В-лимфоцитарный антиген CD20	ритуксимаб; обинутузумаб; окарбатузумаб	Антимюллеров гормон II (MHR2)	GM-102
Мембранный гликопротеин OX2 CD200	самлизумаб	MMP1/HLA (пептид MMP1, презентованный ГКГС1)	mAb к MMP1/HLA
CD22	эпратузумаб	Металлопротеаза-9 (MMP9)	адекаликсимаб
Рецептор Fc- эпсилон-II иммуноглобулина (CD23)	люмиликсимаб	Мезотелин (MSLN)	MORAb-009

Передачик сигнала CD24	mAb к CD24		Муцин 1 (MUC1)	PankoMab-GEX
Альфа-субъединица рецептора IL-2 CD25	90Y-даклизумаб		Муцин 13 (MUC13)	mAb к MUC13
CD27	ветлумаб		Эндомукин (MUC14)	mAb к MUC14
CD28	терализумаб		Муцин 16 (MUC16)	софитузумаб
CD3	Муромонаб-CD3 (ОКТ3)		Гликопротеин клеточной поверхности MUC18 (CD146)	AA98
CD30	брентуксимаб ведотин		Муцин 5AC (MUC5AC)	эзитуксимаб
Рецептор Fc-гамма-IIb иммуноглобулина (CD32B)	BI-1206		N-гликолил GM3 (NeuGcGM3)	99mTc-меченный 14F7
CD33	линтузумаб		Натрий-зависимый белок транспорта фосфата 2B (SLC34A2)	XMT-1536
CD37	отлертузумаб		Нуклеолин (NCL)	антинуклеолиновые mAb
АДФ-рибозилциклаза-1 (CD38)	даратумумаб		Nectin-4	энфортумаб ведотин
CD39	OREG-103		Нейрофибромин (NF1)	mAb к нейрофибромину
CD4	IT-1208		Ганглиозид NGcGM3	ракотумумаб
CD40	лукатумумаб		NKG2A	монализумаб
CD43	лейкотуксимаб		октамер-	PAT-LM1

		связывающий белок, не содержащий домен POU (NONO)	
CD44	RG7356	Notch-1	бронтиксуумаб
CD45	131I-BC8	CD73	олелумаб
Белок мембранного кофактора (CD46)	AugmAb	Нетрин-1 (NTN1)	NP-137
CD47	Hu5F9-G4	OX-40	PF-04518600
CD52	алемтузумаб	P2X пуриноцептор 7 (P2RX7)	BIL-010t
CD55	PAT-SC1	Рецептор FGF (пан FGFR)	MM-161
Молекула адгезии нервных клеток 1; (CD56)	IMGN-901	Интегрин (пан-интегрин)	NOD201
Антиген дифференцировки Т-клеток CD6	итолизумаб	Р-кадгерин, также кадгерин-3 (CDH3)	PCA-062
CD70	SGN-70	Белок запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1)	пембролизумаб
CD79b	полатузумаб ведотин	Лиганд белка запрограммированной гибели клеток 1 (PD-L1)	авелумаб; Эхлос H12
CD8	mAb к CD8	Лиганд белка запрограммированной гибели клеток 2 (PD-L2)	rHIgM12B7
CD80	галиксимаб	Рецептор PDGF альфа (PDGFRA)	олатумумаб
CD98	IGN-523	Плацентарный	mAb к PLAC1

		белок 1 (PLAC1)	
CD99	NV-103	PR1/HLA (пептид PR1 в ГКГС)	mAb к PR1/HLA
Кадгерин-1 (CDH1)	mAb к CDH1	Рецептор пролактина PRLR	ABBV-176
Кадгерин-17 (CDH17)	mAb к CDH17	Фосфатидилсерин	mAb к фосфатидилсерину
Кадгерин 19 (CDH19)	mAb к CDH19	Антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA)	mAb к PSCA
Кадгерин-6 (CDH6)	HKT-288	Глутаматкарбоксипептидаза II (PSMA)	ATL-101
CD66a (CEACAM1)	CM-24	Белок, связанный с паратиреоидным гормоном (PTH-rP)	CAL
CD66e (CEACAM5)	IMMU-130	Тирозин-протеинподобная киназа 7 (PTK7)	кофетузумаб элидотин
CD66с; CD66е (CEACAM5/6)	NEO-201	Протеинтирозинфосфатаза IVA3 (PTP4A3)	PRL3-зумаб
Клаудин 18 (Клаудин 18.2)	IMAB362	Домен иммуноглобулина, связанный с рецептором полиовируса (PVRIG)	COM-701
Клаудин 6	IMAB027	Лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В (RANKL)	деносумаб
Член 7 семейства SLAM (CS1)	элотузумаб	Recepteur d'origine nantais	mAb к RON

		(RON)	
рецептор колониестимулирующего фактора-1 (CSF1R)	кабирализумаб	Трансmemбранный рецептор тирозин- протеинкиназы ROR1 (ROR1); также NTRKR1	цирмтузумаб
Цитотоксический Т-лимфоцитарный белок-4 (CTLA4)	ипилимумаб	Трансmemбранный рецептор тирозин- протеинкиназы ROR2 (ROR2); также NTRKR2	BA-3021
Рецептор вируса Коксаки и аденовируса (CXADR)	mAb к CXADR	R-спондин-3 (RSPO3)	розмантузумаб
Хемокиновый CXCR2 рецептор	mAb к CXCR2	Сфингозин-1- фосфатный рецептор 3 (S1PR3)	EDD7H9
Хемокиновый CXCR3 рецептор	mAb к CXCR3	Поверхностный антиген при лейкемии (SAIL)	IGN-786
Хемокиновый CXCR4 рецептор	улокуплумаб	Семафорин-4D (SEMA4D)	VX-15
Хемокиновый CXCR5 рецептор	STI-B030X	углеводный антиген 19-9 (CA 19-9)	MVT-1075
Хемокиновый CXCR7 рецептор	mAb к CXCR7	Новый антиген сиалил-Томсен (STn)	mAb к STn
DCLK1	mAb к DCLK1	Связывающий сиаловую кислоту Ig-подобный лектин 8 (Siglec-8)	AK-002

Dickkopf- связанный белок 1 (DKK1)	BHQ-880	Связывающий сиаловую кислоту Ig-подобный лектин 9 (Siglec-9)	mAb к Siglec-9
DLK1	ADCT-701	Сигнальный регуляторный белок альфа (SIRPA)	OSE-172
Лиганд 3 дельта- подобный белка (DLL3)	SC16LD6.5	CD48; также член 2 семейства SLAM (SLAMF2)	SGN-CD48A
Лиганд 4 дельта- подобного белка (DLL4); VEGF (VEGF)	навицксизумаб	CD352; член 6 семейства SLAM (SLAMF6)	SGN-CD352A
Дипептидилпептид аза-4 (DPP4), (также CD26)	YSCMA	Переносчик нейтральных аминокислот B0 (SLC1A5)	KM-8094
Рецептор смерти-3 (DR3)	PTX-35	Рецептор соматостатина 2 (SSTR2)	XmAb-18087
Рецептор TRAIL-1 (DR4)	HuYON007 MultYbody	Стабилин 1 (STAB1)	FP-1305
Рецептор TRAIL-1; рецептор TRAIL-2 (DR4/DR5)	Сурротело DR4/DR5	Металлоредуктаза (STEAP1)	⁸⁹ Zr-DFO- MSTP2109A
Рецептор TRAIL-2 (DR5)	DS-8273	Сурвивин	mAb к сурвивину
EGF-подобный белок 6 (EGFL6)	mAb к EGFL6	TAG-72	90Y-IDEC-159
Рецептор эпидермального фактора роста	цетуксимаб; Sym004; нимотузумаб	Т-клеточный рецептор (TCR)	mAb к TCR

(EGFR)				
Рецептор эпидермального фактора роста vIII (EGFRvIII)	ABT-806		Эндосиалин (TEM1)	онтуксизумаб
Эпителиальный мембранный белок 2 (EMP2)	ONCR-201		Рецептор 1 токсина сибирской язвы (ANTXR1); также TEM8	mAb к TEM8
Эндоглин	каротуксимаб		Тканевый фактор (TF)	MORAb-066
Член 3 семейства эктонуклеотидпиро фосфатазы/фосфодиэстеразы (ENPP3)	AGS-16C3F		Трансформирующий фактор роста, бета-рецептор II TGF-бета типа II (TGFB2)	mAb к TGFB2
Рецептор 2 простагландина E ₂ (PTGER2)	mAb к PTGER2		Антиген Томсена-Фриденрейха	JAA-F11
Рецептор 4 простагландина E ₂ (PTGER4)	mAb к PTGER4		Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM (TIGIT)	BMS-986207
ЕрСAM	опортузумаб монатокс		Клеточный рецептор 1 вируса гепатита А (HAVCR1); также TIM-1	CDX-014
Рецептор 2 эфрина типа А (EphA2)	MEDI-547		Клеточный рецептор 2 вируса гепатита А (HAVCR2); также TIM-3	MBG453
Рецептор 3 эфрина	KB004		Толл-подобный	OPN-305

типа А (EphA3)		рецептор 2 (TLR-2)	
Белок активации фибробластов (FAP)	F19	Толл-подобный рецептор 4 (TLR-4)	mAb к TLR4
CD95 (FAS)	асунерцепт	Член 1 семейства трансмембранных белков 4 L6 (TM4SF1)	mAb к TM4SF1
Fc-рецептор-подобный белок 5 (FCRL5)	RG-6160	Рецептор 2 фактора некроза опухоли (TNFR2)	mAb к TNFR2
Рецептор 1 FGF (FGFR1)	FP-1039	CD71	mAb к CD71
Рецептор 2b FGF (FGFR2b)	FPA-144	Триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках 1 (TREM1)	mAb к TREM1
Рецептор 3 FGF (FGFR3)	B-701	Ассоциированный с опухолью передатчик сигнала кальция 2 (Trop-2)	DS-1062
fms-подобная тирозинкиназа 3 (FLT3)	Flysyn	Рецептор TWEAK (TWEAKR)	MRT-101
Рецептор фолиевой кислоты альфа (FOLR1)	фарлетузумаб; IMGN853; KHK2805	Рецептор тирозин-протеинкиназы TYRO3 (TYRO3)	ELB-031
Бета-рецептор фолиевой кислоты (FOLR2)	mAb к FOLR бета	Рецептор урокиназы (uPAR)	MNPR-101
Frizzled-1; Frizzled-2; Frizzled-5; Frizzled-7; Frizzled-	вантиктумаб	VEGF-2 (VEGFR2)	рамуцирумаб

8; (FZD1,2,5,7,8)				
Фоллистатин-подобный белок 1 (FSTL1)	mAb к FSTL1		Виментин	притумумаб
Фукозил-GM1	BMS-986012		Супрессор активации Т-клеток V-домена Ig (VISTA)	JNJ-61610588
Frizzled-10 (FZD10)	OTSA-101		Интегрин альфа-4/бета-1	натализумаб
GCSF-R (Также CD114 и CSFR3)	CSL324		Йота-цепь иммуноглобулина (VPREB1)	mAb к VPREB1
Галектин-3-связывающий белок (LGALS3)	MP-1959		Опухолевый белок Вильмса (WT1/HLA); пептид WT1, презентованный ГКГС	ESK1
Гуанилатциклаза 2C (GUCY2C)	TAK-164		Глипикан-3 (GPC3)	кордитузумаб
GD2	динутуксимаб		Трансмембранный гликопротеин NMB (GPNMB)	CDX-011
GD3	PF-06688992		Рецептор 5, связанный с G-белком, содержащий богатые лейцином повторы (LGR5)	BNC-101
глюкокортикоид-индуцированный TNFR-связанный белок (GITR)	BMS-986156		Член D группы 5 семейства рецепторов, связанных с G-	JNJ-64407564

		белком (GPC5D)	
лиганд глюкокортикоид- индуцированного TNFR-связанного белка (GITRL)	EU-102	Ферритин	Ferritarg P
белок премеланоцитов (PMEL)	mAb к PMEL	Тирозинкиназа ErbB2 (HER2)	трастузумаб; пертузумаб; маргетуксимаб
Антиген клеточной поверхности A33 (GPA33)	mAb к GPA33	Тирозинкиназа ErbB3 (HER3)	патритумаб
Глипикан-1 (GPC1)	MIL-38	Globo H	OBI-888

Внеклеточный антигенсвязывающий домен может включать антигенсвязывающий фрагмент (*например*, scFv), полученный из любого из антител, перечисленных в таблице 1, в зависимости от представляющего интерес целевого антигена.

В других вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен любого из полипептидов CAR, описанных в настоящем документе, может быть специфичным к патогенному антигену, такому как бактериальный антиген, вирусный антиген или грибковый антиген. Ниже приведены некоторые примеры: нейраминидаза вируса гриппа, гемагглютинин или белок M2, гликопротеин F или гликопротеин G респираторно-синцитиального вируса (RSV) человека, гликопротеин gB, gC, gD или gE вируса простого герпеса, MOMP хламидий или белок PorB, коровий белок вируса денге, матричный белок или гликопротеин E, гемагглютинин вируса кори, гликопротеин gB вируса простого герпеса 2 типа, полиовирус I VP1, гликопротеины оболочки ВИЧ-1, коровий антиген или поверхностный антиген гепатита B, дифтерийный токсин, эпитоп Streptococcus 24M, пилин гонококка, вирус псевдобешенства g50 (gpD), вирус псевдобешенства II (gpB), вирус псевдобешенства III (gpC), гликопротеин H вируса псевдобешенства, гликопротеин E вируса псевдобешенства, гликопротеин трансмиссивного гастроэнтерита 195, белок трансмиссивного матрикса гастроэнтерита или гликопротеин E1 или E2 вируса гепатита C человека.

Кроме того, внеклеточный антигенсвязывающий домен полипептида CAR, описанного в данном документе, может быть специфичным к метке, конъюгированной с терапевтическим агентом, который нацелен на антиген, связанный с заболеванием или расстройством (*например*, опухолевый антиген или патогенный антиген, как описано в данном документе). В некоторых случаях метка, конъюгированная с терапевтическим агентом, может быть антигенной, а внеклеточный антигенсвязывающий домен полипептида CAR может быть антигенсвязывающим фрагментом (*например*, scFv)

антитела, имеющим высокую аффинность связывания и/или специфичность к антигенной метке. Примеры антигенных меток включают биотин, авидин, флуоресцентную молекулу (*например*, GFP, YFP, люциферазу или RFP), Мус, Flag, His (*например*, поли-His, такой как 6xHis), НА (гемеагглютинин), GST, MBP (белок, связывающий мальтозу), KLN (гемоцианины лимфы улитки), trx, T7, HSV, VSV (*например*, VSV-G), Glu-Glu, V5, e-tag, S-tag, KT3, E2, Au1, Au5 и/или тиоредоксин, но не ограничиваются ими.

В других случаях метка, конъюгированная с терапевтическим агентом, является членом пары лиганд-рецептор, а внеклеточный антигенсвязывающий домен включает другой член пары лиганд-рецептор или ее фрагмент, который связывает метку. Например, метка, конъюгированная с терапевтическим агентом, может быть биотином, а внеклеточный антигенсвязывающий домен полипептида CAR может содержать биотинсвязывающий фрагмент авидина. См., *например*, Urbanska et al., 2012, Lohmueller et al., 2018. Другие примеры включают анти-Tag CAR, в котором внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой фрагмент scFv, специфичный к белковой метке, такой как FITC (Tamada et al., 2012, Kim et al., 2015; Cao et al., 2016; and Ma et al., 2016), PNE (Rodgers et al., 2016), La-SS-B (Cartellieri et al., 2016), Biotin (Lohmullular et al., 2017) и Leucine-Zipper (Cho et al., 2018). Выбор антигенсвязывающего домена для использования в полипептидах CAR, описанных в данном документе, будет очевиден специалисту в данной области. Например, это может зависеть от таких факторов, как тип целевого антигена и желаемая аффинность связывающего взаимодействия.

Внеклеточный антигенсвязывающий домен любого из полипептидов CAR, описанных в настоящем документе, может обладать подходящей аффинностью связывания с целевым антигеном (*например*, любым из указанных в настоящем документе мишеней) или его антигенными эпитопами. Используемый в данном документе термин «аффинность связывания» относится к явной константе ассоциации или K_A . K_A является обратной величиной константы диссоциации (K_D). Внеклеточный антигенсвязывающий домен для применения в полипептидах CAR, описанных в данном документе, может иметь аффинность связывания (K_D), равную по меньшей мере 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} М или ниже с целевым антигеном или антигенным эпитопом. Повышенная аффинность связывания соответствует уменьшенной K_D . Более высокое аффинное связывание внеклеточного антигенсвязывающего домена с первым антигеном по сравнению со вторым антигеном может быть обозначено более высокой K_A (или меньшим числовым значением K_D) связывания первого антигена, чем K_A (или числовое значение K_D) связывания второго антигена. В таких случаях внеклеточный антигенсвязывающий домен обладает специфичностью к первому антигену (*например*, первому белку в первой конформации или его имитатору) по сравнению со вторым антигеном (*например*, тем же первым белком во второй конформации или его имитатором; или вторым белком). Различия в аффинности связывания (*например*, специфичности или другие сравнения) могут составлять по меньшей мере 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37,5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000, 10000 или 10^5 раз.

Аффинность связывания (или специфичность связывания) может быть определена различными способами, включая равновесный диализ, равновесное связывание, гель-фильтрацию, ИФА, поверхностный плазмонный резонанс или спектроскопию (*например*, с использованием анализа флуоресценции). Примерные условия для оценки аффинности связывания находятся в буфере HBS-P (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,005% (об./об.) ПАВ P20). Эти методики могут быть использованы для измерения концентрации связанного связывающего белка в зависимости от концентрации целевого белка. Концентрация связанного связывающего белка ([связанный]) обычно связана с концентрацией свободного целевого белка ([свободный]) следующим уравнением:

$$[\text{связанный}] = [\text{свободный}] / (K_d + [\text{свободный}])$$

Однако не всегда необходимо проводить точное определение K_d , поскольку иногда достаточно получить количественное измерение аффинности, *например*, определенное с помощью такого метода, как анализ ИФА или FACS, которое пропорционально K_d и, следовательно, может использоваться для сравнений, таких как определение того, является ли более высокая аффинность, *например*, в 2 раза выше, для получения качественного измерения аффинности или для получения заключения об аффинности, *например*, по активности в функциональном анализе, например, в анализе *in vitro* или *in vivo*.

В. Трансмембранный домен

Трансмембранный домен полипептидов химерного рецептора (*например*, полипептидов ASTR или полипептидов CAR), описанных в данном документе, может находиться в любой форме, известной в данной области техники. Используемый в данном документе термин «трансмембранный домен» относится к любой структуре белка, которая является термодинамически стабильной в клеточной мембране, предпочтительно эукариотической клеточной мембраной. Трансмембранный домен, совместимый для применения в полипептидах химерных рецепторов, используемых в данном документе, может быть получен из встречающегося в природе белка. Альтернативно, он может представлять собой синтетический не встречающийся в природе сегмент белка, *например* сегмент гидрофобного белка, который является термодинамически стабильным в клеточной мембране.

Трансмембранные домены классифицируются на основе трехмерной структуры трансмембранного домена. Например, трансмембранные домены могут образовывать альфа-спирали, комплекс из более чем одной альфа-спирали, бета-бочки или любую другую стабильную структуру, способную охватывать фосфолипидный бислой клетки. Кроме того, трансмембранные домены также или альтернативно могут быть классифицированы на основе топологии трансмембранного домена, включая количество проходов через мембрану трансмембранного домена и ориентации белка. Например, белки, пронизывающие мембрану один раз, пересекают клеточную мембрану один раз, а белки, пронизывающие мембрану множество раз, пересекают клеточную мембрану по меньшей мере дважды (*например*, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более раз).

Мембранные белки могут быть определены как белки типа I, типа II или типа III в зависимости от топологии их концов и мембранопронизывающего сегмента(ов) относительно внутренней и внешней части клетки. Мембранные белки типа I имеют одну трансмембранную область и ориентированы таким образом, что N-конец белка находится на внеклеточной стороне липидного бислоя клетки, а С-конец белка находится на цитоплазматической стороне. Мембранные белки типа II также имеют одну трансмембранную область, но ориентированы таким образом, что С-конец белка находится на внеклеточной стороне липидного бислоя клетки, а N-конец белка находится на цитоплазматической стороне. Мембранные белки типа III имеют множество трансмембранных сегментов и могут быть дополнительно подклассифицированы на основе количества трансмембранных сегментов и расположения N- и С-концов.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен полипептида химерного рецептора, описанного в данном документе, получен из белка, пронизывающего мембрану один раз, типа I. Белки, пронизывающие мембрану один раз, включают CD8 α , CD8 β , 4-1BB/CD137, CD27, CD28, CD34, CD4, Fc ϵ RI γ , CD16, OX40/CD134, CD3 ζ , CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ , TCR α , TCR β , TCR ζ , CD32, CD64, CD45, CD5, CD9, CD22, CD37, CD80, CD86, CD40, CD40L/CD154, VEGFR2, FAS и FGFR2B, но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой мембранный белок, выбранный из следующего: CD8 α , CD8 β , 4-1BB/CD137, CD28, CD34, CD4, Fc ϵ RI γ , CD16, OX40/CD134, CD3 ζ , CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ , TCR α , CD32, CD64, VEGFR2, FAS и FGFR2B. В некоторых примерах трансмембранный домен представляет собой CD8 (*например*, трансмембранный домен представляет собой CD8 α). В некоторых примерах трансмембранный домен представляет собой 4-1BB/CD137. В других примерах трансмембранный домен представляет собой CD28. В некоторых случаях полипептид химерного рецептора, описанный в данном документе, может не содержать шарнирного домена любого рецептора, отличного от CD16A. В некоторых случаях такой полипептид химерного рецептора может не содержать какого-либо шарнирного домена. Альтернативно или дополнительно, такой полипептид химерного рецептора может содержать две или более костимулирующих областей, как описано в данном документе. В других примерах трансмембранный домен представляет собой CD34. В еще других примерах трансмембранный домен получен не из CD8 α человека. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен полипептида химерного рецептора представляет собой альфа-спираль, пронизывающую мембрану один раз.

Трансмембранные домены из белков, пронизывающих мембрану множество раз, также могут быть совместимы для применения в полипептидах химерных рецепторов, описанных в данном документе. Белки, пронизывающие мембрану множество раз, могут содержать сложную структуру альфа-спирали (*например*, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более альфа-спиралей) или бета-складчатую структуру. Предпочтительно N-конец и С-конец белка, пронизывающего мембрану множество раз, присутствуют на противоположных сторонах липидного бислоя, *например*, N-конец белка расположен на

цитоплазматической стороне липидного бислоя, а С-конец белка расположен на внеклеточной стороне. Для конструирования полипептида химерного рецептора, описанного в данном документе, можно использовать один или множество проходов спирали из белка, пронизывающего мембрану множество раз.

Трансмембранные домены для применения в полипептидах химерных рецепторов, описанных в данном документе, также могут содержать по меньшей мере часть синтетического не встречающегося в природе белкового сегмента. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой синтетическую не встречающуюся в природе альфа-спираль или бета- бета-складчатую структуру. В некоторых вариантах осуществления белковый сегмент содержит по меньшей мере приблизительно 20 аминокислот, *например*, по меньшей мере 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более аминокислот. Примеры синтетических трансмембранных доменов известны в данной области техники, например, из патента США № 7052906 В1 и публикации РСТ № WO 2000/032776 А2, соответствующие описания каждого из которых включены в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность трансмембранного домена не содержит остатки цистеина. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность трансмембранного домена содержит один остаток цистеина. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность трансмембранного домена содержит два остатка цистеина. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность трансмембранного домена содержит более двух остатков цистеина (*например*, 3, 4, 5 или более).

Трансмембранный домен может содержать трансмембранную область и цитоплазматическую область, расположенную на С-конце трансмембранного домена. Цитоплазматическая область трансмембранного домена может содержать три или более аминокислот и, в некоторых вариантах осуществления, помогает направлять трансмембранный домен в липидном бислое. В некоторых вариантах осуществления один или более остатков цистеина присутствуют в трансмембранной области трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления один или более остатков цистеина присутствуют в цитоплазматической области трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматическая область трансмембранного домена содержит положительно заряженные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматическая область трансмембранного домена содержит аминокислоты аргинин, серин и лизин.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранная область трансмембранного домена содержит гидрофобные аминокислотные остатки. В некоторых вариантах осуществления трансмембранная область содержит в основном гидрофобные аминокислотные остатки, такие как аланин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, триптофан или валин. В некоторых вариантах осуществления трансмембранная область

является гидрофобной. В некоторых вариантах осуществления трансмембранная область содержит последовательность полилейцин-аланина.

Гидропатия, гидрофобные или гидрофильные характеристики белка или белкового сегмента можно оценить любым способом, известным в данной области техники, включая, например, анализ гидропатии Кайта и Дулитла.

С. Костимулирующие сигнальные домены

Многие иммунные клетки требуют костимуляции, в дополнение к стимуляции антигенспецифическим сигналом, для стимулирования пролиферации, дифференциации и выживания клеток, а также для активации эффекторных функций клетки. В некоторых вариантах осуществления полипептиды химерных рецепторов, такие как полипептиды ASTR или CAR, описанные в настоящем документе, содержат по меньшей мере один костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления полипептиды химерных рецепторов могут содержать костимулирующий сигнальный домен CD28 или костимулирующий сигнальный домен 4-1BB (CD137). Используемый в данном документе термин «костимуляторный сигнальный домен» относится по меньшей мере к фрагменту костимулирующего сигнального белка, который опосредует трансдукцию сигнала в клетке, чтобы индуцировать иммунный ответ, такой как эффекторная функция (вторичный сигнал). Как известно в данной области, для активации иммунных клеток, таких как Т-клетки, часто требуются два сигнала: (1) антигенспецифический сигнал (первичный сигнал), запускаемый взаимодействием Т-клеточного рецептора (TCR) и комплексов антигенный пептид/ГКГС, представленных антигенпрезентирующими клетками, который обычно управляется CD3 ζ как компонентом комплекса TCR; и (ii) костимулирующий сигнал (вторичный сигнал), запускаемый взаимодействием между костимулирующим рецептором и его лигандом. Костимулирующий рецептор передает костимулирующий сигнал (вторичный сигнал) в качестве дополнения к сигналам, запускаемым TCR, и модулирует ответы, опосредованные иммунными клетками, такими как Т-клетки, NK-клетки, макрофаги, нейтрофилы или эозинофилы.

Активация костимулирующего сигнального домена в клетке-хозяине (*например*, иммунной клетке) может индуцировать клетку к увеличению или уменьшению продукции и секреции цитокинов, фагоцитарных свойств, пролиферации, дифференциации, выживания и/или цитотоксичности. Костимулирующий сигнальный домен любой костимулирующей молекулы может быть совместим для применения в полипептидах химерного рецептора, описанных в данном документе. Тип(ы) костимулирующего сигнального домена выбирается на основе таких факторов, как тип иммунных клеток, в которых будут экспрессироваться полипептиды химерного рецептора (*например*, Т-клетки, NK-клетки, макрофаги, нейтрофилы или эозинофилы) и желаемая иммунная эффекторная функция (*например*, ADCC). Примерами костимулирующих сигнальных доменов для применения в полипептидах химерных рецепторов может быть цитоплазматический сигнальный домен костимулирующих белков, включая, без

ограничения, членов семейства B7/CD28 (*например*, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BTLA/CD272, CD28, CTLA-4, Gi24/VISTA/B7-H5, ICOS/CD278, PD-1, PD-L2/B7-DC и PDCD6); члены суперсемейства TNF (*например*, 4-1BB/TNFRSF9/CD137, 4-1BB лиганд/TNFSF9, BAFF/BLyS/TNFSF13B, BAFF R/TNFRSF13C, CD27/TNFRSF7, CD27 лиганд/TNFSF7, CD30/TNFRSF8, CD30 лиганд/TNFSF8, CD40/TNFRSF5, CD40/TNFSF5, CD40 лиганд/TNFSF5, DR3/TNFRSF25, GITR/TNFRSF18, GITR лиганд/TNFSF18, HVEM/TNFRSF14, LIGHT/TNFSF14, лимфотоксин-альфа/TNF-бета, OX40/TNFRSF4, OX40 лиганд/TNFSF4, RELT/TNFRSF19L, TACI/TNFRSF13B, TL1A/TNFSF15, TNF-альфа и TNF RII/TNFRSF1B); члены семейства SLAM (*например*, 2B4/CD244/SLAMF4, BLAME/SLAMF8, CD2, CD2F-10/SLAMF9, CD48/SLAMF2, CD58/LFA-3, CD84/SLAMF5, CD229/SLAMF3, CRACC/SLAMF7, NTB-A/SLAMF6 и SLAM/CD150); и любые другие костимулирующие молекулы, такие как CD2, CD7, CD53, CD82/Kai-1, CD90/Thy1, CD96, CD160, CD200, CD300a/LMIR1, HLA класса I, HLA-DR, Ikaros, интегрин альфа 4/CD49d, интегрин альфа 4 бета 1, интегрин альфа 4 бета 7/LPAM-1, LAG-3, TCL1A, TCL1B, CRTAM, DAP12, дектин-1/CLEC7A, DPPIV/CD26, EphB6, TIM-1/KIM-1/HAVERCR, TIM-4, TSLP, TSLP R, антиген-1, связанный с функцией лимфоцитов (LFA-1), и NKG2C. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен представляет собой 4-1BB, CD28, OX40, ICOS, CD27, GITR, HVEM, TIM1, LFA1 (CD11a) или CD2, или любой их вариант.

Также в объем настоящего изобретения входят варианты любого из костимулирующих сигнальных доменов, описанных в данном документе, так что костимулирующий сигнальный домен способен модулировать иммунный ответ иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления костимулирующие сигнальные домены содержат до 10 мутаций аминокислотных остатков (*например*, 1, 2, 3, 4, 5 или 8), таких как аминокислотные замены, делеции или добавления, по сравнению с аналогом дикого типа. Такие костимулирующие сигнальные домены, содержащие один или более вариантов аминокислот (*например*, аминокислотные замены, делеции или добавления), могут называться вариантами.

Мутация аминокислотных остатков костимулирующего сигнального домена может приводить к усилению сигнальной трансдукции и усилению стимуляции иммунных ответов по сравнению с костимулирующими сигнальными доменами, которые не содержат мутации. Мутация аминокислотных остатков костимулирующего сигнального домена может приводить к уменьшению сигнальной трансдукции и снижению стимуляции иммунных ответов по сравнению с костимулирующими сигнальными доменами, которые не содержат мутации. Например, мутация остатков 186 и 187 нативной аминокислотной последовательности CD28 может привести к увеличению костимулирующей активности и индукции иммунных ответов костимулирующим доменом полипептида химерного рецептора. В некоторых вариантах осуществления мутации представляют собой замену лизина в каждом из положений 186 и 187 на остаток

глицина в костимулирующем домене CD28, называемом вариантом CD28_{LL→GG}. Дополнительные мутации, которые могут быть сделаны в костимулирующих сигнальных доменах, которые могут усиливать или снижать костимулирующую активность домена, будут очевидны среднему специалисту в данной области. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен относится к варианту 4-1BB, CD28, OX40 или CD28_{LL→GG}.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды химерного рецептора могут содержать единственный костимулирующий домен, такой как, например, костимулирующий домен CD27, костимулирующий домен CD28, костимулирующий домен 4-1BB, костимулирующий домен ICOS или костимулирующий домен OX40.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды химерного рецептора могут содержать более одного костимулирующего сигнального домена (*например*, 2, 3 или более). В некоторых вариантах осуществления полипептид химерного рецептора содержит два или более одинаковых костимулирующих сигнальных доменов, например, две копии костимулирующего сигнального домена CD28. В некоторых вариантах осуществления полипептид химерного рецептора содержит два или более костимулирующих сигнальных доменов из различных костимулирующих белков, таких как любые два или более костимулирующих белков, описанных в данном документе. Выбор типа(ов) костимулирующих сигнальных доменов может быть основан на таких факторах, как тип клеток-хозяев, подлежащих применению с полипептидами химерных рецепторов (*например*, Т-клеток или НК-клеток) и желаемая иммунная эффекторная функция. В некоторых вариантах осуществления полипептид химерного рецептора содержит два костимулирующих сигнальных домена, например, две копии костимулирующего сигнального домена CD28. В некоторых вариантах осуществления полипептид химерного рецептора может содержать два или более костимулирующих сигнальных доменов от разных костимулирующих рецепторов, таких как любые два или более костимулирующих рецепторов, описанных в данном документе, например, CD28 и 4-1BB, CD28 и CD27, CD28 и ICOS, вариант CD28_{LL→GG} и 4-1BB, CD28 и OX40 или вариант CD28_{LL→GG} и OX40. В некоторых вариантах осуществления два костимулирующих сигнальных домена представляют собой CD28 и 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления два костимулирующих сигнальных домена представляют собой вариант CD28_{LL→GG} и 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления два костимулирующих сигнальных домена представляют собой CD28 и OX40. В некоторых вариантах осуществления два костимулирующих сигнальных домена представляют собой вариант CD28_{LL→GG} и OX40. В некоторых вариантах осуществления полипептиды химерных рецепторов, описанные в данном документе, могут содержать комбинацию CD28 и ICOSL. В некоторых вариантах осуществления полипептид химерного рецептора, описанный в данном документе, может содержать комбинацию CD28 и CD27. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен 4-1BB расположен на N-конце по отношению к костимулирующему сигнальному домену CD28 или варианта

CD28_{LL→GG}.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды химерного рецептора, описанные в настоящем документе, не содержат костимулирующего сигнального домена.

D. Цитоплазматический сигнальный домен

Любой цитоплазматический сигнальный домен может быть использован для создания описанных в данном документе полипептидов химерных рецепторов (*например*, полипептидов АСТР или полипептидов САР). Такой цитоплазматический домен может быть любым сигнальным доменом, участвующим в запуске клеточной передачи сигналов (первичной передачи сигналов), которая приводит к пролиферации и/или активации иммунных клеток. Цитоплазматический сигнальный домен, как описано в данном документе, не является костимулирующим сигнальным доменом, который, как известно в данной области техники, передает костимулирующий или вторичный сигнал для полной активации иммунных клеток.

Описанный в данном документе цитоплазматический домен может содержать домен иммунорецепторного тирозинового активирующего мотива (ИТАМ) (*например*, по меньшей мере один домен ИТАМ, по меньшей мере два домена ИТАМ или по меньшей мере три домена ИТАМ) или может не содержать ИТАМ. Используемый в данном документе термин «ИТАМ» представляет собой консервативный белковый мотив, который обычно присутствует в хвостовой части сигнальных молекул, экспрессируемых во многих иммунных клетках. Мотив может содержать два повтора аминокислотной последовательности YxxL/I, разделенные 6-8 аминокислотами, где каждый x независимо представляет собой любую аминокислоту, продуцируя консервативный мотив YxxL/I₍₆₋₈₎YxxL/I. ИТАМ в сигнальных молекулах важны для передачи сигнала в клетке, которая опосредуется, по крайней мере частично, фосфорилированием остатков тирозина в ИТАМ после активации сигнальной молекулы. ИТАМ могут также функционировать как стыковочные сайты для других белков, участвующих в сигнальных путях.

В некоторых примерах цитоплазматический сигнальный домен получен из CD3ζ или FcεR1γ. В других примерах цитоплазматический сигнальный домен получен не из CD3ζ человека. В еще других примерах цитоплазматический сигнальный домен получен не из Fc-рецептора, когда внеклеточный Fc-связывающий домен того же полипептида химерного рецептора получен из CD16A.

В одном конкретном варианте осуществления несколько сигнальных доменов могут быть слиты вместе для аддитивного или синергетического эффекта. Неограничивающие примеры применимых дополнительных сигнальных доменов включают часть или все из одной или более цепей TCR Zeta, CD28, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, FcεRIγ, ICOS/CD278, IL2R-бета/CD122, IL-2R-гамма/CD132 и CD40.

В других вариантах осуществления цитоплазматический сигнальный домен, описанный в данном документе, не содержит мотив ИТАМ. Примеры включают цитоплазматический сигнальный домен Jak/STAT, рецептор толл-интерлейкина (TIR) и тирозинкиназу, но не ограничиваются ими.

Е. Шарнирный домен

В некоторых вариантах осуществления полипептиды химерного рецептора, такие как полипептиды АСТР или полипептиды САР, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат шарнирный домен, который расположен между внеклеточным лиганд-связывающим доменом и трансмембранным доменом. Шарнирный домен представляет собой аминокислотный сегмент, который обычно находится между двумя доменами белка и может обеспечить гибкость белка и перемещение одного или обоих доменов относительно друг друга. Может быть использована любая аминокислотная последовательность, которая обеспечивает такую гибкость и перемещение внеклеточного лиганд-связывающего домена относительно трансмембранного домена полипептида химерного рецептора.

Шарнирные домены любого белка, известного в данной области техники, содержащие шарнирный домен, совместимы для применения в полипептидах химерных рецепторов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен является по меньшей мере частью шарнирного домена встречающегося в природе белка и обеспечивает гибкость полипептида химерного рецептора. В некоторых вариантах реализации шарнирный домен получен из CD8. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой часть шарнирного домена CD8, *например, фрагмент*, содержащий по меньшей мере 15(*например, 20, 25, 30, 35 или 40*) последовательных аминокислот шарнирного домена CD8. В некоторых вариантах реализации шарнирный домен получен из CD28. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой часть шарнирного домена CD28, *например, фрагмент*, содержащий по меньшей мере 15(*например, 20, 25, 30, 35 или 40*) последовательных аминокислот шарнирного домена CD28. Шарнирный домен и/или трансмембранный домен могут быть связаны с дополнительными аминокислотами (*например, 15-аа, 10-аа, 8-аа, 6-аа или 4-аа*) в N-концевой части, в С-концевой части или в обоих. Примеры можно найти, *например*, в Ying et al., Nature Medicine, 25(6):947-953 (2019).

В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой рецептор CD16A, например, полный шарнирный домен рецептора CD16A или его часть, который может состоять из до 40 последовательных аминокислотных остатков рецептора CD16A (*например, 20, 25, 30, 35 или 40*). Такой полипептид химерного рецептора (*например, полипептид АСТР*) может не содержать шарнирного домена из другого рецептора (рецептора, отличного от CD16A).

Шарнирные домены антител, таких как антитела IgG, IgA, IgM, IgE или IgD, также совместимы для применения в полипептидах химерных рецепторов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой шарнирный домен, который соединяет константные домены CH1 и CH2 антитела. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен происходит из антитела и включает шарнирный домен антитела и одну или более константных областей антитела. В

некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит шарнирный домен антитела и константную область СНЗ антитела. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит шарнирный домен антитела и константные области СН2 и СНЗ антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG, IgA, IgM, IgE или IgD. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит шарнирную область и константные области СН2 и СНЗ антитела IgG1. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит шарнирную область и константную область СНЗ антитела IgG1.

Не встречающиеся в природе пептиды также могут быть применимы в качестве шарнирных доменов для полипептидов химерных рецепторов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен между С-концом внеклеточного мишень-связывающего домена и N-концом трансмембранного домена представляет собой пептидный линкер, такой как линкер $(\text{Gly}_x\text{Ser})_n$, где x и n независимо могут являться целыми числами от 3 до 12, включая 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO: 95), где n может являться целым числом от 3 до 60, включая 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60. В определенных вариантах осуществления n может являться целым числом больше 60. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ (SEQ ID NO: 96). В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_6$ (SEQ ID NO: 97). В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_9$ (SEQ ID NO: 98). В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_{12}$ (SEQ ID NO: 99). В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_{15}$ (SEQ ID NO: 100). В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_{30}$ (SEQ ID NO: 101). В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_{45}$ (SEQ ID NO: 102). В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_{60}$ (SEQ ID NO: 103).

В других вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой расширенный рекомбинантный полипептид (XTEN), который представляет собой неструктурированный полипептид, состоящий из гидрофильных остатков различной длины (*например*, 10-80 аминокислотных остатков). Аминокислотные последовательности пептидов XTEN будут очевидны специалисту в данной области техники и могут быть найдены, например, в патенте США № 8673860, соответствующие описания которого включено в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой пептид XTEN и содержит 60 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет

собой пептид XTEN и содержит 30 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой пептид XTEN и содержит 45 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой пептид XTEN и содержит 15 аминокислот.

Любой из шарнирных доменов, используемых для создания полипептида химерного рецептора, как описано в данном документе, может содержать до 250 аминокислотных остатков. В некоторых случаях полипептид химерного рецептора может содержать относительно длинный шарнирный домен, например, содержащий 150-250 аминокислотных остатков (*например*, 150-180 аминокислотных остатков, 180-200 аминокислотных остатков или 200-250 аминокислотных остатков). В других случаях полипептид химерного рецептора может содержать шарнирный домен среднего размера, который может содержать 60-150 аминокислотных остатков (*например*, 60-80, 80-100, 100-120 или 120-150 аминокислотных остатков). Альтернативно, полипептид химерного рецептора может содержать короткий шарнирный домен, который может содержать менее 60 аминокислотных остатков (*например*, 1-30 аминокислот или 31-60 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления полипептид химерного рецептора (*например*, полипептид ACTR), описанный в данном документе, не содержит шарнирного домена или не содержит шарнирного домена из рецептора, отличного от CD16A.

F. Сигнальный пептид

В некоторых вариантах осуществления полипептид химерного рецептора (*например*, полипептид ACTR или полипептид CAR) может также содержать сигнальный пептид (также известный как сигнальная последовательность) на N-конце полипептида. Как правило, сигнальные последовательности представляют собой пептидные последовательности, которые нацеливают полипептид на желаемый сайт в клетке. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность нацеливает полипептид химерного рецептора на секреторный путь клетки и позволит интегрировать полипептид химерного рецептора в липидный бислой и закрепить его. Сигнальные последовательности, включая сигнальные последовательности встречающихся в природе белков или синтетических, не встречающихся в природе сигнальных последовательностей, которые совместимы для применения в полипептидах химерных рецепторов, описанных в данном документе, будут очевидны специалисту в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность получена из CD8 α . В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность получена из CD28. В других вариантах осуществления сигнальная последовательность происходит из мышиной каппа-цепи. В других вариантах осуществления сигнальная последовательность получена из CD16.

G. Примеры полипептидов ACTR

Типичные конструкции ACTR для применения с описанными в данном документе способами и композициями можно найти, например, в настоящем описании и на чертежах, или их можно найти в публикации патента PCT №: WO 2016040441 A1, WO

2017/161333 и заявки РСТ №: РСТ/US2018/015999, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки для этой цели. Полипептиды АСТR, описанные в настоящем документе, могут содержать внеклеточный домен CD16A с аффинностью связывания и специфичностью в отношении Fc-части молекулы IgG, трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен CD3ζ. В некоторых вариантах осуществления полипептиды АСТR могут дополнительно включать один или более костимулирующих сигнальных доменов, один из которых может быть костимулирующим сигнальным доменом CD28 или костимулирующим сигнальным доменом 4-1BB. Полипептиды АСТR сконфигурированы таким образом, что при экспрессии в клетке-хозяине внеклеточный лиганд-связывающий домен расположен внеклеточно для связывания с молекулой-мишенью и цитоплазматическим сигнальным доменом CD3ζ. Костимулирующий сигнальный домен может быть расположен в цитоплазме для запуска активации и/или эффекторной передачи сигналов.

В некоторых вариантах осуществления полипептид АСТR, как описано в данном документе, может содержать от N-конца до С-конца Fc-связывающий домен, такой как внеклеточный домен CD16A, трансмембранный домен, необязательный один или более костимулирующих доменов (*например*, костимулирующий домен CD28, костимулирующий сигнальный домен 4-1BB, костимулирующий сигнальный домен OX40, костимулирующий сигнальный домен CD27 или костимулирующий сигнальный домен ICOS) и цитоплазматический сигнальный домен CD3ζ.

Альтернативно или в дополнение, полипептиды АСТR, описанные в данном документе, могут содержать два или более костимулирующих сигнальных доменов, которые могут связываться друг с другом или быть разделенными цитоплазматическим сигнальным доменом. Внеклеточный домен связывания Fc, трансмембранный домен, необязательный костимулирующий сигнальный домен(ы) и цитоплазматический сигнальный домен в полипептиде АСТR могут быть связаны друг с другом напрямую или посредством пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления любой из полипептидов АСТR, описанных в данном документе, может содержать сигнальную последовательность на N-конце.

В Таблице 4 представлены иллюстративные полипептиды АСТR, описанные в данном документе. Эти иллюстративные конструкции имеют, в порядке от N-конца до С-конца, сигнальную последовательность, Fc-связывающий домен (*например*, внеклеточный домен Fc-рецептора), шарнирный домен и трансмембранный домен, в то время как положения необязательного костимулирующего домена и цитоплазматического сигнального домена можно переключать.

Таблица 4: Иллюстративные компоненты полипептидов АСТR.

Иллюстр ативная последов	Сигнал ьная последо	Внеклеточн ый домен Fc- рецептора	Шарнирн ый домен	Трансме мбранн ый	Костиму лирующ ий домен	Цитоплаз матическ ий
--------------------------------	---------------------------	---	---------------------	-------------------------	-------------------------------	----------------------------

ательнос ть AA (SEQ ID NO)	ватель ность			домен		сигнальн ый домен
1	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
2	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	4-1BB (CD137)	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
3	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD28	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
4	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD34	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
5	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	Сконстру ированн ый гидрофо бный домен TM	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
6	CD8 α	CD32A	CD8 α	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
7	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD8 α	CD28	CD3 ζ
8	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD8 α	OX40 (CD134)	CD3 ζ
9	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD8 α	CD28 + 4-1BB	CD3 ζ
10	CD8 α	CD16A-V158	Отсутстве т	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
11	CD8 α	CD16A-V158	XTEN	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
12	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD8 α	мутант LL-GG CD28	CD3 ζ
13	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD8 α	мутант+L	CD3 ζ

					L-GG CD28 4-1BB	
14	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD4	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
15	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD4	мутант+L L-GG CD28 4-1BB	CD3 ζ
16	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	Fc ϵ RI γ	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
17	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	Сконстру ированн ый гидрофо бный домен ТМ, прогнози рованная димериза ция	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
18	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD8 β	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
19	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	C16 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
20	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	OX40 (CD134)	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
21	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD3 ζ	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
22	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD3 ϵ	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
23	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD3 γ	4-1BB (CD137)	CD3 ζ

24	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD3 δ	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
25	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	TCR- α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
26	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD32	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
27	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD64	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
28	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	VEGFR2	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
29	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	FAS	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
30	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	FGFR2B	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
31	CD8 α	CD16A-F158	CD8 α	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
32	CD8 α	CD64A	CD8 α	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
33	CD8 α	CD16A-V158	IgG1 (шарнир- CH2-CH3)	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
34	CD8 α	CD16A-V158	IgG1 (шарнир- CH3)	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
35	CD8 α	CD16A-V158	IgG1 (шарнир)	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
36	CD8 α	CD16A-V158	фрагмент 1 CD8-альфа (30 аминокисло т)	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
37	CD8 α	CD16A-V158	фрагмент 2 CD8-альфа (15	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ

			аминокислот)			
38	CD8 α	CD16A-V158	(Gly4Ser)x3 (60 аминокислот)	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
39	CD8 α	CD16A-V158	(Gly4Ser)x6 (45 аминокислот)	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
40	CD8 α	CD16A-V158	(Gly4Ser)x9 (30 аминокислот)	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
41	CD8 α	CD16A-V158	(Gly4Ser)x12 (15 аминокислот)	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
42	CD8 α	CD16A-V158	XTEN (60 аминокислот)	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
43	CD8 α	CD16A-V158	XTEN (30 аминокислот)	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
44	CD8 α	CD16A-V158	XTEN (15 аминокислот)	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
45	CD28	CD16A-V158	CD8 α	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
46	Мышин ая каппа- цепь	CD16A-V158	CD8 α	CD8 α	4-1BB (CD137)	CD3 ζ
47	CD16	CD16A-V158	CD8 α	CD8 α	4-1BB	CD3 ζ

					(CD137)	
48	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD8 α	ICOS	CD3 ζ
49	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD8 α	CD27	CD3 ζ
50	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD8 α	GITR	CD3 ζ
51	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD8 α	HVEM	CD3 ζ
52	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD8 α	TIM1	CD3 ζ
53	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD8 α	LFA1 (CD11a)	CD3 ζ
54	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD8 α	CD2	CD3 ζ
55	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	Fc ϵ R1 γ	4-1BB (CD137)	Fc ϵ R1 γ
56	CD8 α	CD16A-V158	CD8 α	CD8 α	4-1BB (CD137)	Fc ϵ R1 γ
57	CD8 α	CD16A-V158	CD28 (например, 39aa)	CD28	CD28	CD3 ζ
58	CD8 α	CD16A-V158	отсутствует	CD8	CD28	CD3 ζ
59	CD8 α	CD16A-V158	CD8	CD8	CD28+C D27	CD3 ζ
60	CD8 α	CD16A-V158	CD8	CD8	CD28+O X40	CD3 ζ
61	CD8 α	CD16A-V158	CD8	CD8	4- 1BB+CD 28	CD3 ζ
62	CD8 α	CD16A-V158	CD28	CD28	CD28+4- 1BB	CD3 ζ
63	CD8 α	CD16A-V158	CD28	CD28	4-1BB	CD3 ζ
64	CD8 α	CD16A-V158	CD8	CD8	CD27	CD3 ζ
65	CD8 α	CD16A-V158	CD8	CD8	CD28	CD3 ζ
66	CD8 α	CD16A-V158	CD8	CD8	ICOS	CD3 ζ
67	CD8 α	CD16A-V158	CD8	CD8	OX40	CD3 ζ
68	CD8 α	CD16A-V158	CD8	CD8	CD28 и ICOS	CD3 ζ
69	CD8 α	CD16A-V158	отсутствует	CD8	4-1BB	CD3 ζ

70	CD8 α	CD16A-V158	отсутствует	CD8	CD27	CD3 ζ
71	CD8 α	CD16A-V158	отсутствует	CD8	ICOS	CD3 ζ
72	CD8 α	CD16A-V158	отсутствует	CD8	OX40	CD3 ζ
73	CD8 α	CD16A-V158	отсутствует	CD8+4aa	4-1BB	CD3 ζ
74	CD8 α	CD16A-V158	отсутствует	CD8+4aa	CD28	CD3 ζ
75	CD8 α	CD16A-V158	CD8	CD28	CD28	CD3 ζ
76	CD8 α	CD16A-V158	CD28 (26aa)	CD28	CD28	CD3 ζ
77	CD8 α	CD16A-V158	CD28 (16aa)	CD28	CD28	CD3 ζ
78	CD8 α	CD16A-V158	отсутствует	CD28	CD28	CD3 ζ
79	CD8 α	CD16A-V158	CD8	CD8	41BB	CD3 ζ
80	CD8 α	CD16A-V158	CD28 (39 aa)	CD8	CD28	CD3 ζ

Аминокислотные последовательности примеров полипептидов АСТР представлены ниже (сигнальные последовательности выделены курсивом).

SEQ ID NO:1:

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKRYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP
 FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
 EYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:2:

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKRYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIISFFLALTSTALLFLFFLTLRFSVVKRGKRGRKKLL
 YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN
 LGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
 GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:3:

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKRYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKKRGRKK

LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE
LNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:4:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDLIALVTSGALLAVLGITGYFLMNRKRGRKKLLYIFKQ
PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:5:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDLAALLALLAALLALLAALLARSKKRGRKKLLYIFK
QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR
REEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:6:

MALPVTALLPLALLHAARPQAAAPPKAVLKLEPPWINVLQEDSVTLTCQGARS
ESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYRFKANNNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLQ
TPHLEFQEGETIMLRCHSWKDKPLVKVTFQNGKSQKFSHLDPTFSIPQANHSHSGDYH
CTGNIGYTLFSSKPVITITVQVPSMGSSSPMGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA
AGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT
TQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DK
RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS
TATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:7:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYM
NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:8:

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCALYLLRRDQRLPP
 DAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
 EYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:9:

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYM
 NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR
 FPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGG
 KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL
 HMQALPPR

SEQ ID NO:10:

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL
 YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQ
 GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
 SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:11:

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGSPAGSPTSTEEGTSESATPE
 SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF
 MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE
 YDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD
 GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:12:

MALPVTALLLPLALLLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR

PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRGGHSDYM
 NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
 EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:13:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKRYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRGGHSDYM
 NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR
 FPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG
 KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL
 HMQALPPR

SEQ ID NO:14:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKRYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRKRGRKKLLYIFK
 QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR
 REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
 HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:15:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKRYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRRSKRSGHSDY
 MNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR
 REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
 HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:16:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKRYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKKRGRKKLLYIFKQP
 FMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
 EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH

DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:17:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDLLLILGVLATLAALLARSKKRGRKKLLYIFKQ
PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:18:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDITLGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCKRGRKKLLYIFKQ
PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:19:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDV SFCLVMVLLFAVD TGLYFSVKTNKRGRKKLLYIFK
QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR
REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:20:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYKRGRKKLLYIFKQ
PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:21:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL

LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNV SSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKKRGRKKLLYIFKQP
 FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
 EYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:22:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNV SSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVMSVATIVIVDICITGGLLLL VYYWSKNRKRGRKKLL
 YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN
 LGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
 GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:23:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNV SSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDGLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDKRGRKKLLYIFKQP
 FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
 EYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:24:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNV SSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDGIIVTDVIATLLALGVFCFAGHETKRGRKKLLYIFKQ
 PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
 EYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:25:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNV SSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWKGRGRKKLLYIFKQP
 FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE

EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:26:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIIVAVVIATAVAIAVAAVVALIYCRKKRGRKKLLYIF
KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG
RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:27:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVLFLYLA VGIMFLVNTVLWVTIRKEKRGRKKLLYIFK
QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR
REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:28:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIILVGTAVIAMFFWLLVILRTKRGRKKLLYIFKQPF
MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE
YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:29:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDLGWLCLLLPIPLIVWVKRKKRGRKKLLYIFKQPFMR
PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:30:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA

YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIAIYCIGVFLIACMVVTVILCRMKKRGRKKLLYIFKQP
 FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
 EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:31:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLFGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP
 FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
 EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:32:

MALPVTALLPLALLHAARPQVDTTKAVITLQPPWVS VFQEETVTLHCEVLHLPG
 SSSTQWFLNGTATQTSTPSYRITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLQVSS
 RVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYNVLYYRNGKAFKFFHWNSNLTKTNISHNGTYHCS
 GMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVLNASVTSPLLEGNLVTLS CETKLLLRPGLQLYFSF
 YMGSKTLRGRNTSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGLQLPTP
 VWFHIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
 PEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG
 KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDAL
 HMQALPPR

SEQ ID NO:33:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR
 GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ
 LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM
 KGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:34:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA

YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVITYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQEPKSCDKTHTCPGQPREPQVY
 TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT
 LYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKF SRSADAPAYQ
 QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
 YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:35:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVITYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQEPKSCDKTHTCPIYIWAPLAGT
 CGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKF
 SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNE
 LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:36:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVITYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEAFCADIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS
 CRFPEEEEGGCEL RVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EM
 GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD
 ALHMQALPPR

SEQ ID NO:37:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVITYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPFACDIYIWAPL
 AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL R
 VKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGL
 YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:38:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVITYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGGGSGGGGSGGGGSIYIWAP
 LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
 RVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEG

LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:39:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVITYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE
DGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR
DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATK
DTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:40:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVITYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI
FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL
GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG
KGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:41:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVITYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIYIWAPLAGTCGVLLLSL
VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPA
YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA
EAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:42:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVITYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGSPAGSPTSTEEGTSESATPE
SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQ
NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI
GMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:43:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL

LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGSPAGSPTSTEEGTSESATPE
 SGPSTSTEIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC
 SCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE
 MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT
 YDALHMQALPPR

SEQ ID NO:44:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGSPAGSPTSTEEGTIYIWAPL
 AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:45:

MLRLLALNLFPSIQVTGGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSP
 EDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQA
 PRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYF
 CRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA
 CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR
 PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
 DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG
 LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:46:

METDTLLLWVLLWVPGSTGDGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQG
 AYS PEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWL
 LLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDS
 GSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL
 RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK
 QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR
 REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
 HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:47:

MWQLLLPTALLLVSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPE
 DNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAP
 RWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFC
 RGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC
 RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR
 PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
 VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL

YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:48:

MALPVTALLLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCCWLTKKKYSSSVH
DPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
DVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG
LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:49:

MALPVTALLLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCQRRKYRSNKGESP
VEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSPRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN
LGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:50:

MALPVTALLLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCQLGLHIWQLRSQC
MWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFPEEERGERSAEEKGRLGDLWVRVKFSRSADAPAY
QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:51:

MALPVTALLLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCCVKRRKPRGDVVK
VIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSFTGRSPNHRVKFSRSADAPAY
QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:52:

MALPVTALLLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL

LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNV SSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKKYFFKKEVQQLS
 VSFSSLQIKALQNAVEKEVQAEDNIYIENSLYATDRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL
 NLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
 RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:53:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNV SSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCYKVGFFKRNLKEK
 MEAGRGPVNGIPAEDSEQLASGQEAGDPGCLKPLHEKDSESGGGKDRVKFSRSADAPA
 YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA
 EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:54:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNV SSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRKKQRSRRNDEE
 LETRAHRVATEERGRKPHQIPASTPQNPAT SQHPPPPPGHRSQAPSHRPPPPGHRVQHQP
 QKRPPAPSGTQVHQKGPPLPRPRVQPKPPHGAAENSLSPSSNRVKFSRSADAPAYQQG
 QNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE
 IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:55:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNV SSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQVRKAAITSYE
 KSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
 PEEEEGGCEL

SEQ ID NO:56:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNV SSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP
 FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETY

ETLKHEKPPQ

SEQ ID NO:57:

MALPVTALLLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHV
KGKHLCPSPFLFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN
TPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
DVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG
LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:58:

MALPVTALLLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL
YCRSKRSRLLHSDYMNMTTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQ
GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:59:

MALPVTALLLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYM
NMTTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSQRRKYRSNKGESPVPAEPCHYSCPREEEGS
TIPIQEDYRKPEPACSPRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD
PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD
TYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:60:

MALPVTALLLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYM
NMTTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAH
STLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

SEQ ID NO:61:

MALPVTALLLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA

YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP
 FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYA
 PPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGG
 KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL
 HMQALPPR

SEQ ID NO:62:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHV
 KGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN
 TPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
 EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGK
 PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
 MQALPPR

SEQ ID NO:63:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHV
 KGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPF
 MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE
 YDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD
 GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:64:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCQRRKYRSNKGESP
 VEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSPRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN
 LGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
 GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:65:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG

SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYM
 NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
 EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:66:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVITYLQNGKGRKYPFHHSNDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKKKYSSSVHDPNG
 EYMFMRVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
 KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:67:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVITYLQNGKGRKYPFHHSNDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRDQRLPPDAHKP
 PGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
 KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:68:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVITYLQNGKGRKYPFHHSNDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYM
 NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRL
 TDVTLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR
 NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:69:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVITYLQNGKGRKYPFHHSNDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIYWAPLAGTCGVLLLSLVITL
 YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ
 GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY

SEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:70:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL
YCQRRKYRSNKGESPVPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSPRVKFSRSADAP
AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:71:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL
YCKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY
NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
ERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:72:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL
YCRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK
GERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:73:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL
VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA
YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA
EAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:74:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL
VITLYCRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPA
YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA

EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:75:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLH
SDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN
LGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:76:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP
PSKPFWVLVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPY
APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP
MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT
YDALHMQALPPR

SEQ ID NO:77:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGKHLCPSPFP
PSKPFWVLVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPY
APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP
MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR

SEQ ID NO:78:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQFWVLVVVGGLVACYSLLVT
VAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAP
AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:79:

MALPVTALLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG

SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
 PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP
 FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
 EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:80:

MALPVTALLLPLALLHAARPGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGA
 YSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLL
 LQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSG
 SYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIEVMYPPPYLDNEKSNGTIHV
 KGKHLCPSPFLPGPSKPIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLHSDYMNMTPRR
 PGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
 DDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Н. Примеры полипептидов CAR

Типичные полипептиды CAR для применения с описанными в данном документе способами и композициями можно найти, например, в настоящем описании и на фигурах или они могут быть известными в данной области техники. Описанные в данном документе полипептиды CAR могут содержать внеклеточный домен, содержащий одноцепочечный фрагмент антитела (scFv) с аффинностью связывания и специфичностью в отношении представляющего интерес антигена (*например*, тех, что перечислены в Таблице 3 выше), трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен CD3ζ. В некоторых вариантах осуществления полипептиды CAR могут дополнительно включать один или более костимулирующих сигнальных доменов, один из которых может быть костимулирующим сигнальным доменом CD28 или костимулирующим сигнальным доменом 4-1BB. Полипептиды CAR сконфигурированы таким образом, что при экспрессии на клетке-хозяине внеклеточный антигенсвязывающий домен располагается внеклеточно для связывания с молекулой-мишенью и цитоплазматическим сигнальным доменом CD3ζ. Костимулирующий сигнальный домен может быть расположен в цитоплазме для запуска активации и/или эффекторной передачи сигналов.

В некоторых вариантах осуществления полипептид CAR, как описано в настоящем документе, может содержать от N-конца до C-конца внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, необязательный один или более костимулирующих доменов (*например*, костимулирующий домен CD28, костимулирующий сигнальный домен 4-1BB, костимулирующий сигнальный домен OX40, костимулирующий сигнальный домен CD27 или костимулирующий сигнальный домен ICOS) и цитоплазматический сигнальный домен CD3ζ.

Альтернативно или в дополнение, полипептиды CAR, описанные в данном документе, могут содержать два или более костимулирующих сигнальных доменов, которые могут связываться друг с другом или быть разделенными цитоплазматическим

сигнальным доменом. Внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, необязательный костимулирующий сигнальный домен(ы) и цитоплазматический сигнальный домен в полипептиде CAR могут быть связаны друг с другом напрямую или через пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления любой из полипептидов CAR, описанных в данном документе, может содержать сигнальную последовательность на N-конце.

В Таблице 5 представлены иллюстративные полипептиды CAR, описанные в данном документе. Эти иллюстративные конструкции имеют, в порядке от N-конца до С-конца, сигнальную последовательность, антигенсвязывающий домен (*например*, фрагмент scFv, нацеленный на антиген, такой как опухолевый антиген или патогенный антиген), шарнирный домен и трансмембранный домен, в то время как положения необязательного костимулирующего домена и цитоплазматического сигнального домена можно менять.

Таблица 5: Иллюстративные компоненты полипептидов CAR.

Сигнальная последовательность	Внеклеточный домен (антигенсвязывающий)	Шарнирный домен	Трансмембранный домен	Костимулирующий домен	Цитоплазматический сигнальный домен
CD8 α	scFv (<i>например</i> , анти-GPC3 scFv)	CD8	CD8	4-1BB	CD3 ζ
CD8 α	scFv (<i>например</i> , анти-GPC3 scFv)	CD28	CD28	CD28	CD3 ζ

Аминокислотные последовательности примеров полипептидов CAR представлены ниже (сигнальные последовательности выделены курсивом).

SEQ ID NO:104:

MALPVTALLLPLALLHAARPDVVM TQSPLSLPVT PGEPASISCRSSQSLVHSNRNT
YLHWYLQKPGQSPQLLIYKVS NRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQ
NTHVPPTFGQGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKAS
GYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTD TAYSQKFKGRVTLTADKSTSTAYM
ELSSLTSED TAVYYCTRFYSYTYWGQGT LTVSSTTT PAPERPTPAPT IASQPLSLRPEAC
RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR
PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
VLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGL
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:105:

MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMQTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSNRNT
 YLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQ
 NTHVPPTFGQGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAKS
 GYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTDGTAYSQKFKGRVTLTADKSTSTAYM
 ELSSLTSEDVAVYYCTRFYSYTYWGQGTLLTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTTHVKGKH
 LCPSPLFPGPSKPFVVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRR
 PGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLN
 KRRGRDPFEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG
 LSTATKDTYDALHMQALPPR

Гемопозитические клетки, экспрессирующие полипептиды, модулирующие цикл Кребса, и необязательно полипептиды химерного рецептора

В настоящем документе предложены генетически сконструированные клетки-хозяева (*например*, гемопозитические клетки, такие как ГСК и иммунные клетки, *например*, Т-клетки или НК-клетки), экспрессирующие один или более полипептидов, модулирующих цикл Кребса, как описано в настоящем документе. Генетически сконструированные клетки-хозяева могут дополнительно экспрессировать полипептид химерного рецептора (*например*, клетки, экспрессирующие ACTR, *например*, ACTR Т-клетки, или клетки, экспрессирующие CAR, *например*, CAR Т-клетки), что также описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева представляют собой гемопозитические клетки или их потомство. В некоторых вариантах осуществления гемопозитические клетки могут быть гемопозитическими стволовыми клетками. В других вариантах осуществления клетки-хозяева представляют собой иммунные клетки, такие как Т-клетки или НК-клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой НК-клетки. В других вариантах осуществления иммунные клетки могут быть стабильными клеточными линиями, *например*, клетками NK-92.

В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные гемопозитические клетки, такие как ГСК или иммунные клетки (*например*, Т-клетки или НК-клетки), могут совместно экспрессировать любую из конструкций CAR, таких как те, что раскрыты в настоящем документе, с любым из агентов, модулирующих цикл Кребса, таких как полипептид, модулирующий цикл Кребса (*например*, GOT1 или GOT2). В некоторых вариантах осуществления конструкция CAR может содержать костимулирующий домен от 4-1BB или CD28, а полипептид, модулирующий цикл Кребса, представляет собой GOT1 или GOT2. Конструкция CAR может дополнительно содержать шарнирный и трансмембранный домен от CD8 или CD28.

В других вариантах осуществления генетически сконструированные гемопозитические клетки, такие как ГСК или иммунные клетки (*например*, Т-клетки или НК-клетки), могут совместно экспрессировать любую из конструкций ACTR, таких как

те, что раскрыты в настоящем документе, с любым из агентов, модулирующих цикл Кребса, таких как полипептид, модулирующий цикл Кребса (*например*, GOT1 или GOT2). В некоторых вариантах осуществления конструкция ACTR может содержать костимулирующий домен от 4-1BB или CD28, а полипептид, модулирующий цикл Кребса, представляет собой GOT1 или GOT2. Конструкции ACTR могут дополнительно содержать шарнирный и трансмембранный домен от CD8 или CD28.

Альтернативно, генетически сконструированные клетки-хозяева, описанные в настоящем документе, могут не экспрессировать полипептиды химерных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные иммунные клетки, которые могут чрезмерно экспрессировать один или более полипептидов, модулирующих цикл Кребса, как раскрыто в настоящем документе, могут быть получены из лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL). Сверхэкспрессия полипептидов, модулирующих цикл Кребса, может усиливать противоопухолевую активность или TIL в микроокружении опухоли. Альтернативно или дополнительно, генетически сконструированные иммунные клетки могут быть Т-клетками, которые могут дополнительно иметь генетически сконструированные рецепторы Т-клеток. TIL и/или генетически модифицированные TCR могут быть нацелены на комплекс пептид-ГКГС, в котором пептид может происходить из патогена, опухолевого антигена или аутоантигена. Некоторые примеры представлены в Таблице 6 ниже.

Любая из описанных в данном документе конструкций CAR или антитело, которое будет использоваться совместно с ACTR Т-клетками, также может нацеливаться на любой из пептидов в таком комплексе пептид/ГКГС.

Таблица 6. Типичные мишени пептид-МНС

Мишени	Указания
NY-ESO-1	Саркома, ММ
MAGE-A10	NSCLC, Мочевой пузырь, HNSCC
MAGE-A4	Саркомы, другие
PMEL	Меланома
WT-1	Яичник
AFP	НСС
HPV-16 E6	Шейка матки
HPV-16 E7	Шейка матки

В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева представляют собой иммунные клетки, такие как Т-клетки или NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой Т-клетки. Например, Т-клетки могут быть хелперами CD4+, цитотоксическими клетками CD8+ или их комбинацией. Альтернативно или дополнительно, Т-клетки могут быть супрессивными Т-клетками, такими как T_{reg}-клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки

представляют собой NK-клетки. В других вариантах осуществления иммунные клетки могут быть стабильными клеточными линиями, например, клетками NK-92. В некоторых примерах иммунные клетки могут представлять собой смесь различных типов Т-клеток и/или NK-клеток, как известно в данной области. Например, иммунные клетки могут представлять собой популяцию иммунных клеток, выделенных от подходящего донора (*например*, пациента-человека). См. описание ниже.

В некоторых случаях полипептид, модулирующий цикл Кребса, который должен быть введен в клетки-хозяева, идентичен эндогенному белку клетки-хозяина. Введение дополнительных копий кодирующих последовательностей полипептида, модулирующего цикл Кребса, в клетку-хозяина повысит уровень экспрессии полипептида (*т.е.* чрезмерно экспрессируемый) по сравнению с нативным аналогом. В некоторых случаях полипептид, модулирующий цикл Кребса, который должен быть введен в клетки-хозяева, является гетерологичным по отношению к клетке-хозяину, *т.е.* не существует или не экспрессируется в клетке-хозяине. Такой гетерологичный полипептид, модулирующий цикл Кребса, может быть встречающимся в природе белком, который не экспрессируется в клетке-хозяине в природе (*например*, от другого вида). Альтернативно, гетерологичный полипептид, модулирующий цикл Кребса, может быть вариантом нативного белка, такого как те, что описаны в данном документе. В некоторых примерах экзогенная (*т.е.* не нативная для клеток-хозяев) копия кодирующей нуклеиновой кислоты может существовать вне хромосом. В других примерах экзогенная копия кодирующей последовательности может быть интегрирована в хромосому клетки-хозяина и может быть расположена в участке, который отличается от нативных локусов эндогенного гена.

Такие генетически сконструированные клетки-хозяева обладают способностью повышать скорость гликолиза и могут, например, иметь повышенную способность забирать глюкозу из среды. Таким образом, эти генетически сконструированные клетки-хозяева могут проявлять лучший рост и/или биоактивность в условиях низкого содержания глюкозы, низкого содержания аминокислот, низкого pH и/или гипоксических условиях, например, в микроокружении опухоли. Генетически сконструированные клетки при экспрессии полипептида химерного рецептора, описанного в данном документе, могут распознавать и ингибировать клетки-мишени либо непосредственно (*например*, с помощью CAR-экспрессирующих иммунных клеток), либо посредством Fc-содержащих терапевтических агентов, таких как противоопухолевые антитела (*например*, иммунные клетки, экспрессирующие ACTR). Учитывая их ожидаемую высокую скорость пролиферации, биоактивность и/или уровень выживаемости в средах с низким содержанием глюкозы, низким содержанием аминокислоты, низким pH и/или в гипоксической среде (*например*, в микроокружении опухоли), можно ожидать, что генетически сконструированные клетки, такие как Т-клетки и NK-клетки, будут иметь более высокую терапевтическую эффективность по сравнению с Т-клетками с полипептидами химерного рецептора, которые не экспрессируют или экспрессируют более низкий уровень или менее активную форму полипептида, модулирующего цикл

Кребса.

Популяция иммунных клеток может быть получена из любого источника, такого как мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), костный мозг или ткани, такие как селезенка, лимфатический узел, тимус, стволовые клетки или опухолевая ткань. Альтернативно, популяция иммунных клеток может быть получена из стволовых клеток, например, гемопоэтических стволовых клеток и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК). Источник, подходящий для получения желаемого типа клеток-хозяев, будет очевиден специалисту в данной области. В некоторых вариантах осуществления популяция иммунных клеток происходит из МКПК, которые могут быть получены от пациента (*например*, пациента-человека), которому требуется лечение, описанное в настоящем документе. Тип желаемых клеток-хозяев (*например*, Т-клетки, НК-клетки или Т-клетки и НК-клетки) можно размножить в популяции клеток, полученной путем совместной инкубации клеток со стимулирующими молекулами. В качестве неограничивающего примера анти-CD3 и анти-CD28 антитела можно использовать для размножения Т-клеток.

Чтобы сконструировать иммунные клетки, которые экспрессируют любой из полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и, необязательно, полипептид химерного рецептора, описанный в данном документе, могут быть созданы векторы экспрессии для стабильной или временной экспрессии полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептида химерного рецептора с помощью обычных способов, таких как описаны в данном документе, и введены в иммунные клетки-хозяева. Например, нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, модулирующие цикл Кребса, и/или полипептиды химерного рецептора могут быть клонированы в один или два подходящих вектора экспрессии, таких как вирусный вектор или невирусный вектор, функционально связанный с подходящим промотором. В некоторых случаях каждая из кодирующих последовательностей полипептида химерного рецептора и полипептида, модулирующего цикл Кребса, находится в двух отдельных молекулах нуклеиновых кислот и может быть клонирована в два отдельных вектора, которые могут быть введены в подходящие клетки-хозяева одновременно или последовательно. Альтернативно, кодирующие последовательности полипептида химерного рецептора и полипептида, модулирующего цикл Кребса, находятся в одной молекуле нуклеиновой кислоты и могут быть клонированы в один вектор. Кодирующие последовательности полипептида химерного рецептора и полипептида, модулирующего цикл Кребса, могут быть функционально связаны с двумя разными промоторами, так что экспрессия двух полипептидов контролируется разными промоторами. Альтернативно, кодирующие последовательности полипептида химерного рецептора и полипептида, модулирующего цикл Кребса, могут быть функционально связаны с одним промотором, так что экспрессия двух полипептидов контролируется одним промотором. Подходящие последовательности могут быть вставлены между кодирующими последовательностями двух полипептидов, так что два отдельных полипептида могут транслироваться с одной молекулы мРНК. Такие

последовательности, например IRES или участок проскока рибосомы, хорошо известны в данной области. Дополнительные описания приведены ниже.

Нуклеиновые кислоты и вектор(ы) могут контактировать в подходящих условиях с рестрикционным ферментом для создания дополнительных концов на каждой молекуле, которые могут спариваться друг с другом и соединяться с лигазой. Альтернативно, синтетические линкеры нуклеиновых кислот могут быть лигированы с концами нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды, модулирующие цикл Кребса, и/или полипептиды химерного рецептора. Синтетические линкеры могут содержать последовательности нуклеиновых кислот, которые соответствуют конкретному сайту рестрикции в векторе. Выбор векторов экспрессии/плазмид/вирусных векторов будет зависеть от типа клеток-хозяев для экспрессии полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептидов химерного рецептора, но должен подходить для интеграции и репликации в эукариотических клетках.

Для экспрессии полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептидов химерного рецептора, описанных в настоящем документе, можно использовать различные промоторы, включая, без ограничения, промежуточный ранний промотор цитомегаловируса (CMV), вирусный LTR, такой как LTR вируса *саркомы Рауса*, ВИЧ-LTR, LTR HTLV-1, ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор EF1-альфа человека или промотор ТК вируса простого герпеса. Дополнительные промоторы для экспрессии полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептидов химерного рецептора включают любой конститутивно активный промотор в иммунной клетке. В качестве альтернативы можно использовать любой регулируемый промотор, так что его экспрессия может модулироваться в иммунной клетке.

Кроме того, вектор может содержать, например, некоторые или все из следующего: селективный маркерный ген, такой как ген неомидина или ген канамицина, для отбора стабильных или временных трансфектантов в клетках-хозяевах; энхансерные/промоторные последовательности из немедленно-раннего гена CMV человека для высоких уровней транскрипции; последовательности интронов из гена EF1-альфа человека, сигналы терминации транскрипции и процессинга РНК из SV40 для стабильности мРНК; точка начала репликации полиомавируса SV40 и ColE1 для правильной эписомальной репликации; внутренние сайты связывания рибосом (IRES), универсальные сайты множественного клонирования; промоторы РНК T7 и SP6 для транскрипции смысловой и антисмысловой РНК *in vitro*; «суицидальный переключатель» или «суицидальный ген», который при срабатывании заставляет клетки, несущие вектор, погибать (*например*, тимидинкиназа HSV или индуцибельная каспаза, такая как iCasp9), и репортерный ген для оценки экспрессии полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептида химерного рецептора.

В одном конкретном варианте такие векторы также включают суицидальный ген. Используемый в данном документе термин «суицидальный ген» относится к гену, который вызывает гибель клетки, экспрессирующей суицидальный ген. Суицидальный

ген может быть геном, который придает чувствительность к агенту, *например*, лекарственному препарату, клетке, в которой экспрессируется ген, и заставляет клетку погибать, когда клетка контактирует с агентом или подвергается его воздействию. Суицидальные гены известны в данной области (см., например, Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004) и включают, например, ген тимидинкиназы (ТК) вируса простого герпеса (HSV), цитозиндезаминазу, пуриннуклеозидфосфорилазу, нитроредуктазу и каспазы, такие как каспаза 8.

Подходящие векторы и способы получения векторов, содержащих трансгены, хорошо известны и доступны в данной области. Примеры получения векторов для экспрессии полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептидов химерного рецептора, можно найти, например, в US 2014/0106449, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

Любой из векторов, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, модулирующий цикл Кребса, и/или полипептид химерного рецептора, описанный в данном документе, также входит в объем настоящего изобретения. Такой вектор или последовательность, кодирующая полипептид, модулирующий цикл Кребса, и/или полипептид химерного рецептора, содержащаяся в нем, может быть доставлен в клетки-хозяева, такие как иммунные клетки-хозяева, любым подходящим способом. Способы доставки векторов к иммунным клеткам хорошо известны в данной области и могут включать электропорацию ДНК, электропорацию РНК, трансфекцию с использованием таких реагентов, как липосомы, или вирусную трансдукцию (*например*, ретровирусную трансдукцию, такую как лентивирусная трансдукция).

В некоторых вариантах осуществления векторы для экспрессии полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептидов химерного рецептора доставляются в клетки-хозяева посредством вирусной трансдукции (*например*, ретровирусной трансдукции, такой как лентивирусная или гамма-ретровирусная трансдукция). Типичные вирусные способы доставки включают рекомбинантные ретровирусы (см., *например*, публикации РСТ № WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; и WO 91/02805; патенты США № 5219740 и 4777127; патент Великобритании № 2200651; и патент ЕР № 0345242), векторы на основе альфавирусов и векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) (см., *например*, публикации РСТ № WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984; и WO 95/00655). В некоторых вариантах осуществления векторы для экспрессии полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептидов химерного рецептора являются ретровирусами. В некоторых вариантах осуществления векторы для экспрессии полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептидов химерного рецептора являются лентивирусами.

Примеры ссылок, описывающих ретровирусную трансдукцию, включают Anderson et al., патент США № 5399346; Mann et al., Cell 33:153 (1983); Temin et al., патент США № 4650764; Temin et al., патент США № 4980289; Markowitz et al., J. Virol. 62:1120 (1988); Temin et al., патент США № 5124263; международная патентная публикация № WO 95/07358, опубликованная 16 марта 1995 г., Dougherty et al.; и Kuo et al., Blood 82:845 (1993). В международной патентной публикации № WO 95/07358 описана высокоэффективная трансдукция первичных В-лимфоцитов. См. также WO 2016/040441 A1, которая включена в настоящий документ посредством ссылки для цели и объекта изобретения, упомянутых в данном документе.

В примерах, в которых векторы, кодирующие полипептиды, модулирующие цикл Кребса, и/или полипептиды химерного рецептора вводятся в клетки-хозяева с использованием вирусного вектора, вирусные частицы, которые способны инфицировать иммунные клетки и нести вектор, могут быть получены любым способом, известным в данной области техники, и их можно найти, например, в заявке РСТ № WO 1991/002805 A2, WO 1998/009271 A1 и патенте США 6194191. Вирусные частицы собирают из супернатанта клеточной культуры и они могут быть выделены и/или очищены перед контактом вирусных частиц с иммунными клетками.

В некоторых вариантах осуществления молекулы РНК, кодирующие любой из полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептидов химерного рецептора, как описано в настоящем документе, могут быть получены обычным способом (*например*, транскрипцией *in vitro*) и затем введены в подходящие клетки-хозяева, *например*, описанные в данном документе известными способами, *например*, Rabinovich et al., Human Gene Therapy 17:1027-1035.

В некоторых случаях нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, модулирующий цикл Кребса, и нуклеиновая кислота, кодирующая подходящий полипептид химерного рецептора, могут быть клонированы в отдельные векторы экспрессии, которые могут быть введены в подходящие клетки-хозяева одновременно или последовательно. Например, вектор экспрессии (или молекула РНК) для экспрессии полипептида, модулирующего цикл Кребса, может быть сначала введен в клетки-хозяева, а трансфицированные клетки-хозяева, экспрессирующие полипептид, модулирующий цикл Кребса, могут быть выделены и культивированы *in vitro*. Вектор экспрессии (или молекула РНК) для экспрессии подходящего полипептида химерного рецептора можно затем ввести в клетки-хозяева, которые экспрессируют полипептид, модулирующий цикл Кребса, и можно выделить трансфицированные клетки, экспрессирующие оба полипептида. В другом примере векторы экспрессии (или молекулы РНК), каждый для экспрессии полипептида, модулирующего цикл Кребса, и полипептида химерного рецептора, могут быть введены в клетки-хозяева одновременно, а трансфицированные клетки-хозяева, экспрессирующие оба полипептида, могут быть выделены *с помощью* стандартной методологии.

В других случаях нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, модулирующий

цикл Кребса, и нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид химерного рецептора, могут быть клонированы в один и тот же вектор экспрессии. Полинуклеотиды (включая векторы, в которых такие полинуклеотиды функционально связаны по меньшей мере с одним регуляторным элементом) для экспрессии полипептида химерного рецептора и полипептида, модулирующего цикл Кребса, также входят в объем настоящего изобретения. Неограничивающие примеры применимых векторов по настоящему описанию включают вирусные векторы, такие как, *например*, ретровирусные векторы, включая гамма-ретровирусные векторы и лентивирусные векторы, и аденоассоциированные вирусные векторы (векторы AAV).

В некоторых случаях нуклеиновая кислота(ы), кодирующая полипептид, модулирующий цикл Кребса, и/или полипептид химерного рецептора, могут быть доставлены в клетки-хозяева через транспозон. В некоторых случаях кодирующая нуклеиновая кислота(ы) может быть доставлена в клетки-хозяева посредством редактирования генов, например, с помощью CRISPR, TALEN, нуклеазы цинкового пальца (ZFN) или мегануклеаз.

В некоторых случаях описанная в данном документе нуклеиновая кислота может содержать две кодирующие последовательности, одна из которых кодирует полипептид химерного рецептора, как описано в данном документе, а другая кодирует полипептид, способный модулировать цикл Кребса (*т.е.* полипептид, модулирующий цикл Кребса). Нуклеиновая кислота, содержащая две описанные в данном документе кодирующие последовательности, может быть сконфигурирована так, чтобы полипептиды, кодируемые двумя кодирующими последовательностями, могли экспрессироваться как независимые (и физически отдельные) полипептиды. Для достижения этой цели описанная в данном документе нуклеиновая кислота может содержать третью нуклеотидную последовательность, расположенную между первой и второй кодирующими последовательностями. Эта третья нуклеотидная последовательность может, например, кодировать участок проскока рибосомы. Участок проскока рибосомы - это последовательность, которая нарушает нормальное образование пептидной связи. Этот механизм приводит к трансляции дополнительных открытых рамок считывания из одной информационной РНК. Эта третья нуклеотидная последовательность может, например, кодировать пептид P2A, T2A или F2A (см., например, Kim et al., PLoS One. 2011; 6(4):e18556). В качестве неограничивающего примера типичный пептид P2A может иметь аминокислотную последовательность ATNFSLLKQAGDVEENPGP SEQ ID NO.: 106.

В другом варианте осуществления третья нуклеотидная последовательность может кодировать внутренний участок посадки рибосомы (IRES). IRES - это элемент РНК, который позволяет инициировать трансляцию независимо от конца, а также допускает трансляцию дополнительных открытых рамок считывания из одной информационной РНК. Альтернативно, третья нуклеотидная последовательность может кодировать второй промотор, контролирующей экспрессию второго полипептида. Третья нуклеотидная последовательность может также кодировать более одной последовательности проскока

рибосомы, последовательность IRES, дополнительную последовательность промотора или их комбинацию.

Нуклеиновая кислота может также включать дополнительные кодирующие последовательности (включая четвертую и пятую кодирующие последовательности, но не ограничиваясь ими) и может быть сконфигурирована так, чтобы полипептиды, кодируемые дополнительными кодирующими последовательностями, экспрессировались как дополнительные независимые и физически отдельные полипептиды. С этой целью дополнительные кодирующие последовательности могут быть отделены от других кодирующих последовательностей одной или более нуклеотидными последовательностями, кодирующими одну или более последовательностей проскока рибосомы, последовательностей IRES или дополнительных промоторных последовательностей.

В некоторых примерах нуклеиновая кислота (*например*, вектор экспрессии или молекула РНК, как описано в данном документе) может содержать кодирующие последовательности как для полипептида, модулирующего цикл Кребса (*например*, описанного в данном документе), так и для подходящего полипептида химерного рецептора, две кодирующие последовательности в любом порядке, разделенные третьей нуклеотидной последовательностью, кодирующей пептид P2A (*например*, ATNFSLLKQAGDVEENPGP; SEQ ID NO: 106). В результате два отдельных полипептида, полипептид, модулирующий цикл Кребса, и химерный рецептор, могут быть получены из такой нуклеиновой кислоты, в которой часть P2A ATNFSLLKQAGDVEENPG (SEQ ID NO: 107) связана с вышестоящим полипептидом (кодируется вышестоящей кодирующей последовательностью), а остаток Р из пептида P2A связан с нижестоящим полипептидом (кодируется нижестоящей кодирующей последовательностью). В некоторых примерах полипептид химерного рецептора находится выше по рамке считывания, а полипептид, модулирующий цикл Кребса, находится ниже. В других примерах полипептид, модулирующий цикл Кребса, расположен выше по рамке считывания, а полипептид химерного рецептора - ниже.

В некоторых примерах нуклеиновая кислота (*например*, вектор экспрессии или молекула РНК, как описано в данном документе) может содержать кодирующие последовательности как для полипептида, модулирующего цикл Кребса (*например*, описанного в данном документе), так и для подходящего полипептида ACTR, две кодирующие последовательности в любом порядке, разделенные третьей нуклеотидной последовательностью, кодирующей пептид P2A (*например*, ATNFSLLKQAGDVEENPGP; SEQ ID NO: 106). В результате два отдельных полипептида, полипептид, модулирующий цикл Кребса, и ACTR, могут быть получены из такой нуклеиновой кислоты, в которой часть P2A ATNFSLLKQAGDVEENPG (SEQ ID NO: 107) связана с вышестоящим полипептидом (кодируется вышестоящей кодирующей последовательностью), а остаток Р из пептида P2A связан с нижестоящим полипептидом (кодируется нижестоящей кодирующей последовательностью). В некоторых примерах полипептид ACTR находится

выше по рамке считывания, а полипептид, модулирующий цикл Кребса, находится ниже. В других примерах полипептид, модулирующий цикл Кребса, расположен выше по рамке считывания, а полипептид ACTR - ниже.

В некоторых примерах описанная выше нуклеиновая кислота может дополнительно кодировать линкер (*например*, линкер GSG) между двумя сегментами кодируемых последовательностей, например, между расположенным выше по рамке считывания полипептидом и пептидом P2A.

В конкретных примерах описанная в данном документе нуклеиновая кислота имеет такую конфигурацию, что она экспрессирует два отдельных полипептида в клетке-хозяине, в которую трансфицируется нуклеиновая кислота: (i) первый полипептид, который содержит от N-конца до С-конца подходящий CAR (*например*, SEQ ID NO: 104 или SEQ ID NO: 105), пептидный линкер (*например*, линкер GSG) и сегмент ATNFSLLKQAGDVEENPG (SEQ ID NO: 107), полученный из пептида P2A; и (ii) второй полипептид, который содержит от N-конца до С-конца остаток Р, полученный из пептида P2A, и полипептид, модулирующий цикл Кребса (*например*, любую из SEQ ID NO: 81-92).

В конкретных примерах описанная в данном документе нуклеиновая кислота имеет такую конфигурацию, что она экспрессирует два отдельных полипептида в клетке-хозяине, в которую трансфицируется нуклеиновая кислота: (i) первый полипептид, который содержит от N-конца до С-конца подходящий ACTR (*например*, любая из SEQ ID NO: 1-80, описанных в настоящем документе, например, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 57), пептидный линкер (*например*, линкер GSG) и сегмент ATNFSLLKQAGDVEENPG (SEQ ID NO: 107), полученный из пептида P2A; и (ii) второй полипептид, который содержит от N-конца до С-конца остаток Р, полученный из пептида P2A, и полипептид, модулирующий цикл Кребса (*например*, любую из SEQ ID NO: 81-92).

В некоторых случаях дополнительные представляющие интерес полипептиды также могут быть введены в иммунные клетки хозяина.

После введения в клетки-хозяева вектора, кодирующего любой из полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептидов химерного рецептора, представленных в настоящем документе, или нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид химерного рецептора и/или полипептид, модулирующий цикл Кребса (*например*, молекулу РНК), клетки можно культивировать в условиях, которые обеспечивают экспрессию полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептида химерного рецептора. В примерах, в которых нуклеиновая кислота, кодирующая полипептиды, модулирующие цикл Кребса, и/или полипептид химерного рецептора регулируется индуцибельным промотором, клетки-хозяева могут культивироваться в условиях, при которых индуцибельный промотор активирован. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой индуцибельный промотор, а иммунные клетки культивируют в присутствии индуцирующей молекулы или в условиях, при которых продуцируется индуцирующая молекула. Определение того, экспрессируется ли полипептид, модулирующий цикл Кребса, и/или полипептид химерного рецептора, будет очевидным

для специалиста в данной области и может быть оценено любым известным методом, например, обнаружением полипептида, модулирующего цикл Кребса, и/или химерной мРНК, кодирующей полипептид рецептора, с помощью количественной ПЦР с обратной транскриптазой (qRT-PCR) или обнаружения полипептида, модулирующего цикл Кребса, и/или полипептида химерного рецептора методами, включая вестерн-блоттинг, флуоресцентную микроскопию и проточную цитометрию.

Альтернативно, экспрессия полипептида химерного рецептора может происходить *in vivo* после введения иммунных клеток субъекту. Используемый в данном документе термин «субъект» относится к любому млекопитающему, такому как человек, обезьяна, мышь, кролик или домашнее млекопитающее. Например, субъект может быть приматом. В предпочтительном варианте осуществления субъектом является человек.

Альтернативно, экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, и/или полипептида химерного рецептора в любой из иммунных клеток, описанных в данном документе, может быть достигнута путем введения молекул РНК, кодирующих полипептиды, модулирующие цикл Кребса, и/или полипептиды химерного рецептора. Такие молекулы РНК можно получить транскрипцией *in vitro* или химическим синтезом. Затем молекулы РНК можно вводить в подходящие клетки-хозяева, такие как иммунные клетки (*например*, Т-клетки, NK-клетки или как Т-клетки, так и NK-клетки), *например*, электропорацией. Например, молекулы РНК могут быть синтезированы и введены в иммунные клетки хозяина в соответствии с методами, описанными в Rabinovich et al., Human Gene Therapy, 17:1027-1035 и WO 2013/040557.

В некоторых вариантах осуществления вектор(ы) или молекула(ы) РНК, содержащие полипептид, модулирующий цикл Кребса, и/или полипептид химерного рецептора, можно вводить в клетки-хозяева или иммунные клетки *in vivo*. В качестве неограничивающего примера, это может быть достигнуто путем введения вектора или молекулы РНК, кодирующей один или более полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или один или более полипептидов химерного рецептора, описанных в данном документе, непосредственно субъекту (*например*, посредством внутривенного введения), продуцируя клетки-хозяева, содержащие полипептиды, модулирующие цикл Кребса, и/или полипептиды химерного рецептора *in vivo*.

Способы получения клеток-хозяев, экспрессирующих любой из полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептидов химерных рецепторов, описанных в данном документе, также могут включать активацию клеток-хозяев *ex vivo*. Активация клетки-хозяина означает стимуляцию клетки-хозяина до активированного состояния, в котором клетка может выполнять эффекторные функции. Способы активации клетки-хозяина будут зависеть от типа клетки-хозяина, используемой для экспрессии полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептидов химерного рецептора. Например, Т-клетки могут быть активированы *ex vivo* в присутствии одной или более молекул, включая: анти-CD3 антитело, анти-CD28 антитело, IL-2, фитогемагглютинин, сконструированные искусственные стимулирующие клетки или частицы, или их

комбинацию, но не ограничивается ими. Сконструированные искусственные стимулирующие клетки могут быть искусственными антигенпрезентирующими клетками, известными в данной области. См, *например*, Neal et al., J. Immunol. Res. Ther. 2017, 2(1):68-79 и Turtle et al., Cancer J. 2010, 16(4):374-381, соответствующие раскрытия каждого из которых включены в настоящее описание посредством ссылки для цели и объекта изобретения, упомянутых в данном документе.

В других примерах NK-клетки можно активировать *ex vivo* в присутствии одной или более молекул, таких как лиганд 4-1BB, анти-4-1BB антитело, IL-15, антитело к рецептору IL-15, IL-2, IL12, IL-21, клеток K562 и/или сконструированных искусственных стимулирующих клеток или частиц. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, экспрессирующие любой из полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептидов химерного рецептора (клетки, экспрессирующие полипептид, модулирующий цикл Кребса, и/или полипептид ACTR/CAR), описанные в данном документе, активируются *ex vivo* перед введением субъекту. Определение того, активирована ли клетка-хозяин, будет очевидным для специалиста в данной области и может включать оценку экспрессии одного или более маркеров клеточной поверхности, связанных с активацией клеток, экспрессией или секрецией цитокинов, и морфологией клеток.

Способы получения клеток-хозяев, экспрессирующих любой из полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептидов химерных рецепторов, описанных в данном документе, могут включать размножение клеток-хозяев *ex vivo*. Размножение клеток-хозяев может включать любой метод, который приводит к увеличению количества клеток, экспрессирующих полипептиды, модулирующие цикл Кребса, и/или полипептиды химерного рецептора, например, позволяя клеткам-хозяевам пролиферировать или стимулируя пролиферацию клеток-хозяев. Способы стимуляции размножения клеток-хозяев будут зависеть от типа клетки-хозяина, используемой для экспрессии полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептидов химерного рецептора, и будут очевидны специалисту в данной области. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, экспрессирующие любой из полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептиды химерного рецептора, описанные в настоящем документе, размножаются *ex vivo* перед введением субъекту.

В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, экспрессирующие полипептиды, модулирующие цикл Кребса, и/или полипептиды химерного рецептора размножаются и активируются *ex vivo* перед введением клеток субъекту. Активация и размножение клетки-хозяина может использоваться для обеспечения интеграции вирусного вектора в геном и экспрессии гена, кодирующего полипептид, модулирующий цикл Кребса, и/или полипептид химерного рецептора, как описано в данном документе. Если используется электропорация мРНК, активация и/или размножение может не потребоваться, хотя электропорация может быть более эффективной при выполнении на активированных клетках. В некоторых случаях полипептид, модулирующий цикл Кребса,

и/или полипептид химерного рецептора временно экспрессируется в подходящей клетке-хозяине (*например*, в течение 3-5 дней). Временная экспрессия может быть преимущественной, если существует потенциальная токсичность, и должна быть полезной на начальных этапах клинических испытаний при возможных побочных эффектах.

Любые клетки-хозяева, экспрессирующие полипептиды, модулирующие цикл Кребса, и/или полипептиды химерного рецептора могут быть смешаны с фармацевтически приемлемым носителем с образованием фармацевтической композиции, что также входит в объем настоящего изобретения.

Фраза «фармацевтически приемлемый», используемая в связи с композициями по настоящему изобретению, относится к химическим соединениям и другим ингредиентам таких композиций, которые являются физиологически переносимыми и обычно не вызывают нежелательных реакций при введении млекопитающему (*например*, человеку). Предпочтительно, как он используется в данном документе, термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный регуляторным ведомством Федерального правительства или правительством штата, или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения для млекопитающих, и более конкретно для людей. «Приемлемый» означает, что носитель совместим с активным ингредиентом композиции (*например*, нуклеиновыми кислотами, векторами, клетками или терапевтическими антителами) и не влияет отрицательно на субъекта, которому вводят композицию(и). Любая из фармацевтических композиций, используемых в настоящих способах, может содержать фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы в форме лиофилизированных образований или водных растворов.

Фармацевтически приемлемые носители, включая буферы, хорошо известны в данной области и могут включать фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты; полипептиды с низкой молекулярной массой; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; аминокислоты; гидрофобные полимеры; моносахариды; дисахариды; и другие углеводы; металлокомплексы; и/или неионные ПАВ. См., *например*, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут также содержать одно или более дополнительных активных соединений, если это необходимо для конкретного показания, подлежащего лечению, предпочтительно те, которые обладают дополнительными активностями, которые не влияют отрицательно друг на друга. Неограничивающие примеры возможных дополнительных активных соединений включают, *например*, IL-2, а также различные агенты, известные в данной области и перечисленные ниже при обсуждении комбинированных способов лечения.

IV. Иммунотерапия с применением генетически сконструированных гемопоэтических клеток, описанных в данном документе

Генетически сконструированные гемопоэтические клетки (*например*,

гемопозитические стволовые клетки, иммунные клетки, такие как NK-клетки или Т-клетки), описанные в настоящем документе, могут быть использованы в иммунотерапии против различных расстройств, например рака, инфекционных заболеваний и аутоиммунных заболеваний.

(a) Комбинированная иммунотерапия генетически сконструированными гемопозитическими клетками, экспрессирующими полипептиды ACTR, и Fc-содержащими терапевтическими агентами

Типичные полипептиды ACTR по настоящему изобретению придают Т-лимфоцитам способность антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и усиливают ADCC в NK-клетках. Когда рецептор задействован антителом, связанным с клетками, он запускает активацию Т-клеток, устойчивую пролиферацию и специфическую цитотоксичность в отношении связанных клеток.

Степень аффинности CD16 к Fc-части Ig является критическим фактором ADCC и, таким образом, клинических ответов на иммунотерапию антителами. В качестве примера был выбран CD16 с полиморфизмом V158, который имеет более высокую аффинность связывания с Ig и опосредует более высокую ADCC по сравнению с CD16 с полиморфизмом F158. Хотя рецептор F158 имеет более низкую эффективность, чем рецептор V158, в индукции пролиферации Т-клеток и ADCC, рецептор F158 может иметь более низкую токсичность *in vivo*, чем рецептор V158, что делает его применимым в некоторых клинических контекстах.

Полипептиды, модулирующие цикл Кребса, совместно экспрессируемые с полипептидами ACTR в иммунных клетках, будут способствовать клеточной иммунной терапии, такой как терапия Т-клетками или терапия NK-клетками, позволяя клеткам расти и/или эффективно функционировать в условиях низкого содержания глюкозы, низкого содержания аминокислот, низкого pH и/или гипоксической среды. Цитотоксичность, направляемую антителами, можно было остановить всякий раз, когда это необходимо, простым прекращением введения антител. Клиническая безопасность может быть дополнительно повышена с помощью электропорации мРНК для временной экспрессии полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептидов ACTR, чтобы ограничить любую потенциальную аутоиммунную реактивность.

Таким образом, в одном варианте осуществления в изобретении предложен способ повышения эффективности основанной на антителах иммунотерапии рака у нуждающегося в этом субъекта, которого лечат с помощью Fc-содержащего терапевтического агента, такого как терапевтическое антитело, которое может связываться с антиген-экспрессирующими клетками. Fc-содержащий терапевтический агент содержит Fc-часть, например человеческую или гуманизированную Fc-часть, которая может распознаваться и связываться Fc-связывающей частью (*например*, внеклеточным доменом CD16A человека) ACTR, экспрессируемой на сконструированных иммунных клетках.

Описанные в данном документе способы могут включать введение субъекту

терапевтически эффективного количества антитела и терапевтически эффективного количества генетически сконструированных клеток-хозяев, таких как гемопоэтические клетки, например, иммунные клетки (*например*, Т-лимфоциты или NK-клетки), которые совместно экспрессируют полипептид, модулирующий цикл Кребса, и полипептид ASTR по настоящему изобретению. Субъект (*например*, пациент-человек, такой как пациент-человек с раком) лечился или лечится Fc-содержащим терапевтическим агентом, специфичным к целевому антигену. Целевой антиген может представлять собой любую молекулу, которая связана с заболеванием или состоянием, включая опухолевые антигены, патогенные антигены (*например*, бактериальные или вирусные) или антигены, присутствующие в пораженных клетках, такие как те, которые описаны в настоящем документе, но не ограничиваясь ими.

В контексте настоящего изобретения, поскольку оно относится к любому из перечисленных в данном документе болезненных состояний, термины «лечить», «лечение» и т.п. означают облегчение или смягчение по меньшей мере одного симптома, связанного с таким состоянием, или замедление или обращение вспять прогрессирования такого состояния. В контексте настоящего изобретения термин «лечить» также означает остановку, задержку начала (*т.е.* период до клинического проявления заболевания) и/или снижение риска развития или ухудшения заболевания. Например, в связи с раком термин «лечить» может означать устранение или уменьшение опухолевой нагрузки у пациента, или предотвращение, задержку или подавление метастазирования и *т.д.*

Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективный», применяемый к дозе или количеству, относится к тому количеству соединения или фармацевтической композиции, которое достаточно, чтобы привести к желаемой активности при введении нуждающемуся в этом субъекту. Обратите внимание, что когда вводится комбинация активных ингредиентов (*например*, первая фармацевтическая композиция, содержащая антитело, и вторая фармацевтическая композиция, содержащая популяцию Т-лимфоцитов или NK-клеток, которые экспрессируют полипептид, модулирующий цикл Кребса, и/или Т-клеточный рецептор, связанный с антителом (ASTR)), эффективное количество комбинации может включать или не включать количества каждого ингредиента, которые были бы эффективны при индивидуальном введении. В контексте настоящего изобретения термин «терапевтически эффективный» относится к тому количеству соединения или фармацевтической композиции, которое достаточно для задержки проявления, остановки прогрессирования, облегчения или смягчения по меньшей мере одного симптома расстройства, излеченного способами по настоящему изобретению.

Клетки-хозяева (*например*, гемопоэтические клетки, например, иммунные клетки, такие как Т-клетки и NK-клетки), экспрессирующие полипептиды, модулирующие цикл Кребса, и полипептиды ASTR, описанные в настоящем документе, применимы для усиления ADCC у субъекта и/или для повышения эффективности иммунотерапии на основе антител и/или для усиления роста и/или пролиферации иммунных клеток в среде с

низким содержанием глюкозы. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, такое как человек, обезьяна, мышь, кролик или домашнее млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента-человека с раком. В некоторых вариантах осуществления субъект лечился или лечится любым из терапевтических антител, описанных в данном документе.

Для практического применения описанного в данном документе способа эффективное количество клеток-хозяев, например иммунных клеток (*например*, НК-клеток и/или Т-лимфоцитов), экспрессирующих любой из полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и полипептидов АСТР, описанных в данном документе, и эффективное количество антитела или его композиции можно вводить субъекту, нуждающемуся в лечении, подходящим путем, таким как внутривенное введение. В контексте настоящего описания эффективное количество относится к количеству соответствующего агента (*например*, НК-клеток и/или Т-лимфоцитов, экспрессирующих полипептиды, модулирующие цикл Кребса, полипептиды АСТР, антитела или их композиции), которое при введении оказывает терапевтический эффект на субъекта. Определение того, достигло ли количество клеток или композиций, описанных в данном документе, терапевтического эффекта, очевидно для специалиста в данной области. Эффективные количества варьируются, как признают специалисты в данной области, в зависимости от конкретного состояния, которое лечат, тяжести состояния, индивидуальных параметров пациента, включая возраст, физическое состояние, размер, гендер, пол и вес, продолжительность лечения, характера сопутствующей терапии (если таковая имеется), конкретного пути введения и подобных факторов в пределах знаний и опыта практикующего врача. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество смягчает, облегчает, улучшает, уменьшает симптомы или задерживает прогрессирование любого заболевания или расстройства у субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления субъект, нуждающийся в лечении, представляет собой пациента-человека с раком. В некоторых вариантах осуществления субъект, нуждающийся в лечении, страдает одной или более патогенными инфекциями (*например*, вирусными, бактериальными и/или грибковыми инфекциями).

Способы по изобретению могут быть применены для лечения любого рака или любого патогена. Конкретные неограничивающие примеры рака, которые можно лечить способами по настоящему изобретению, включают, например, лимфому, рак молочной железы, рак желудка, нейробластому, остеосаркому, рак легких, рак кожи, рак предстательной железы, колоректальный рак, почечно-клеточную карциному, рак яичников, рабдомиосаркому, лейкемию, мезотелиому, рак поджелудочной железы, рак головы и шеи, ретинобластому, глиому, глиобластому, рак щитовидной железы, гепатоцеллюлярный рак, рак пищевода и рак шейки матки. В некоторых вариантах осуществления рак может представлять собой солидную опухоль.

Способы по изобретению могут также использоваться для лечения инфекционных

заболеваний, которые могут быть вызваны бактериальной инфекцией, вирусной инфекцией или грибковой инфекцией. В таких случаях генетически сконструированные иммунные клетки можно использовать совместно с Fc-содержащим терапевтическим агентом (*например*, антителом), который нацелен на патогенный антиген (*например*, антиген, связанный с бактерией, вирусом или грибом, вызывающим инфекцию). Конкретные неограничивающие примеры патогенных антигенов включают бактериальные, вирусные и/или грибковые антигены, но не ограничиваются ими. Ниже приведены некоторые примеры: нейраминидаза вируса гриппа, гемагглютинин или белок M2, гликопротеин F или гликопротеин G респираторно-синцитиального вируса (RSV) человека, гликопротеин gB, gC, gD или gE вируса простого герпеса, MOMP хламидий или белок PorB, коровий белок вируса денге, матричный белок или гликопротеин E, гемагглютинин вируса кори, гликопротеин gB вируса простого герпеса 2 типа, полиовирус I VP1, гликопротеины оболочки ВИЧ-1, коровий антиген или поверхностный антиген гепатита B, дифтерийный токсин, эпитоп Streptococcus 24M, пилин гонококка, вирус псевдобешенства g50 (gpD), вирус псевдобешенства II (gpB), вирус псевдобешенства III (gpC), гликопротеин H вируса псевдобешенства, гликопротеин E вируса псевдобешенства, гликопротеин трансмиссивного гастроэнтерита 195, белок трансмиссивного матрикса гастроэнтерита или гликопротеин E1 или E2 вируса гепатита C человека.

В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки вводят субъекту в количестве, эффективном для повышения активности ADCC по меньшей мере на 20% и/или по меньшей мере в 2 раза, *например*, повышения ADCC на 50%, 80%, 100%, в 2 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 50 раз, в 100 раз или более.

Иммунные клетки вводят совместно с Fc-содержащим терапевтическим агентом, таким как терапевтическое антитело, для нацеливания на клетки, экспрессирующие антиген, с которым связывается Fc-содержащий терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления более одного Fc-содержащего терапевтического агента, такого как более одного антитела, можно использовать совместно с иммунными клетками. Иммуноterapia на основе антител может использоваться для лечения, облегчения или уменьшения симптомов любого заболевания или расстройства, для которого иммуноterapia считается применимой для субъекта.

Антитело (взаимозаменяемо используется во множественном числе) представляет собой молекулу иммуноглобулина, способную специфически связываться с мишенью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид и *т.д.*, по меньшей мере через один сайт распознавания антигена, расположенный в варибельной области молекула иммуноглобулина. Используемый в данном документе термин «антитело» охватывает не только интактные (*т.е.* полноразмерные) поликлональные или моноклональные антитела, но также их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат Fc-область, их мутанты, слитые белки, содержащие часть антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, диатела, однодоменные антитела (*например*, нанотела), линейные антитела,

мультиспецифические антитела (*например*, биспецифические антитела) и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая включает сайт распознавания антигена с необходимой специфичностью и Fc-область, включая варианты гликозилирования антител, варианты аминокислотных последовательностей антител и ковалентно модифицированные антитела. Антитело включает антитело любого класса, такого как IgD, IgE, IgG, IgA или IgM (или их подкласса), и антитело не обязательно должно принадлежать к какому-либо конкретному классу. Иммуноглобулины можно отнести к разным классам в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), *например*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. Антитело для применения в настоящем изобретении содержит Fc-область, распознаваемую совместно используемыми иммунными клетками, с повышенной экспрессией полипептидов ACTR и/или полипептидов, модулирующих цикл Кребса. Fc-область может быть человеческой или гуманизированной Fc-областью.

Любое из описанных в данном документе антител может быть моноклональным или поликлональным. «Моноклональное антитело» относится к популяции гомогенных антител, а «поликлональное антитело» относится к популяции гетерогенных антител. Эти два термина не ограничивают источник антитела или способ его получения.

В одном примере антитело, используемое в описанных в данном документе способах, представляет собой гуманизированное антитело. Гуманизированные антитела относятся к формам нечеловеческих (*например*, мышинных) антител, которые представляют собой специфические химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулина или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. По большей части гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки из определяющей комплементарности области (CDR) реципиента заменены остатками из CDR видов, отличных от человека (донорское антитело), такого как мышь, крыса или кролик, имеющего желаемую специфичность, аффинность и функциональную возможность. В некоторых примерах остатки каркасного участка (FR) Fv человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Кроме того, гуманизированное антитело может содержать остатки, которых нет ни в антителе-реципиенте, ни в импортированных последовательностях CDR или каркасной области, но которые включены для дальнейшего уточнения и оптимизации характеристик антитела. В общем, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере

одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по существу все области CDR соответствуют доменам иммуноглобулина, не относящегося к человеку, и все или по существу все области FR являются областями консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело оптимально также будет включать по крайней мере часть константной области или домена иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека. Антитела могут иметь Fc-области, модифицированные, как описано в WO 99/58572. Используемые в данном документе антитела могут быть гликозилированными (*например*, фукозилированными) или афукозилированными. Другие формы гуманизированных антител имеют одну или более CDR (одну, две, три, четыре, пять, шесть), которые изменены по сравнению с исходным антителом, которые также называются одной или более CDR, «происходящими из» одной или более CDR из исходное антитело. Гуманизированные антитела могут также включать созревание аффинности.

В другом примере описанное в данном документе антитело представляет собой химерное антитело, которое может включать тяжелую константную область и легкую константную область антитела человека. Химерные антитела относятся к антителам, имеющим переменную область или часть переменной области от первого вида и константную область от второго вида. Обычно в этих химерных антителах переменная область как легкой, так и тяжелой цепи имитирует переменные области антител, происходящих от одного вида млекопитающих (*например*, млекопитающего, не являющегося человеком, такого как мышь, кролик и крыса), в то время как константные части гомологичны последовательностям в антителах, полученных от другого млекопитающего, такого как человек. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные модификации могут быть сделаны в переменной области и/или константной области.

Гемопоезические клетки, например, иммунные клетки (*например*, Т-лимфоциты и/или NK-клетки) или ГСК, экспрессирующие любой из полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептидов АСТР, описанных в данном документе, можно вводить субъекту, который лечился или лечится Fc-содержащим антителом. Например, иммунные клетки можно вводить человеку одновременно с антителом. Альтернативно, иммунные клетки можно вводить субъекту-человеку во время иммунотерапии на основе антител. В некоторых примерах иммунные клетки и антитело можно вводить субъекту-человеку с интервалом по меньшей мере 4 часа, *например* с интервалом по меньшей мере 12 часов, с интервалом по меньшей мере 1 сутки, с интервалом по меньшей мере 3 суток, с интервалом по меньшей мере одна неделя, с интервалом по меньшей мере две недели или с интервалом по меньшей мере один месяц.

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, специфически связываются с соответствующим целевым антигеном или его эпитопом. Антитело, которое «специфически связывается» с антигеном или эпитопом, является термином, хорошо известным в данной области техники. Молекула, как сообщается,

проявляет «специфическое связывание», если она реагирует чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с конкретным целевым антигеном, чем с альтернативными мишенями. Антитело «специфически связывается» с целевым антигеном или эпитопом, если оно связывается с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими веществами. Например, антитело, которое специфически (или предпочтительно) связывается с антигеном или его антигенным эпитопом, представляет собой антитело, которое связывает этот целевой антиген с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими антигенами или другими эпитопами того же антигена. Также понятно, что из этого определения, например, антитело, которое специфически связывается с первым целевым антигеном, может или не может специфически или предпочтительно связываться со вторым целевым антигеном. По существу, «специфическое связывание» или «предпочтительное связывание» не обязательно требует (хотя оно может включать) исключительного связывания. В некоторых примерах антитело, которое «специфически связывается» с целевым антигеном или его эпитопом, может не связываться с другими антигенами или другими эпитопами того же антигена.

В некоторых вариантах осуществления антитело, как описано в данном документе, имеет подходящую аффинность связывания с целевым антигеном (*например*, любой из мишеней, описанных в данном документе) или его антигенными эпитопами. Антитела для применения в способах иммунотерапии, описанных в данном документе, могут связываться (*например*, специфически связываться) с представляющим интерес целевым антигеном или с конкретной областью или антигенным эпитопом в нем. В таблице 3 выше перечислены типичные представляющие интерес целевые антигены и типичные антитела, специфичные к ним.

(b) Иммунотерапия генетически сконструированных гемопоэтических клеток, экспрессирующих полипептиды CAR

Описанные в данном документе генетически сконструированные гемопоэтические клетки (*например*, гемопоэтические стволовые клетки, иммунные клетки, такие как Т-клетки или естественные клетки-киллеры), совместно экспрессирующие полипептид, модулирующий цикл Кребса, и полипептид CAR, могут быть применены в иммунной терапии, такой как терапия Т-клетками или терапия НК-клетками, для ингибирования пораженных клеток, экспрессирующих антиген, на который нацелен полипептид CAR, прямо или косвенно (*например*, посредством терапевтического агента, конъюгированного с меткой, с которой связывается полипептид CAR). Полипептид, модулирующий цикл Кребса, совместно экспрессируемый с полипептидом CAR в иммунных клетках, будет способствовать иммунной терапии на основе клеток, позволяя клеткам расти и/или эффективно функционировать при низком содержании глюкозы, низком содержании аминокислот, низком pH и/или гипоксической среде, например, в микроокружении опухоли. Клиническая безопасность может быть дополнительно повышена за счет

использования электропорации мРНК для временной экспрессии полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептидов CAR с целью ограничения любой потенциальной неопухолевой специфической реактивности.

Описанные в данном документе способы могут включать введение субъекту терапевтически эффективного количества генетически сконструированных клеток-хозяев, таких как гемопоэтические клетки, например иммунные клетки (*например*, Т-лимфоциты или NK-клетки), которые совместно экспрессируют полипептид, модулирующий цикл Кребса, и полипептид CAR по настоящему изобретению. Субъект (*например*, пациент-человек, такой как пациент-человек с раком) мог дополнительно лечиться или лечится противораковой или противинфекционной терапией, включая, помимо прочего, противораковое терапевтическое средство или противинфекционное средство. CAR имеет антигенсвязывающий домен, который может связывать любой целевой антиген. Такой целевой антиген может представлять собой любую молекулу, которая связана с заболеванием или состоянием, включая опухолевые антигены, патогенные антигены (*например*, бактериальные, грибковые или вирусные) или антигены, присутствующие в пораженных клетках, такие как те, которые описаны в настоящем документе, но не ограничиваясь ими.

Клетки-хозяева (*например*, гемопоэтические клетки, например, иммунные клетки, такие как Т-клетки и NK-клетки), экспрессирующие полипептиды, модулирующие цикл Кребса, и полипептиды CAR, описанные в настоящем документе, применимы для ингибирования клеток, экспрессирующих целевой антиген, и/или для усиления роста и/или пролиферации иммунных клеток в среде с низким содержанием глюкозы, в среде с низким содержанием аминокислот, в среде с низким pH и/или в гипоксической среде, например, в микроокружении опухоли. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, такое как человек, обезьяна, мышь, кролик или домашнее млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента-человека с раком. В некоторых вариантах осуществления субъект дополнительно лечился или лечится любым из терапевтических антител, описанных в данном документе.

Для практического применения описанного в данном документе способа эффективное количество гемопоэтических клеток, например иммунных клеток (NK-клеток и/или Т-лимфоцитов), экспрессирующих любой из полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и полипептидов CAR, описанных в данном документе, или их композиций можно вводить субъекту, нуждающемуся в лечении, подходящим путем, таким как внутривенное введение. В контексте настоящего описания эффективное количество относится к количеству соответствующего агента (*например*, NK-клеток и/или Т-лимфоцитов, экспрессирующих полипептиды, модулирующие цикл Кребса, полипептиды CAR, или их композиций), которое при введении оказывает терапевтический эффект на субъекта. Определение того, достигло ли количество клеток или композиций, описанных в данном документе, терапевтического эффекта, очевидно для специалиста в данной

области. Эффективные количества варьируются, как признают специалисты в данной области, в зависимости от конкретного состояния, которое лечат, тяжести состояния, индивидуальных параметров пациента, включая возраст, физическое состояние, размер, гендер, пол и вес, продолжительность лечения, характера сопутствующей терапии (если таковая имеется), конкретного пути введения и подобных факторов в пределах знаний и опыта практикующего врача. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество смягчает, облегчает, улучшает, уменьшает симптомы или задерживает прогрессирование любого заболевания или расстройства у субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления субъект, нуждающийся в лечении, представляет собой пациента-человека с раком. В некоторых вариантах осуществления субъект, нуждающийся в лечении, страдает одной или более патогенными инфекциями (*например*, вирусными, бактериальными и/или грибковыми инфекциями).

Способы по изобретению могут быть применены для лечения любого рака или любого патогена. Конкретные неограничивающие примеры рака, которые можно лечить способами по настоящему изобретению, включают, например, лимфому, рак молочной железы, рак желудка, нейробластому, остеосаркому, рак легких, рак кожи, рак предстательной железы, колоректальный рак, почечно-клеточную карциному, рак яичников, рабдомиосаркому, лейкемию, мезотелиому, рак поджелудочной железы, рак головы и шеи, ретинобластому, глиому, глиобластому, рак щитовидной железы, гепатоцеллюлярный рак, рак пищевода и рак шейки матки. В некоторых вариантах осуществления рак может представлять собой солидную опухоль.

Способы по изобретению могут также использоваться для лечения инфекционных заболеваний, которые могут быть вызваны бактериальной инфекцией, вирусной инфекцией или грибковой инфекцией. В таких случаях генетически сконструированные иммунные клетки, экспрессирующие полипептид CAR, специфичный к патогенному антигену (*например*, антигену, связанному с бактерией, вирусом или грибом, вызывающим инфекцию), можно применять для уничтожения инфицированных клеток. Конкретные неограничивающие примеры патогенных антигенов включают бактериальные, вирусные и/или грибковые антигены, но не ограничиваются ими.

В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки вводят субъекту в количестве, эффективном для ингибирования клеток, экспрессирующих целевой антиген, по меньшей мере на 20% и/или по меньшей мере в 2 раза, *например*, для ингибирования клеток, экспрессирующих целевой антиген на 50%, 80%, 100%, в 2 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 50 раз, в 100 раз и более.

Дополнительные терапевтические агенты (*например*, иммунотерапевтические агенты на основе антител) могут использоваться для лечения, облегчения или уменьшения симптомов любого заболевания или расстройства, для которого терапевтический агент считается полезным для субъекта.

Эффективность клеточной иммунотерапии, описанной в данном документе, может

быть оценена любым способом, известным в данной области, и будет очевидна для квалифицированного медицинского специалиста. Например, эффективность клеточной иммунотерапии может быть оценена по выживаемости субъекта или опухолевой или раковой нагрузке у субъекта, или ткани или их образцу. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки вводят субъекту, нуждающемуся в лечении, в количестве, эффективном для повышения эффективности клеточной иммунотерапии по меньшей мере на 20% и/или по меньшей мере в 2 раза, *например*, для повышения эффективности иммунотерапии на основе антител на 50%, 80%, 100%, в 2 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 50 раз, в 100 раз или более по сравнению с эффективностью в отсутствие иммунных клеток, экспрессирующих полипептид, модулирующий цикл Кребса, и/или полипептид CAR.

В любой из композиций или способов, описанных в данном документе, иммунные клетки (*например*, NK и/или Т-клетки) могут быть аутологичными по отношению к субъекту, *то есть* иммунные клетки могут быть получены от субъекта, нуждающегося в лечении, с помощью генной инженерии для экспрессии полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептидов CAR, а затем введены тому же субъекту. В одном конкретном варианте осуществления перед повторным введением субъекту аутологичные иммунные клетки (*например*, Т-лимфоциты или NK-клетки) активируются и/или размножаются *ex vivo*. Введение аутологичных клеток субъекту может привести к снижению отторжения клеток-хозяев по сравнению с введением неаутологичных клеток.

Альтернативно, клетки-хозяева представляют собой аллогенные клетки, *т.е.* клетки получают от первого субъекта, генетически конструируют для экспрессии полипептида, модулирующего цикл Кребса, и/или полипептида химерного рецептора (*например*, полипептида ACTR или полипептида CAR), и вводят второму субъекту, отличному от первого, но того же вида. Например, аллогенные иммунные клетки могут быть получены от донора-человека и введены реципиенту-человеку, который отличается от донора. В конкретном варианте осуществления Т-лимфоциты представляют собой аллогенные Т-лимфоциты, в которых экспрессия эндогенного Т-клеточного рецептора подавлена или устранена. В одном конкретном варианте осуществления перед введением субъекту аллогенные Т-лимфоциты активируются и/или размножаются *ex vivo*. Т-лимфоциты можно активировать любым способом, известным в данной области, *например*, в присутствии анти-CD3/CD28, IL-2, фитогемагглютинаина, сконструированных искусственных стимулирующих клеток или частиц, или их комбинации.

NK-клетки можно активировать любым способом, известным в данной области, *например*, в присутствии одного или более агентов, выбранных из группы, состоящей из белка лиганда CD137, антитела к CD137, белка IL-15, антитела к рецептору IL-15, белка IL-2, белка IL-12, белка IL-21 и линии клеток K562, и/или сконструированных искусственных стимулирующих клеток или частиц. См., *например*, патенты США № 7435596 и 8026097 для описания применимых способов размножения NK-клеток.

Например, НК-клетки, используемые в композициях или способах по настоящему описанию, можно предпочтительно размножать путем воздействия на клетки, которые не экспрессируют или слабо экспрессируют молекулы главного комплекса гистосовместимости I и/или II и которые были генетически модифицированы для экспрессии связанных с мембраной IL-15 и лиганда 4-1BB (CD137L). Такие клеточные линии включают K562 [ATCC, CCL 243; Lozzio et al., Blood 45(3): 321-334 (1975); Klein et al., Int. J. Cancer 18: 421-431 (1976)], и линию клеток опухоли Вильмса HFWT (Fehniger et al., Int Rev Immunol 20(3-4):503-534 (2001); Harada H, et al., Exp Hematol 32(7):614-621 (2004)), линию клеток опухоли эндометрия матки HHUA, линию клеток меланомы HMV-II, линию клеток гепатобластомы HuH-6, линию клеток мелкоклеточной карциномы легких Lu-130 и Lu-134-A, линию клеток нейробластомы NB 19 и N1369, линию клеток эмбриональной карциномы из семенников NEC 14, линию клеток карциномы шейки матки TCO-2 и линию клеток нейробластомы с метастазами в костном мозге TNB 1 [Harada, et al., Jpn. J. Cancer Res 93: 313-319 (2002)], но не обязательно ограничиваются ими. Предпочтительно используемая клеточная линия не экспрессирует или слабо экспрессирует молекулы ГКГС I и II, такая как клеточные линии K562 и HFWT. Твердая подложка может использоваться вместо клеточной линии. Такая подложка должна предпочтительно иметь прикрепленную на своей поверхности по меньшей мере одну молекулу, способную связываться с НК-клетками и вызывать событие первичной активации и/или пролиферативный ответ, или способную связывать молекулу, имеющую такой эффект, тем самым действуя как каркас. К поверхности подложки может быть прикреплен белок лиганда CD137, антитело к CD137, белок IL-15 или антитело к рецептору IL-15. Предпочтительно, на поверхности подложки должны быть связанное антитело к рецептору IL-15 и антитело к CD137.

В одном варианте осуществления описанных композиций или способов за введением (или повторным введением) Т-лимфоцитов, НК-клеток или Т-лимфоцитов и НК-клеток субъекту следует введение субъекту терапевтически эффективного количества IL-2.

В соответствии с настоящим описанием пациентов можно лечить путем инфузии терапевтически эффективных доз иммунных клеток, таких как Т-лимфоциты или НК-клетки, содержащие полипептид, модулирующий цикл Кребса, и/или полипептид CAR по настоящему описанию в диапазоне от примерно 10^5 до 10^{10} или больше клеток на килограмм веса тела (клеток/кг). Инфузию можно повторять столько раз, сколько пациент может переносить, пока не будет достигнут желаемый ответ. Подходящая доза инфузии и схема введения будут варьироваться от пациента к пациенту, но могут быть определены лечащим врачом для конкретного пациента. Обычно вводят начальные дозы примерно 10^6 клеток/кг, увеличиваясь до 10^8 или более клеток/кг. IL-2 можно вводить совместно для размножения введенных инфузией клеток. Количество IL-2 может составлять примерно $1-5 \times 10^6$ международных единиц на квадратный метр поверхности тела.

Термин «примерно» или «приблизительно» означает в пределах допустимого

интервала погрешности для конкретного значения, как определено средним специалистом в данной области, что будет частично зависеть от того, как значение измеряется или определяется, *то есть* от ограничений системы измерения. Например, «примерно» может означать в пределах допустимого стандартного отклонения в соответствии с практикой в данной области. Альтернативно, «примерно» может означать диапазон до $\pm 20\%$, предпочтительно до $\pm 10\%$, более предпочтительно до $\pm 5\%$ и еще более предпочтительно до $\pm 1\%$ от заданного значения. В качестве альтернативы, особенно в отношении биологических систем или процессов, этот термин может означать в пределах порядка величины, предпочтительно в пределах 2-кратного значения. Если в заявке и формуле изобретения описаны конкретные значения, и если не указано иное, подразумевается термин «примерно», который в этом контексте означает в пределах допустимого интервала погрешности для конкретного значения.

Эффективность описанных в данном документе композиций или способов может быть оценена любым способом, известным в данной области техники, и будет очевидна квалифицированному медицинскому специалисту. Например, эффективность описанных в данном документе композиций или способов может быть оценена по выживаемости субъекта или раковой или патогенной нагрузке у субъекта, или их ткани или образцу. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут быть оценены на основе безопасности или токсичности терапии (*например*, введения иммунных клеток, экспрессирующих полипептиды, модулирующие цикл Кребса, и полипептиды CAR) у субъекта, например, по общему состоянию здоровья субъекта и/или наличию нежелательных явлений или серьезных нежелательных явлений.

(с) Другие иммунотерапия

В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные иммунные клетки, экспрессирующие один или более полипептидов, модулирующих цикл Кребса (*например*, GOT, такие как GOT1 или GOT2), могут происходить из естественных иммунных клеток, специфичных для пораженных клеток (*например*, раковых клеток или клеток, инфицированных патогенами). Такие генетически сконструированные иммунные клетки (*например*, инфильтрирующие опухоль лимфоциты или TIL) могут не экспрессировать совместно любой полипептид химерного рецептора и могут использоваться для разрушения клеток-мишеней заболевания, *например*, раковых клеток. Генетически сконструированные TIL, экспрессирующие один или более полипептидов, модулирующих цикл Кребса, но не химерные рецепторы, могут использоваться совместно с биспецифическим антителом, способным связываться с опухолевыми клетками-мишенями и TIL (BiTE).

В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные иммунные клетки, экспрессирующие один или более полипептидов, модулирующих цикл Кребса (*например*, GOT, такие как GOT1 или GOT2), могут быть T_{reg}-клетками. Такие T_{reg}-клетки могут совместно экспрессировать полипептид химерного рецептора, как описано в данном документе. Альтернативно, T_{reg}-клетки могут не экспрессировать совместно полипептид

химерного рецептора и могут использоваться для намеченной терапии.

V. Комбинированные способы лечения

Композиции и способы, описанные в настоящем описании, могут использоваться в сочетании с другими типами терапии рака, такими как химиотерапия, хирургия, лучевая терапия, генная терапия и так далее, или противоинфекционной терапией. Такие терапии можно вводить одновременно или последовательно (в любом порядке) с иммунотерапией по настоящему описанию. При совместном введении с дополнительным терапевтическим агентом подходящие терапевтически эффективные дозировки для каждого агента могут быть снижены из-за аддитивного действия или синергизма.

В некоторых случаях иммунные клетки (*например*, Т-лимфоциты и/или НК-клетки), экспрессирующие любой из полипептидов, модулирующих цикл Кребса, и/или полипептиды химерного рецептора, описанные в настоящем документе, можно вводить субъекту, который лечился или лечится дополнительным терапевтическим агентом (*например*, дополнительным противораковым терапевтическим агентом). Например, иммунные клетки можно вводить человеку одновременно с дополнительным терапевтическим агентом. Альтернативно, иммунные клетки можно вводить человеку до введения дополнительного терапевтического агента. Альтернативно, иммунные клетки можно вводить человеку после введения дополнительного терапевтического агента.

Генетически сконструированные иммунные клетки (*например*, Т-клетки или НК-клетки), которые совместно экспрессируют полипептид, модулирующий цикл Кребса, и полипептид CAR, специфичный к метке, можно использовать совместно с терапевтическим агентом, конъюгированным с меткой. Посредством терапевтического агента, который способен связываться с антигеном, связанным с пораженными клетками, такими как опухолевые клетки, такие генетически сконструированные иммунные клетки могут взаимодействовать с пораженными клетками и подавлять их рост. Любое из антител, перечисленных в Таблице 1 выше, или другие антитела, специфичные к тому же целевому антигену, также перечисленные в Таблице 1, могут быть конъюгированы с подходящей меткой (*например*, описанной в данном документе) и могут быть использованы совместно с иммунными клетками, совместно экспрессирующими полипептид, модулирующий цикл Кребса, и полипептид CAR, специфичный к метке.

Лечение по настоящему описанию может быть объединено с другими иммуномодулирующими видами лечения, такими как, *например*, терапевтические вакцины (включая, помимо прочего, GVAX, вакцины на основе DC и *т. д.*), ингибиторы контрольных точек (включая, помимо прочего, агенты, которые блокируют CTLA4, PD1, LAG3, TIM3 и *т. д.*) или активаторы контрольных точек (включая, помимо прочего, агенты, усиливающие 41BB, OX40 и *т. д.*).

Неограничивающие примеры других терапевтических агентов, применимых для комбинации с иммунотерапией по настоящему описанию, включают: (i) антиангиогенные средства (*например*, TNP-470, фактор тромбоцитов 4, тромбоспондин-1, тканевые ингибиторы металлопротеиназ (TIMP1 и TIMP2), пролактин (фрагмент 16 кДа),

ангиостатин (фрагмент плазминогена 38 кДа), эндостатин, растворимый рецептор bFGF, трансформирующий фактор роста бета, интерферон альфа, растворимые рецепторы KDR и FLT-1, плацентарный белок, связанный с пролиферином, а также терапевтические агенты, перечисленные в Carmeliet and Jain (2000)); (ii) антагонист VEGF или антагонист рецептора VEGF, такой как анти-VEGF антитела, варианты VEGF, фрагменты растворимого рецептора VEGF, аптамеры, способные блокировать VEGF или VEGFR, нейтрализующие анти-VEGFR антитела, ингибиторы тирозинкиназ VEGFR и любые их комбинации; и (iii) химиотерапевтические соединения, такие как, *например*, аналоги пиримидина (5-фторурацил, флоксуридин, капецитабин, гемцитабин и цитарабин), аналоги пурина, антагонисты фолиевой кислоты и родственные ингибиторы (меркаптопурин, тиогуанин, пентостатин и 2-хлордезоксиаденозин (кладрибин)); антипролиферативные/антимитотические средства, включая натуральные продукты, такие как алкалоиды барвинка (винбластин, винкристин и винорелбин), разрушители микротрубочек, такие как таксан (паклитаксел, доцетаксел), винкристин, винбластин, нокадазол, эпотилоны, и навельбин, эпидиподофиллотоксины (этопозид и тенипозид), агенты, повреждающие ДНК (актиномицин, амсакрин, антрациклины, блеомицин, бусульфан, камптотецин, карбоплатин, хлорамбуцил, цисплатин, циклофосфамид, цитоксан, дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, гексаметилмеламин оксалиплатин, ифосфамид, мелфалан, мерхлорэктамин, митомицин, митоксантрон, нитрозомочевина, пликамицин, прокарбазин, таксол, таксотер, тенипозид, триэтилентифосфорамида и этопозид (VP16)); антибиотики, такие как дактиномицин (актиномицин D), даунорубицин, доксорубицин (адриамицин), идарубицин, антрациклины, митоксантрон, блеомицин, пликамицин (митрамицин) и митомицин; ферменты (L-аспарагиназа, которая системно метаболизирует L-аспарагин и лишает клетки, не способные синтезировать собственный аспарагин, его); антитромбоцитарные средства; антипролиферативные /антимитотические алкилирующие агенты, такие как азотный иприт (мехлорэтамин, циклофосфамид и аналоги, мелфалан, хлорамбуцил), этиленимины и метилмеламины (гексаметилмеламин и тиотепа), алкилсульфонаты-бусульфан, нитрозомочевины (кармустин (BCNU) и аналоги, стрептозоцин), тразендакарбазинин (DTIC); антипролиферативные/антимитотические антиметаболиты, такие как аналоги фолиевой кислоты (метотрексат); координационные комплексы платины (цисплатин, карбоплатин), прокарбазин, гидроксимочевина, митотан, аминоклутетимид; гормоны, аналоги гормонов (эстроген, тамоксифен, гозерелин, бикалутамид, нилутамид) и ингибиторы ароматазы (летрозол, анастрозол); антикоагулянты (гепарин, синтетические соли гепарина и другие ингибиторы тромбина); фибринолитические агенты (например тканевый активатор плазминогена, стрептокиназа и урокиназа), аспирин, дипиридамола, тиклопидин, клопидогрель, абциксимаб; антимиграционные агенты; антисекреторные средства (брефельдин); иммунодепрессанты (циклоспорин, такролимус (FK-506), сиролимус (рапамицин), азатиоприн, микофенолят мофетил); антиангиогенные соединения (*например*, TNP-470, генистеин, бевацизумаб) и ингибиторы фактора роста

(например, ингибиторы фактора роста фибробластов (FGF)); блокатор рецепторов ангиотензина; доноры оксида азота; антисмысловые олигонуклеотиды; антитела (трастузумаб); ингибиторы клеточного цикла и индукторы дифференцировки (третиноин); ингибиторы АКТ (такие как МК-2206 2HCl, перифозин (KRX-0401), GSK690693, ипатасертиб (GDC-0068), AZD5363, упросертиб, афуресертиб или трицирибин); ингибиторы mTOR, ингибиторы топоизомеразы (доксорубин (адриамицин), амсакрин, камптотецин, даунорубин, дактиномицин, энипозид, эпирубин, этопозид, идарубин, митоксантрон, топотекан и иринотекан), кортикостероиды (кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизон и преднизолон); ингибиторы киназ передачи сигнала фактора роста; индукторы митохондриальной дисфункции и активаторы каспаз; и деструкторы хроматина.

Примеры дополнительных применимых агентов описаны также в Physician's Desk Reference, 59.sup.th edition, (2005), Thomson P D R, Montvale N.J.; Gennaro et al., Eds. Remington's The Science and Practice of Pharmacy 20th edition, (2000), Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore Md.; Braunwald et al., Eds. Harrison's Principles of Internal Medicine, 15.sup.th edition, (2001), McGraw Hill, NY; Berkow et al., Eds. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, (1992), Merck Research Laboratories, Rahway N.J.

Введение дополнительного терапевтического агента можно осуществлять любым подходящим путем, включая системное введение, а также введение непосредственно в место заболевания (например, в опухоль).

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту дополнительного терапевтического агента (например, антитела) в одной дозе. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту дополнительного терапевтического агента (например, антитела) в нескольких дозах (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 дозах). В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент (например, антитело) вводят субъекту в нескольких дозах, причем первая доза дополнительного терапевтического агента (например, антитела) вводится субъекту примерно за 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней до введения иммунных клеток, экспрессирующих полипептид, модулирующий цикл Кребса, и/или полипептид CAR. В некоторых вариантах осуществления первая доза дополнительного терапевтического агента (например, антитела) вводится субъекту примерно за 24-48 часов до введения иммунных клеток, экспрессирующих полипептид, модулирующий цикл Кребса, и/или полипептид CAR. В некоторых случаях дополнительный терапевтический агент может быть антителом, специфичным к представляющему интерес целевому антигену, например, тем, которые перечислены в Таблице 1, и другие, специфичные к той же мишени.

В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство (например, антитело) вводят субъекту перед введением иммунных клеток, экспрессирующих полипептид, модулирующий цикл Кребса, и/или полипептид CAR, а затем примерно каждые две недели. В некоторых вариантах осуществления первые две

дозы дополнительного терапевтического агента (*например*, антитела) вводят с интервалом примерно в одну неделю (*например*, примерно 6, 7, 8 или 9 дней). В некоторых вариантах осуществления третья и следующие дозы вводятся примерно каждые две недели.

В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, время введения дополнительного терапевтического агента (*например*, антитела) является приблизительным и включает три дня до и три дня после указанного дня (*например*, введение каждые три недели включает введение в дни 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24).

Эффективность описанных в данном документе способов может быть оценена любым способом, известным в данной области, и будет очевидна для квалифицированного медицинского специалиста и/или тех, кто описан в данном документе. Например, эффективность иммунотерапии на основе антител может быть оценена по выживаемости субъекта или раковой нагрузке у субъекта или ткани или их образцу. В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия на основе антител оценивается на основании безопасности или токсичности терапии для субъекта, например, по общему состоянию здоровья субъекта и/или наличию нежелательных явлений или тяжелых нежелательных явлений.

VI. Наборы для терапевтического применения

В настоящем описании также предложены наборы для применения описанных в данном документе композиций. Например, в настоящем описании также предложены наборы, содержащие популяцию иммунных клеток (*например*, Т-лимфоцитов или NK-клеток, сконструированных *in vitro* или *in vivo*), которые экспрессируют полипептид, модулирующий цикл Кребса, и необязательно полипептид химерного рецептора, для применения в ингибировании роста пораженных клеток, *например* опухолевых клеток и/или усиления роста и/или пролиферации иммунных клеток в среде с низким содержанием глюкозы, в среде с низким содержанием аминокислот, в среде с низким pH и/или в гипоксической среде, например, в микроокружении опухоли. Набор может дополнительно содержать терапевтический агент или терапевтический агент, конъюгированный с меткой (*например*, описанной в данном документе), с которой связывается полипептид химерного рецептора, экспрессируемый на иммунных клетках. Такие наборы могут содержать один или более контейнеров, содержащих популяцию генетически сконструированных иммунных клеток, как описано в данном документе (*например*, Т-лимфоцитов и/или NK-клеток), которые совместно экспрессируют полипептид, модулирующий цикл Кребса, и полипептид химерного рецептора, такие как описанные в данном документе, и необязательно терапевтический агент или терапевтический агент, конъюгированный с меткой.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем документе набор содержит иммунные клетки, экспрессирующие полипептид, модулирующий цикл Кребса, и экспрессирующие химерный рецепторный полипептид, которые размножаются *in vitro*, и антитело, специфичное к антигену на поверхности клетки, который присутствует на активированных Т-клетках, например анти-CD5 антитело, анти-CD38 антитело или анти-

CD7 антитело. Иммунные клетки, экспрессирующие полипептид, модулирующий цикл Кребса, и экспрессирующие полипептид химерного рецептора, могут экспрессировать любую из полипептидных конструкций химерного рецептора, известных в данной области или описанных в данном документе.

Альтернативно, описанный в данном документе набор может содержать нуклеиновую кислоту или набор нуклеиновых кислот, как описано в данном документе, которые в совокупности кодируют любой из полипептидов химерного рецептора и любой из полипептидов, модулирующих цикл Кребса, которые также описаны в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления набор может дополнительно содержать инструкции по применению любого из описанных в данном документе способов. Включенные инструкции могут содержать описание введения первой и второй фармацевтических композиций субъекту для достижения намеченной активности, *например*, ингибирования роста клеток-мишеней у субъекта и/или усиления роста и/или пролиферации иммунных клеток в среде с низким содержанием глюкозы, в среде с низким содержанием аминокислот (*например*, среде с низким содержанием глутамина), в среде с низким pH и/или гипоксической среде (*например*, с низким содержанием глюкозы, низким содержанием аминокислот, низким pH или гипоксическом микроокружении опухоли). Набор может дополнительно содержать описание выбора субъекта, подходящего для лечения, на основе определения того, нуждается ли субъект в лечении. В некоторых вариантах осуществления инструкции содержат описание введения популяции генетически сконструированных иммунных клеток и, необязательно, описание введения терапевтического агента, конъюгированного с меткой.

Инструкции, относящиеся к применению иммунных клеток и, необязательно, терапевтического агента, конъюгированного с меткой, как описано в данном документе, обычно содержат информацию о дозировке, схеме введения доз и пути введения предполагаемого лечения. Контейнеры могут быть стандартными дозами, упаковками со множеством доз (*например*, многодозовыми упаковками) или частичными дозами. Инструкции, поставляемые в наборах по изобретению, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или листке-вкладыше. Этикетка или листок-вкладыш указывают, что фармацевтические композиции применяются для лечения, задержки начала и/или облегчения заболевания или расстройства у субъекта.

Предлагаемые в данном документе наборы находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку и т.п., но не ограничивается этим. Также предусмотрены упаковки для применения в комбинации с конкретным устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения или устройство для инфузии. Набор может иметь стерильный порт доступа (*например*, контейнер может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций). Контейнер может также иметь порт для стерильного доступа. По крайней мере, один

активный агент во второй фармацевтической композиции представляет собой антитело, как описано в данном документе. По меньшей мере один активный агент в первой фармацевтической композиции представляет собой популяцию иммунных клеток (*например*, Т-лимфоцитов или НК-клеток), которые экспрессируют полипептид химерного рецептора и полипептид, модулирующий цикл Кребса, как описано в данном документе.

Наборы необязательно могут содержать дополнительные компоненты, такие как буферы и интерпретирующую информацию. Обычно набор включает контейнер и этикетку или листок-вкладыш(и) на контейнере или связанные с ним. В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены изделия, содержащие содержимое наборов, описанных выше.

Общие техники

В практическом применении настоящего изобретения будут использоваться, если не указано иное, обычные методы молекулярной биологии (включая рекомбинантные методы), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области. Такие методы полностью описаны в литературе, например в *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed. 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1989) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds. 1993-8) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds. 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis, et al., eds. 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practice approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds. Harwood Academic Publishers, 1995); *DNA Cloning: A practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds.(1985»; *Transcription and Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984»; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986»; *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, (1986»; and B. Perbal, *A practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.).

Без дальнейшего уточнения считается, что специалист в данной области может, основываясь на приведенном выше описании, использовать настоящее изобретение в его

самом полном объеме. Таким образом, следующие ниже конкретные варианты осуществления следует воспринимать как просто иллюстративные, а не как ограничивающие остальную часть изобретения каким-либо образом. Все публикации, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки для целей или объекта изобретения, упомянутых в данном документе.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Влияние экспрессии полипептида, модулирующего цикл Кребса, на функцию Т-клеток в средах с низким содержанием глюкозы.

Трансген полипептида, модулирующего цикл Кребса, совместно экспрессируется в одной Т-клетке с полипептидом АСТР. Трансген представляет собой, например, PHGDG, PCK1, IDH1, IDH1, MDH1, MDH2, GOT1, GOT2, PSAT1, GDH1, GPT1 или GLS (*например*, SEQ ID NO: 81-92). Т-клетки трансдуцируются вирусом, кодирующим полипептид АСТР и полипептид импорта глюкозы, разделенные, например, последовательностью проскока рибосомы Р2А. Т-клетки смешивают при заданном соотношении эффектор-мишень (Е:Т) с опухолевыми клетками-мишенями, такими как клетки IGROV-1, и антителом, нацеленным на опухоль, таким как анти-FOLR1 антитело. Затем реакционные смеси инкубируют при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение определенного периода времени (*например*, 6-8 дней) при различных исходных концентрациях глюкозы (*например*, 0-20 мМ). Затем оценивают функцию Т-клеток, например, с использованием тестов на продукцию цитокинов или пролиферации Т-клеток, или на устойчивость к хронической стимуляции. Продукция цитокинов (*например*, IL-2 и/или IFN-гамма) измеряется в реакционном супернатанте. Для экспериментов по пролиферации совместные культуры собирают и окрашивают анти-CD3 антителом и красителем для определения живых/мертвых клеток. Количество живых CD3-положительных клеток оценивается с помощью проточной цитометрии как мера пролиферации Т-клеток. Т-клетки, экспрессирующие полипептид, модулирующий цикл Кребса, в дополнение к полипептиду АСТР, демонстрируют повышенную функцию Т-клеток по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только АСТР, включая, например, повышенную продукцию цитокинов или усиленную пролиферацию. Эта улучшенная функция может быть более выраженной при более низких концентрациях глюкозы. Эти эксперименты демонстрируют, что экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, в Т-клетках оказывает положительное влияние на активность Т-клеток.

Пример 2: Влияние экспрессии гена полипептида, модулирующего цикл Кребса, на функцию Т-клеток в средах с более высокими концентрациями растворимого ингибитора.

Трансген полипептида, модулирующего цикл Кребса, совместно экспрессируется в одной Т-клетке с полипептидом АСТР. Трансген представляет собой, например, PHGDG, PCK1, IDH1, IDH1, MDH1, MDH2, GOT1, GOT2, PSAT1, GDH1, GPT1 или GLS (*например*, SEQ ID NO: 81-92). Т-клетки трансдуцируются вирусом, кодирующим полипептид АСТР и полипептид, модулирующий цикл Кребса, разделенные, например,

последовательностью проскока рибосомы P2A. Трансдуцированные Т-клетки смешивают при заданном соотношении эффектор-мишень (Е:Т) с опухолевыми клетками-мишенями, такими как клетки IGROV-1, и антителом, нацеленным на опухоль, таким как анти-FOLR1 антитело, в средах, содержащих различные концентрации растворимых ингибиторов, которые присутствуют в микроокружении опухоли (*например*, TGF-бета, PGE₂, кинуренин и/или аденозин). Затем реакционные смеси инкубируют при 37 °С в инкубаторе с 5% CO₂ в течение определенного периода времени (*например*, 6-8 дней). Затем оценивают функцию Т-клеток, например, с использованием тестов на продукцию цитокинов или пролиферации Т-клеток, или на устойчивость к хронической стимуляции. Продукция цитокинов (*например*, IL-2 и/или IFN-гамма) измеряется в реакционном супернатанте. Для экспериментов по пролиферации совместные культуры собирают и окрашивают анти-CD3 антителом и красителем для определения живых/мертвых клеток. Количество живых CD3-положительных клеток оценивается с помощью проточной цитометрии как мера пролиферации Т-клеток. Т-клетки, экспрессирующие полипептид, модулирующий цикл Кребса, в дополнение к полипептиду ACTR, демонстрируют повышенную функцию Т-клеток по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только ACTR, включая, например, повышенную продукцию цитокинов или усиленную пролиферацию. Эта улучшенная функция может быть достигнута при более высоких концентрациях растворимого ингибитора. Эти эксперименты демонстрируют, что экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, в Т-клетках оказывает положительное влияние на активность Т-клеток.

Пример 3: Влияние экспрессии полипептида, модулирующего цикл Кребса, на функцию Т-клеток в среде с большим присутствием иммуносупрессивных клеток.

Трансген полипептида, модулирующего цикл Кребса, совместно экспрессируется в одной Т-клетке с полипептидом ACTR. Трансген представляет собой, например, PHGDG, PCK1, IDH1, IDH1, MDH1, MDH2, GOT1, GOT2, PSAT1, GDH1, GPT1 или GLS (*например*, SEQ ID NO: 81-92). Т-клетки трансдуцируются вирусом, кодирующим полипептид ACTR и полипептид, модулирующий цикл Кребса, разделенные, например, последовательностью проскока рибосомы P2A. Трансдуцированные Т-клетки смешивают при заданном соотношении эффектор-мишень (Е:Т) с опухолевыми клетками-мишенями, такими как клетки IGROV-1, и нацеленными на опухоль антителами, такими как анти-FOLR1 антитело, в присутствии иммуносупрессивных клеток (*например*, супрессорных клеток миелоидного происхождения и/или регуляторных Т-клеток). Затем реакционные смеси инкубируют при 37°С в инкубаторе с 5% CO₂ в течение определенного периода времени (*например*, 3-10 дней). Затем оценивают функцию Т-клеток, например, с использованием тестов на продукцию цитокинов или пролиферации Т-клеток, или на устойчивость к хронической стимуляции. Продукция цитокинов (*например*, IL-2 и/или IFN-гамма) измеряется в реакционном супернатанте. Для экспериментов по пролиферации совместные культуры собирают и окрашивают анти-CD3 антителом и красителем для определения живых/мертвых клеток. Количество живых CD3-положительных клеток

оценивается с помощью проточной цитометрии как мера пролиферации Т-клеток. Т-клетки, экспрессирующие полипептид, модулирующий цикл Кребса, в дополнение к полипептиду ACTR, демонстрируют повышенную функцию Т-клеток по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только ACTR, включая, например, повышенную продукцию цитокинов или усиленную пролиферацию. Эта улучшенная функция может быть достигнута в присутствии повышенных количеств (*например*, большего количества или процента) иммуносупрессивных клеток. Эти эксперименты демонстрируют, что экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, в Т-клетках оказывает положительное влияние на активность Т-клеток.

Пример 4: Влияние экспрессии полипептида, модулирующего цикл Кребса, на функцию Т-клеток на моделях опухолей.

Трансген полипептида, модулирующего цикл Кребса, совместно экспрессируется в одной Т-клетке с полипептидом ACTR. Трансген представляет собой, например, PHGDG, PCK1, IDH1, IDH1, MDH1, MDH2, GOT1, GOT2, PSAT1, GDH1, GPT1 или GLS (*например*, SEQ ID NO: 81-92). Т-клетки трансдуцируются вирусом, кодирующим полипептид ACTR и полипептид, модулирующий цикл Кребса, разделенные, например, последовательностью проскока рибосомы P2A. Трансдуцированные Т-клетки оценивают на противоопухолевую активность в мышинных опухолевых моделях. Для этих экспериментов линия опухолевых клеток, например IGROV-1, инокулируется в мышей NSGTM (NOD scid gamma, NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ, штамм 005557). Затем мышам с опухолью вводят дозу нацеленного на опухоль антитела и Т-клеток, экспрессирующих только ACTR или ACTR и полипептид, модулирующий цикл Кребса. Рост опухоли отслеживают на протяжении всего эксперимента. В комбинации с нацеленным на опухоль антителом Т-клетки, экспрессирующие полипептид, модулирующий цикл Кребса, в дополнение к полипептиду ACTR, проявляют повышенную противоопухолевую активность по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только полипептид ACTR. Кроме того, в комбинации с нацеленным на опухоль антителом Т-клетки, экспрессирующие полипептид, модулирующий цикл Кребса, в дополнение к полипептиду ACTR, могут проявлять повышенную активность Т-клеток, включая, например, усиленную пролиферацию, повышенную устойчивость Т-клеток и/или повышенную продукцию цитокинов по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только полипептид ACTR. Эти эксперименты демонстрируют, что экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, в Т-клетках, экспрессирующих ACTR, оказывает положительное влияние на функцию Т-клеток *in vivo*.

Пример 5: Влияние пониженных концентраций глюкозы на функцию Т-клеток

Гамма-ретровирус, кодирующий примерную конструкцию экспрессии CAR, нацеленную на GPC3, с SEQ ID NO: 104, был получен с помощью рекомбинантной технологии и использован для инфицирования первичных Т-клеток человека с целью получения клеток, которые экспрессируют на своей клеточной поверхности полипептид

CAR, нацеленный на GPC3. Затем использовали шестидневный анализ пролиферации на основе проточной цитометрии для проверки функциональности клеток, экспрессирующих CAR, нацеленный на GPC3. В частности, 200000 нетрансдуцированных контрольных Т-клеток или Т-клеток, экспрессирующих конструкцию CAR, нацеленную на GPC3, инкубировали вместе в соотношении 4:1 (эффекторные клетки/CAR-экспрессирующие Т-клетки к клеткам-мишеням) с 50000 клеток либо гепатоцеллюлярной карциномы JHH7 GPC3+, либо опухоли Нер3В. Совместную культуру инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение шести дней в присутствии разных концентраций глюкозы. По истечении шести дней совместные культуры собирали и окрашивали анти-CD3 антителом. Количество CD3-положительных клеток оценивали с помощью проточной цитометрии как меру пролиферации Т-клеток. При более низких концентрациях глюкозы наблюдалась меньшая пролиферация CAR-Т (Фиг. 1). Эти эксперименты демонстрируют, что среда с низким содержанием глюкозы может оказывать негативное влияние на активность пролиферации CAR-Т-клеток.

Пример 6: Влияние экспрессии гена, модулирующего цикл Кребса, на функцию Т-клеток с использованием конструкции экспрессии CAR-Т, нацеленной на GPC3

Гамма-ретровирус, кодирующий примерную конструкцию для экспрессии полипептида CAR, нацеленного на GPC3 (SEQ ID NO: 104), был получен с помощью рекомбинантной технологии и использован для инфицирования первичных Т-клеток человека с целью создания клеток, экспрессирующих на своей клеточной поверхности полипептид CAR, нацеленный на GPC3. Кроме того, гамма-ретровирусы, кодирующие примерный полипептид CAR, нацеленный на GPC3, и полипептид, модулирующий цикл Кребса (GOT1 или GOT2) (SEQ ID NO: 87 и 88, соответственно), были созданы с помощью рекомбинантной технологии и использованы для инфицирования первичных Т-клеток человека с целью создания клеток, которые экспрессировали полипептид, нацеленный на GPC3, и полипептид, модулирующий цикл Кребса. В конструкциях, кодирующих как полипептид CAR, так и полипептид, модулирующий цикл Кребса, два полипептида были разделены последовательностью проскока рибосомы Р2А. Экспрессируемыми вариантами были анти-GPC3 CAR+GOT1 и анти-GPC3 CAR+GOT2. Затем использовали шестидневный анализ пролиферации на основе проточной цитометрии для проверки функциональности клеток, экспрессирующих CAR, нацеленный на GPC3. В частности, 200000 нетрансдуцированных контрольных Т-клеток, Т-клеток, экспрессирующих полипептид CAR, нацеленный на GPC3, или Т-клеток, экспрессирующих полипептид CAR, нацеленный на GPC3, и полипептид, модулирующий цикл Кребса, инкубировали вместе в соотношении 4:1 (эффекторные Т-клетки, экспрессирующие CAR, к клеткам-мишеням) с 50000 опухолевых клеток гепатоцеллюлярной карциномы JHH7 GPC3⁺. Совместную культуру инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение шести дней в присутствии 1,25 mM глюкозы (релевантной для опухоли) и 10 mM глюкозы (приблизительные уровни в периферической крови). По

истечении шести дней совместные культуры собирали и окрашивали анти-CD3 антителом.

Количество CD3-положительных клеток оценивали с помощью проточной цитометрии как меру пролиферации Т-клеток. Т-клетки, экспрессирующие полипептиды, модулирующие цикл Кребса, в дополнение к полипептиду CAR, продемонстрировали усиленную пролиферацию Т-клеток по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только конструкцию CAR (Фиг. 2А, 2В, 3А и 3В). Эта усиленная пролиферация также происходила при низких концентрациях глюкозы, релевантных для опухоли. Эти эксперименты продемонстрировали, что экспрессия полипептидов, модулирующих цикл Кребса, в Т-клетках оказывает положительное влияние на активность пролиферации CAR-Т-клеток.

Пример 7: Влияние экспрессии гена, модулирующего цикл Кребса, на функцию Т-лимфоцитов в среде с более низким содержанием глюкозы

Трансген, модулирующий цикл Кребса, совместно экспрессируется в одной Т-клетке с полипептидом химерного антигенного рецептора (CAR). Трансген представляет собой, например, GPT1, GLS, PCK1, GOT1, GOT2, IDH1, IDH2, MDH1, MDH2, PHGDH, PSAT1 или GDH1 (*например* SEQ ID NO: 81-92). Т-клетки трансдуцируются вирусом, кодирующим полипептид CAR и полипептид, модулирующий метаболит цикла Кребса, разделенные, например, последовательностью проскока рибосомы P2A. Т-клетки смешивают при заданном соотношении эффектор-мишень (Е:Т) с опухолевыми клетками-мишенями, такими как клетки НерG2. Затем реакционные смеси инкубируют при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение определенного периода времени (*например*, 6-8 дней) при различных исходных концентрациях глюкозы (*например*, 0-20 мМ). Затем оценивают функцию Т-клеток, например, с использованием тестов на продукцию цитокинов или пролиферации Т-клеток. Продукция цитокинов (*например*, IL-2 и/или IFN-гамма) измеряется в реакционном супернатанте. Для экспериментов по пролиферации совместные культуры собирают и окрашивают анти-CD3 антителом и красителем для определения живых/мертвых клеток. Количество живых CD3-положительных клеток оценивается с помощью проточной цитометрии как мера пролиферации Т-клеток.

Ожидается, что Т-клетки, экспрессирующие полипептид, модулирующий цикл Кребса, в дополнение к полипептиду CAR, будут демонстрировать повышенную функцию Т-клеток по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR, включая, например, повышенную продукцию цитокинов или усиленную пролиферацию. Эта улучшенная функция может быть более выраженной при более низких концентрациях глюкозы.

Пример 8: Влияние экспрессии гена, модулирующего цикл Кребса, на функцию Т-клеток в средах с более высокими концентрациями растворимого ингибитора

Трансген, модулирующий цикл Кребса, совместно экспрессируется в одной Т-клетке с полипептидом химерного антигенного рецептора (CAR). Трансген представляет собой, например, GPT1, GLS, PCK1, GOT1, GOT2, IDH1, IDH2, MDH1, MDH2, PHGDH,

PSAT1 или GDH1 (*например* SEQ ID NO: 81-92). Т-клетки трансдуцируются вирусом, кодирующим полипептид CAR и полипептид, модулирующий цикл Кребса, разделенные, например, последовательностью проскока рибосомы P2A. Трансдуцированные Т-клетки смешивают при заданном соотношении эффектор-мишень (Е:Т) с опухолевыми клетками-мишенями, такими как клетки НерG2, в средах, содержащих различные концентрации растворимых ингибиторов, которые присутствуют в микроокружении опухоли (*например*, TGF-бета, PGE₂ и/или аденозин). Затем реакционные смеси инкубируют при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение определенного периода времени (*например*, 6-8 дней). Затем оценивают функцию Т-клеток, например, с использованием тестов на продукцию цитокинов или пролиферации Т-клеток. Продукция цитокинов (*например*, IL-2 и/или IFN-гамма) измеряется в реакционном супернатанте. Для экспериментов по пролиферации совместные культуры собирают и окрашивают анти-CD3 антителом и красителем для определения живых/мертвых клеток. Количество живых, CD3-положительных клеток оценивают методом проточной цитометрии как меру пролиферации Т-клеток.

Ожидается, что Т-клетки, экспрессирующие полипептид, модулирующий цикл Кребса, в дополнение к полипептиду CAR, будут демонстрировать повышенную функцию Т-клеток по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR, включая, например, повышенную продукцию цитокинов или усиленную пролиферацию. Эта улучшенная функция может быть достигнута при более высоких концентрациях растворимого ингибитора.

Пример 9: Влияние экспрессии гена, модулирующего цикл Кребса, на функцию Т-клеток в среде с большим присутствием иммуносупрессивных клеток

Трансген, изменяющий метаболит цикла Кребса, совместно экспрессируется в одной Т-клетке с полипептидом химерного антигенного рецептора (CAR). Трансген представляет собой, например, GPT1, GLS, PCK1, GOT1, GOT2, IDH1, IDH2, MDH1, MDH2, PHGDH, PSAT1 или GDH1 (*например* SEQ ID NO: 81-92). Т-клетки трансдуцируются вирусом, кодирующим полипептид CAR и полипептид, изменяющий метаболит цикла Кребса, разделенные, например, последовательностью проскока рибосомы P2A. Трансдуцированные Т-клетки смешивают при заданном соотношении эффектор-мишень (Е:Т) с опухолевыми клетками-мишенями, такими как клетки НерG2, в присутствии иммуносупрессорных клеток (*например*, супрессорных клеток миелоидного происхождения и/или регуляторных Т-клеток), помеченных флуоресцентной меткой. Затем реакционные смеси инкубируют при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение определенного периода времени (*например*, 3-10 дней). Затем оценивают функцию Т-клеток, например, с использованием тестов на продукцию цитокинов или пролиферации Т-клеток. Продукция цитокинов (*например*, IL-2 и/или IFN-гамма) измеряется в реакционном супернатанте. Для экспериментов по пролиферации совместные культуры собирают и окрашивают анти-CD3 антителом и красителем для определения живых/мертвых клеток. Количество живых CD3-положительных немеченых клеток оценивается с помощью проточной цитометрии как мера пролиферации Т-клеток.

Ожидается, что Т-клетки, экспрессирующие полипептид, модулирующий цикл Кребса, в дополнение к полипептиду CAR, будут демонстрировать повышенную функцию Т-клеток по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR, включая, например, повышенную продукцию цитокинов или усиленную пролиферацию. Эта улучшенная функция может быть достигнута в присутствии повышенных количеств (*например*, большего количества или процента) иммуносупрессивных клеток.

Пример 10: Влияние экспрессии полипептида, модулирующего цикл Кребса, на функцию Т-клеток в модели опухоли мышей с использованием конструкции экспрессии CAR-T, нацеленной на GPC3

Полипептид, модулирующий цикл Кребса (GOT2) (SEQ ID NO: 88), совместно экспрессировали в одних Т-клетках с полипептидом CAR-T, нацеленным на GPC3 (SEQ ID NO: 104). Гамма-ретровирус, кодирующий конструкцию экспрессии CAR-T, нацеленного на GPC3, был создан и использован для инфицирования первичных Т-клеток человека с целью создания клеток, которые экспрессировали на своей клеточной поверхности CAR-T, нацеленный на GPC3. Т-клетки также трансдуцировали вирусом, кодирующим полипептид CAR против GPC3, и GOT2, разделенные последовательностью проскока рибосомы P2A.

CAR-трансдуцированные Т-клетки оценивали на противоопухолевую активность на модели опухоли мышей. Для этих экспериментов линия опухолевых клеток гепатоцеллюлярной карциномы, JHH7, была инокулирована мышам NSGTM (NOD scidgamma, NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rg^{tmWj1}/SzJ, штамм 005557). Лечение Т-клетками, экспрессирующими CAR против GPC3, начинали, когда объем опухоли достигал приблизительно 50 мм³ (8 день после инокуляции). Мышей рандомизировали в группы лечения по 5 мышей в каждой на основании объема опухоли и лечили Т-клетками, экспрессирующими CAR, нацеленный на GPC3, в дозе 5×10^6 CAR+ Т-клеток в 8 и 15 дни после инокуляции. Общая доза Т-клеток варьировалась в зависимости от эффективности трансдукции CAR каждой конструкции.

Объем опухоли и вес тела измеряли два-три раза в неделю на протяжении всего эксперимента. CAR-Т-клетки, совместно экспрессирующие GOT2, продемонстрировали повышенную противоопухолевую эффективность по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только конструкцию CAR GPC3 (Фиг. 4). Эти эксперименты продемонстрировали, что экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, в клетках CAR-T оказывает положительное влияние на противоопухолевую эффективность клеток CAR-T в мышинной модели ксенотрансплантата гепатоцеллюлярной карциномы.

CAR-трансдуцированные Т-клетки оценивали на противоопухолевую активность на модели опухоли мышей. Для этих экспериментов линия опухолевых клеток гепатоцеллюлярной карциномы, Hep3B, была инокулирована мышам NSGTM (NOD scidgamma, NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rg^{tmWj1}/SzJ, штамм 005557). Лечение Т-клетками, экспрессирующими CAR против GPC3, начинали, когда объем опухоли достигал приблизительно 100 мм³ (20 день после инокуляции). Мышей рандомизировали в группы

лечения по 5 мышей в каждой на основании объема опухоли и лечили Т-клетками, экспрессирующими CAR, нацеленный на GPC3, в дозе 1×10^6 CAR+ Т-клеток в 20 и 27 дни после инокуляции. Общая доза Т-клеток варьировалась в зависимости от эффективности трансдукции CAR каждой конструкции.

Объем опухоли и вес тела измеряли два-три раза в неделю на протяжении всего эксперимента. CAR-Т-клетки, совместно экспрессирующие GOT2, продемонстрировали повышенную противоопухолевую эффективность по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только конструкцию CAR GPC3 (Фиг. 6). Эти эксперименты продемонстрировали, что экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, в клетках CAR-Т оказывает положительное влияние на противоопухолевую эффективность клеток CAR-Т в мышинной модели ксенотрансплантата гепатоцеллюлярной карциномы.

CAR-трансдуцированные Т-клетки оценивали на противоопухолевую активность на модели опухоли мышей. Для этих экспериментов линия опухолевых клеток мелкоклеточного рака легких, NCI-H446, была инокулирована мышам NSGTM (NOD scidgamma, NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rg^{tmWj1}/SzJ, штамм 005557). Лечение Т-клетками, экспрессирующими CAR против GPC3, начинали, когда объем опухоли достигал приблизительно 100 мм³ (18 день после инокуляции). Мышей рандомизировали в группы лечения по 5 мышей в каждой на основании объема опухоли и лечили Т-клетками, экспрессирующими CAR, нацеленный на GPC3, в дозе 5×10^6 CAR+ Т-клеток в 18 и 25 дни после инокуляции. Общая доза Т-клеток варьировалась в зависимости от эффективности трансдукции CAR каждой конструкции.

Объем опухоли и вес тела измеряли два-три раза в неделю на протяжении всего эксперимента. CAR-Т-клетки, совместно экспрессирующие GOT2, продемонстрировали повышенную противоопухолевую эффективность по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только конструкцию CAR GPC3 (Фиг. 5). Эти эксперименты продемонстрировали, что экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, в клетках CAR-Т оказывает положительное влияние на противоопухолевую эффективность клеток CAR-Т в мышинной модели ксенотрансплантата мелкоклеточного рака легких.

Пример 11: Влияние экспрессии полипептида, модулирующего цикл Кребса, на размножение Т-клеток в модели опухоли мышей с использованием конструкции экспрессии CAR-Т, нацеленной на GPC3

Полипептид, модулирующий цикл Кребса (GOT2) (SEQ ID NO: 88), совместно экспрессировали в одних Т-клетках с полипептидом CAR-Т, нацеленным на GPC3 (SEQ ID NO: 104). Гамма-ретровирус, кодирующий конструкцию экспрессии CAR-Т, нацеленного на GPC3, был создан и использован для инфицирования первичных Т-клеток человека с целью создания клеток, которые экспрессировали на своей клеточной поверхности CAR-Т, нацеленный на GPC3. Т-клетки также трансдуцировали вирусом, кодирующим полипептид CAR против GPC3, и GOT2, разделенные последовательностью проскока рибосомы P2A.

CAR-трансдуцированные Т-клетки оценивали на предмет размножения на модели

опухоли мышей. Для этих экспериментов линия опухолевых клеток гепатоцеллюлярной карциномы, Hep3B, была инокулирована мышам NSGTM (NOD scidgamma, NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rg^{tmWjl}/SzJ, штамм 005557). Лечение Т-клетками, экспрессирующими CAR против GPC3, начинали, когда объем опухоли достигал приблизительно 100 мм³ (20 день после инокуляции). Мышей рандомизировали в группы лечения по 5 мышей в каждой на основании объема опухоли и лечили Т-клетками, экспрессирующими CAR, нацеленный на GPC3, в дозе 1×10^6 CAR+ Т-клеток в 20 и 27 дни после инокуляции. Общая доза Т-клеток варьировалась в зависимости от эффективности трансдукции CAR каждой конструкции.

Периферическую кровь собирали и окрашивали анти-CD3 и анти-CAR антителами. Количество CD3-положительных и CAR-положительных клеток оценивали с помощью проточной цитометрии как меру размножения Т-клеток и активности CAR. CAR-Т-клетки, совместно экспрессирующие GOT2, продемонстрировали повышенное размножение Т-клеток по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только конструкцию CAR GPC3 (Фиг. 7). Эти эксперименты продемонстрировали, что экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, в клетках CAR-Т оказывает положительное влияние на размножение клеток CAR-Т в мышинной модели ксенотрансплантата гепатоцеллюлярной карциномы.

Пример 12: Совместная экспрессия гена, модулирующего цикл Кребса (GOT2), и CAR, нацеленного на GPC3, в Т-клетках увеличивает активность фермента аспаратаминотрансферазы

Гамма-ретровирус, кодирующий примерную конструкцию для экспрессии полипептида CAR, нацеленного на GPC3 (SEQ ID NO: 104), был получен с помощью рекомбинантной технологии и использован для инфицирования первичных Т-клеток человека с целью создания клеток, экспрессирующих на своей клеточной поверхности полипептид CAR, нацеленный на GPC3. Кроме того, гамма-ретровирус, кодирующий примерный полипептид CAR, нацеленный на GPC3, и полипептид, модулирующий цикл Кребса (GOT2) (SEQ ID NO: 88), был получен с помощью рекомбинантной технологии и использован для инфицирования первичных Т-клеток человека с целью создания клеток, которые экспрессировали полипептид, нацеленный на GPC3, и GOT2, с двумя полипептидами, разделенными последовательностью проскока рибосомы P2A. Экспрессию GOT2 подтверждали с помощью вестерн-блоттинга. CAR-трансдуцированные Т-клетки смешивали в соотношении эффектор-мишень 4:1 с опухолевыми клетками гепатоцеллюлярной карциномы GPC3+Hep3B и инкубировали при 37 °C, 5% CO₂ в течение 4 дней. После инкубации клеточные лизаты получали из 1×10^6 клеток, клеточный лизат объединяли с буфером для образцов Bolt LDS (Invitrogen) и 100 нМ DTT и прогоняли на двух отдельных гелях. Затем белки из гелей переносили на нитроцеллюлозные мембраны (упаковка для переноса Transblot Turbo от BioRad). Блоты зондировали в течение ночи на предмет экспрессии GOT2 с использованием кроличьих антител к GOT2 человека (Origene), а затем зондировали с помощью конъюгированного с

HRP анти-кроличьего антитела, или на предмет экспрессии GAPDH с использованием мышиных антител к GAPDH человека (Biolegend), а затем зондировали конъюгированного с HRP вторичного антитела к IgG мыши. Экспрессия GOT2 была выше в Т-клетках, трансдуцированных конструкцией CAR+GOT2, по сравнению с исходным CAR (Фиг. 8А).

Трансдуцированные Т-клетки смешивали в соотношении эффектор-мишень 4:1 с опухолевыми клетками гепатоцеллюлярной карциномы GPC3+Hep3В и инкубировали при 37 °С, 5% CO₂ в течение 8 дней. Активность фермента аспартатаминотрансферазы (AST) измеряли с использованием набора для анализа активности аспартатаминотрансферазы (Abcam) в соответствии с протоколом производителя. Активность AST рассчитывается путем измерения количества глутамата, генерируемого за минуту при 37 °С. В этом примере активность AST рассчитывалась через 50 минут после добавления субстрата. Т-клетки, экспрессирующие полипептид GOT2, модулирующий цикл Кребса, в дополнение к полипептиду CAR, демонстрировали повышенную активность AST после активации опухолевыми клетками. (Фиг. 8В). Эти эксперименты демонстрируют, что экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, в Т-клетках оказывает положительное влияние на функцию Т-клеток.

Пример 13: Совместная экспрессия гена, модулирующего цикл Кребса (GOT2), и либо CAR, нацеленного на GPC3, либо ACTR в Т-клетках усиливает пролиферацию

Полипептид, модулирующий цикл Кребса (GOT2) (SEQ ID NO: 10), совместно экспрессировали в одних Т-клетках с полипептидом CAR-Т, нацеленным на GPC3 (SEQ ID NO: 1). Т-клетки трансдуцировали вирусом, кодирующим только полипептид CAR или CAR и GOT2, разделенные последовательностью проскока рибосомы Р2А. Т-клетки, экспрессирующие CAR, нацеленный на GPC3, и совместно экспрессирующие GPC3-CAR и GOT2, были помечены клеточным красителем фиолетового цвета, флуоресцентно меченными клеточными белками, а затем смешаны в соотношении эффектор-мишень 2:1 с опухолевыми клетками гепатоцеллюлярной карциномы GPC3+Hep3В. На 6 день после активации клетки окрашивали анти-CD3 антителом и измеряли разведение клеточного красителя фиолетового цвета методом проточной цитометрии на 6 день после активации для измерения пролиферации. Средняя интенсивность флуоресценции CD3+-клеток Т-клеток, совместно экспрессирующих CAR и GOT2, была выражена по отношению к средней интенсивности обратной флуоресценции Т-клеток, экспрессирующих только CAR. Т-клетки, экспрессирующие GOT2 в сочетании с полипептидом CAR, демонстрировали повышенное деление клеток по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR. Фигура 9А

Полипептид, модулирующий цикл Кребса (GOT2) (SEQ ID NO: 10), совместно экспрессировали в одних Т-клетках с полипептидом ACTR (SEQ ID NO: 1). Т-клетки трансдуцировали вирусом, кодирующим только полипептид ACTR или ACTR и GOT2, разделенные последовательностью проскока рибосомы Р2А. Т-клетки, экспрессирующие

ACTR и совместно экспрессирующие ACTR и GOT2, смешивали при соотношении эффектор-мишень 2:1 с опухолевыми клетками гепатоцеллюлярной карциномы GPC3+HepG2 и 1 мкг/мл анти-GPC3 антитела GC33 (см. Nakano, K et al. *Anticancer Drugs*. 2010 Nov; 21(10):907-16). На 3 день после активации количество Т-клеток измеряли с помощью проточной цитометрии после окрашивания анти-CD3 антителом. Общее количество CD3+-клеток Т-клеток, совместно экспрессирующих ACTR и GOT2, выражали относительно общего количества CD3+ Т-клеток Т-клеток, экспрессирующих только ACTR. Т-клетки, экспрессирующие GOT2 в дополнение к полипептиду ACTR, продемонстрировали увеличение количества Т-клеток. Фиг. 9В.

Эти эксперименты демонстрируют, что экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, в Т-клетках оказывает положительное влияние на пролиферацию Т-клеток.

Пример 14: Совместная экспрессия гена, модулирующего цикл Кребса (GOT2), и либо CAR, нацеленного на GPC3, либо ACTR в Т-клетках усиливает продукцию цитокинов IL-17A

Полипептид, модулирующий цикл Кребса (GOT2) (SEQ ID NO: 88), совместно экспрессировался в Т-клетках с полипептидом CAR-T, нацеленным на GPC3 (SEQ ID NO: 104), или совместно экспрессировался Т-клетками с полипептидом ACTR-4-1BB (SEQ ID NO: 1) или полипептидом ACTR-CD28 (SEQ ID NO: 57). Т-клетки трансдуцировали вирусом, кодирующим только полипептид CAR или ACTR, или CAR или ACTR и GOT2, разделенных последовательностью проскока рибосомы P2A. Трансдуцированные Т-клетки смешивали в соотношении эффектор-мишень 2:1 с опухолевыми клетками гепатоцеллюлярной карциномы GPC3+HepG2; в экспериментах с ACTR-Т-клетками добавляли анти-GPC3 антитело GC33 (1 мкг/мл). Клетки инкубировали в течение 24 часов при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. После инкубации собирали 100 мкл супернатанта клеточной культуры и определяли уровень IL-17A с помощью ИФА MSD (Meso Scale Discovery, Pacific BioLabs) в соответствии с инструкциями производителя. Продукция IL-17A представлена в зависимости от конструкции экспрессии (Фиг. 10А-10С). Т-клетки, совместно экспрессирующие полипептиды GOT2 и CAR (Фиг. 10А) или ACTR (Фиг. 10В-10С), продемонстрировали повышенную способность продуцировать IL-17A по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR или ACTR. Эти эксперименты демонстрируют, что экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, в Т-клетках оказывает положительное влияние на продукцию цитокинов IL-17A.

Пример 15: Совместная экспрессия гена, модулирующего цикл Кребса (GOT2), и либо CAR, нацеленного на GPC3, либо ACTR усиливает полифункциональность CD4+ Т-клеток

Полипептид, модулирующий цикл Кребса (GOT2) (SEQ ID NO: 88), совместно экспрессировался в одних Т-клетках с полипептидом CAR-T, нацеленным на GPC3 (SEQ ID NO: 104), или совместно экспрессировался в одних Т-клетках с полипептидом ACTR, содержащим первичный костимулирующий домен либо 4-1BB (SEQ ID NO: 1), либо CD28 (SEQ ID NO: 57). Т-клетки трансдуцировали вирусом, кодирующим только полипептид

CAR или ACTR, или CAR или ACTR и GOT2, разделенных последовательностью проскока рибосомы P2A. Трансдуцированные Т-клетки смешивали в соотношении эффектор-мишень 1:1 с опухолевыми клетками гепатоцеллюлярной карциномы GPC3+HepG2; в экспериментах с ACTR Т-клетками добавляли анти-GPC3 антитело GC33 (1 мкг/мл). Клетки инкубировали в присутствии ингибиторов транспорта белка, брэфельдина А (5 мкг/мл) и монензина (2 мкМ) в течение 6 часов при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. После инкубации совместные культуры окрашивали анти-CD4 и анти-CD8 антителами на CAR и ACTR Т-клетки; ACTR Т-клетки также окрашивали анти-CD16 антителом. Затем клетки фиксировали, пермеабелизировали и окрашивали анти-IFN γ , анти-IL-2, анти-TNF α и анти-IL-17A антителами для количественной оценки продукции внутриклеточных цитокинов.

Частоту встречаемости CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих несколько цитокинов, количественно оценивали с помощью проточной цитометрии. Т-клетки, экспрессирующие GOT2 в дополнение к полипептидам CAR или ACTR, имели более высокую частоту встречаемости CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих более одного, двух или трех цитокинов одновременно, по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR или ACTR, что демонстрирует большую полифункциональность в клетках, экспрессирующих GOT2 (Фиг. 11А-11С). Эти эксперименты демонстрируют, что экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, в Т-клетках положительно влияет на полифункциональность CD4 Т-клеток.

Пример 16: Совместная экспрессия гена, модулирующего цикл Кребса (GOT2), и CAR, нацеленного на GPC3, или ACTR увеличивает частоту встречаемости CD8⁺ клеток с менее дифференцированным, подобным наивному фенотипом.

Полипептид, модулирующий цикл Кребса (GOT2) (SEQ ID NO: 88), совместно экспрессировался в одних Т-клетках с полипептидом CAR-T, нацеленным на GPC3 (SEQ ID NO: 104), или совместно экспрессировался в одних Т-клетках с полипептидом ACTR, содержащим первичный костимулирующий домен либо 4-1BB (SEQ ID NO: 1), либо CD28 (SEQ ID NO: 57). Т-клетки трансдуцировали вирусом, кодирующим только полипептид CAR или ACTR, или CAR или ACTR и GOT2, разделенных последовательностью проскока рибосомы P2A. Фенотип Т-клеток CAR-конструкций от 11 здоровых доноров и ACTR-конструкций от двух здоровых доноров оценивали с помощью проточной цитометрии. Для этих экспериментов клетки размораживали и окрашивали анти-CD3, анти-CD4, анти-CD8, анти-CD45RA, анти-CD45RO, анти-CD27 и анти-CD62L антителами на Т-клетки, экспрессирующие как CAR, так и ACTR. CAR Т-клетки также окрашивали рекомбинантным белком GPC3 для обнаружения полипептида CAR, а ACTR Т-клетки также окрашивали анти-CD16 антителом для обнаружения полипептида ACTR. Частота встречаемости CD8⁺ CAR⁺ или ACTR⁺ Т-клеток, которые окрашивались положительно на CD27, CD45RA, CD62L и отрицательно на CD45RO, была выше в Т-клетках, которые также совместно экспрессировали GOT2, по сравнению с исходными клетками того же

происхождения, демонстрируя, что клетки, экспрессирующие GOT2, имеют CD8+ популяцию, более подобную наивной (Фиг. 12A-12C). В целом фенотип CD8+ CAR или ACTR Т-клеток, совместно экспрессирующих GOT2, показывает большую долю клеток с фенотипическими маркерами менее дифференцированного (более молодого) фенотипа (CD27+/CD45RO+, CD27+/CD45RO-, CD27+/CD45RA+, CD27+/CD45RA-) относительно исходного CAR (Фиг. 13). Эти эксперименты демонстрируют, что экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, в Т-клетках оказывает положительное влияние на фенотип CD8.

Пример 17: Совместная экспрессия гена, модулирующего цикл Кребса (GOT2), и CAR, нацеленного на GPC3, в Т-клетках улучшает пролиферацию при хронической стимуляции антигеном и гипоксии

Полипептид, модулирующий цикл Кребса (GOT2) (SEQ ID NO: 88), совместно экспрессировали в одних Т-клетках с полипептидом CAR-T, нацеленным на GPC3 (SEQ ID NO: 104). Т-клетки трансдуцировали вирусом, кодирующим только полипептид CAR или CAR и GOT2, разделенные последовательностью проскока рибосомы P2A. Т-клетки, экспрессирующие CAR, нацеленный на GPC3, и Т-клетки, совместно экспрессирующие GPC3-CAR и GOT2, были помечены клеточным красителем фиолетового цвета, флуоресцентно меченными клеточными белками, а затем смешаны в соотношении эффектор-мишень 2:1 с опухолевыми клетками гепатоцеллюлярной карциномы GPC3+Hep3B. На 3 день после активации клетки промывали, а затем смешивали в соотношении эффектор-мишень 2:1 со свежими опухолевыми клетками гепатоцеллюлярной карциномы GPC3+Hep3B в качестве второй стимуляции антигеном. Клетки инкубировали в условиях нормального содержания кислорода (20% кислород) или гипоксических (1,5% кислород) условиях в течение 3 дополнительных дней, а затем окрашивали анти-CD3 антителом и измеряли разведение клеточного красителя фиолетового цвета методом проточной цитометрии для измерения пролиферации, выраженной как обратно-пропорциональное значение средней интенсивности флуоресценции клеточного красителя фиолетового цвета (MFI⁻¹). Т-клетки, экспрессирующие GOT2 в дополнение к полипептиду CAR, продемонстрировали повышенную пролиферацию при хронической стимуляции антигеном как в условиях нормального содержания кислорода, так и в гипоксических условиях (Фиг. 14), моделируя множественные стрессы микроокружения опухоли. Эти эксперименты демонстрируют, что экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, в Т-клетках обеспечивает пролиферативное преимущество в неблагоприятных условиях, присутствующих в микроокружении солидной опухоли.

Пример 18: Совместная экспрессия гена, модулирующего цикл Кребса (GOT2), и CAR, нацеленного на GPC3, в Т-клетках улучшает пролиферацию в условиях ограниченного содержания глюкозы

Полипептид, модулирующий цикл Кребса (GOT2) (SEQ ID NO: 88), совместно экспрессируется в одних Т-клетках с полипептидом CAR-T, нацеленным на GPC3,

содержащим костимулирующий домен 4-1BB (SEQ ID NO: 104) или CD28 (SEQ ID NO: 105). Т-клетки трансдуцировали вирусом, кодирующим только полипептид CAR или CAR и GOT2, разделенные последовательностью проскока рибосомы P2A. Т-клетки, трансдуцированные полипептидом CAR-T, нацеленным на GPC3, выделяли с помощью рекомбинантного белка GPC3, конъюгированного с AlexaFluor 647, и микрогранул анти-AlexaFluor647 (Miltenyi Biotec) и оставляли на ночь в RPMI+10% ФБС. Затем трансдуцированные Т-клетки были помечены клеточным красителем фиолетового цвета и смешаны в соотношении эффектор-мишень 2:1 с опухолевыми клетками гепатоцеллюлярной карциномы GPC3+HepG2. Совместные культуры инкубировали в присутствии высокого (10 мМ) или низкого (1,25 мМ) содержания глюкозы для имитации ограниченной доступности питательных веществ в микроокружении опухоли. Через 7 дней при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ клетки окрашивали анти-CD3 антителом и деление клеток оценивали по разведению клеточного красителя фиолетового цвета с помощью проточной цитометрии.

Т-клетки, совместно экспрессирующие GOT2 и полипептид CAR, демонстрировали большую пролиферацию как при 10 мМ, так и при 1,25 мМ глюкозы по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR, на что указывало снижение интенсивности флуоресценции клеточного красителя фиолетового цвета. Инверсия интенсивности флуоресценции клеточного красителя фиолетового цвета была построена в зависимости от содержания глюкозы и типа Т-клеток (Фиг. 15). Эти эксперименты демонстрируют, что экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, в Т-клетках оказывает положительное влияние на пролиферацию Т-клеток в CAR-T-клетках, которые содержат костимулирующие домены 4-1BB или CD28, в условиях высокого и низкого содержания глюкозы.

Пример 19: Совместная экспрессия гена, модулирующего цикл Кребса (GOT2), и CAR, нацеленного на GPC3, в Т-клетках улучшает пролиферацию в присутствии кинуренина, ингибитора Т-клеток.

Полипептид, модулирующий цикл Кребса (GOT2) (SEQ ID NO: 88), совместно экспрессировали в одних Т-клетках с полипептидом ACTR (SEQ ID NO: 57), содержащим первичный костимулирующий домен CD28, и сравнивали в функциональных анализах с Т-клетками, экспрессирующими только полипептид ACTR. Т-клетки трансдуцировали вирусом, кодирующим только полипептид ACTR или ACTR и GOT2, разделенные последовательностью проскока рибосомы P2A. Т-клетки смешивали в соотношении эффектор-мишень 4:1 с опухолевыми клетками карциномы яичника IGROV-1, экспрессирующими фолатный рецептор альфа (FOLR+) (фиксированные в параформальдегиде), с добавлением анти-FOLR антитела (5 мкг/мл). Совместные культуры инкубировали в течение 6 дней при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. После инкубации половину клеток переносили на новый планшет, обрабатывали BrdU (Millipore Sigma), инкубировали в течение ~ 16 часов при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ и анализировали на поглощение BrdU в соответствии с инструкциями производителя с

использованием планшет-ридера EnVision (Perkin Elmer) для обнаружения хемилюминесценции. Т-клетки, совместно экспрессирующие GOT2 и ACTR, продемонстрировали улучшенную пролиферацию, о чем свидетельствует повышенное поглощение BrdU как в отсутствие, так и в присутствии кинуренина по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только ACTR. Эти эксперименты демонстрируют, что экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, в Т-клетках обеспечивает пролиферативное преимущество в присутствии ингибирующих молекул, обнаруженных в микроокружении солидной опухоли. Фиг. 16.

Пример 20: Совместная экспрессия гена, модулирующего цикл Кребса (GOT2), и CAR, нацеленного на GPC3, в Т-клетках приводит к снижению устойчивой экспрессии ингибиторного рецептора на Т-клетках, выделенных из ксенотрансплантатов солидных опухолей GPC3+

Полипептид, модулирующий цикл Кребса (GOT2) (SEQ ID NO: 88), совместно экспрессировали в одних Т-клетках с полипептидом CAR-T, нацеленным на GPC3 (SEQ ID NO: 104). Т-клетки трансдуцировали вирусом, кодирующим только полипептид CAR или CAR и GOT2, разделенные последовательностью проскока рибосомы P2A.

Фенотип *ex vivo* CAR Т-клеток оценивали после инъекции в модель опухоли мышей. Для этих экспериментов линия опухолевых клеток гепатоцеллюлярной карциномы GPC3+, JHH7, была инокулирована мышам NSGTM (NOD scidgamma, NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rg^{tmWj1}/SzJ, штамм 005557). Лечение Т-клетками начинали, когда объем опухоли достигал приблизительно 100 мм³ (11 день после инокуляции). Мышей рандомизировали в группы лечения по 5 мышей в каждой на основании объема опухоли и лечили Т-клетками, экспрессирующими CAR, нацеленный на GPC3, или Т-клетками, совместно экспрессирующими CAR, нацеленный на GPC3, и GOT2, в дозе 5×10^6 CAR+ Т-клеток на 11 день после инокуляции.

Подкожные опухоли собирали у мышей с опухолью JHH7 на 2, 7 и 14 день после введения дозы Т-клеток. Опухоли измельчали лезвием бритвы и ферментативно расщепляли с использованием набора для диссоциации опухолей человека (Miltenyi Biotec) в течение 1 часа при 37 °C. Расщепленные опухоли пропускали через фильтр для клеток 70 мкм перед посевом в 96-луночный планшет для окрашивания клеток.

Мышей с иммунодефицитом с установленными подкожными опухолями JHH7, экспрессирующими GPC3, лечили однократной внутривенной инъекцией 5×10^6 Т-клеток, совместно экспрессирующих CAR и GOT2, или Т-клеток, экспрессирующих только CAR. Когорты животных были умерщвлены на 2, 7 и 14 дни, и Т-клетки были выделены из опухолей путем ручного и ферментативного расщепления. Была проведена проточная цитометрия, и была определена средняя интенсивность флуоресценции молекул активации CD69, CD25 и ICOS на субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Фенотип Т-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии после лизиса эритроцитов и окрашивания клеток. Для этих экспериментов клетки, выделенные из опухолей, окрашивали анти-CD3, анти-CD4, анти-CD8, анти-PD-1, анти-TIM-3, анти-CD69, анти-

CD25 и анти-ICOS антителами. Средняя интенсивность флуоресценции молекул активации CD69, CD25 и ICOS была определена количественно на субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, выделенных из опухоли на 2 день (CD69) или 7 день (CD25, ICOS), и нанесена на график для каждого типа Т-клеток. Как показано на Фиг. 17А-17С, Т-клетки, совместно экспрессирующие GOT2 и полипептид CAR, продемонстрировали повышенную экспрессию маркеров активации CD69, CD25 и ICOS по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR.

Мышей с иммунодефицитом с установленными подкожными опухолями JHH7, экспрессирующими GPC3, лечили однократной внутривенной инъекцией 5×10^6 Т-клеток, совместно экспрессирующих CAR и GOT2, или Т-клеток, экспрессирующих только CAR. Когорты животных были умерщвлены на 2, 7 и 14 дни, и Т-клетки были выделены из опухолей и селезенки путем ручного и ферментативного расщепления. Была проведена проточная цитометрия, и частота встречаемости Т-клеток, совместно экспрессирующих молекулы, ингибирующие PD-1 и TIM-3, была количественно определена на субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Частоту Т-клеток, совместно экспрессирующих молекулы, ингибирующие PD-1 и TIM-3, количественно определяли на субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, выделенных из опухоли, и наносили на график для каждого типа Т-клеток в зависимости от момента времени. Т-клетки, совместно экспрессирующие CAR и GOT2, показали сравнимую или более высокую частоту встречаемости PD-1+TIM-3+ Т-клеток на 7 день по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR, но более низкую частоту встречаемости PD-1+TIM-3+ Т-клеток на день 14. Фиг. 18А-18В. Эти результаты показывают, что Т-клетки, совместно экспрессирующие CAR и GOT2, более устойчивы к устойчивой экспрессии ингибирующих рецепторов по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR. Эти эксперименты демонстрируют, что экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, в Т-клетках усиливает активацию и ограничивает устойчивую экспрессию ингибиторного рецептора Т-клетки в микроокружении солидной опухоли.

Пример 21: Совместная экспрессия гена, модулирующего цикл Кребса (GOT2), и CAR, нацеленного на GPC3, в Т-клетках приводит к устойчивости к устойчивой экспрессии ингибиторного рецептора на Т-клетках, выделенных из ксенотрансплантатов солидных опухолей GPC3+

Полипептид, модулирующий цикл Кребса (GOT2) (SEQ ID NO: 88), совместно экспрессировали в одних Т-клетках с полипептидом CAR-Т, нацеленным на GPC3 (SEQ ID NO: 104). Т-клетки трансдуцировали вирусом, кодирующим только полипептид CAR или CAR и GOT2, разделенные последовательностью проскока рибосомы P2A.

Фенотип *ex vivo* CAR Т-клеток оценивали после инъекции в модель опухоли мышей. Для этих экспериментов линия опухолевых клеток гепатоцеллюлярной карциномы GPC3⁺, JHH7, была инокулирована мышам NSGTM (NOD scidgamma, NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rg^{tmWj1}/SzJ, штамм 005557). Лечение Т-клетками начинали, когда объем опухоли достигал приблизительно 80 мм³ (10 день после инокуляции). Мышей

рандомизировали в группы лечения по 3 мыши в каждой на основании объема опухоли и лечили Т-клетками, экспрессирующими CAR, нацеленный на GPC3, или Т-клетками, совместно экспрессирующими CAR, нацеленный на GPC3, и GOT2, в дозе 5×10^6 CAR+Т-клеток на 11 день после инокуляции.

Подкожные опухоли и ткани селезенки собирали у мышей с опухолью JHH7 на 1, 6 и 13 день после введения дозы Т-клеток. Опухоли измельчали лезвием бритвы и ферментативно расщепляли с использованием набора для диссоциации опухолей человека (Miltenyi Biotec) в течение 1 часа при 37 °С. Селезенку диссоциировали механически с помощью конца поршня шприца. Расщепленные опухоли и селезенку пропускали через фильтр для клеток 70 мкм перед посевом в 96-луночный планшет для окрашивания клеток.

Мышей с иммунодефицитом с установленными подкожными опухолями JHH7, экспрессирующими GPC3, лечили однократной внутривенной инъекцией 5×10^6 Т-клеток, совместно экспрессирующих CAR и GOT2, или Т-клеток, экспрессирующих только CAR. Когорты животных были умерщвлены на 6 и 13 дни, и Т-клетки были выделены из опухолей и селезенки путем ручного и ферментативного расщепления. Была проведена проточная цитометрия, и частота встречаемости Т-клеток, совместно экспрессирующих молекулы, ингибирующие PD-1 и TIM-3, была количественно определена на субпопуляциях CD4+ и CD8+ Т-клеток.

Фенотип Т-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии после лизиса эритроцитов и окрашивания клеток. Для этих экспериментов клетки окрашивали анти-CD3, анти-CD4, анти-CD8, анти-PD-1 и анти-TIM-3 антителами. Частоту встречаемости Т-клеток, совместно экспрессирующих PD-1 и TIM-3, количественно оценивали на субпопуляциях CD4+ и CD8+ Т-клеток. Т-клетки в субпопуляциях CD4+ и CD8+, совместно экспрессирующие CAR и GOT2, продемонстрировали сравнимую с более высокой частотой встречаемости PD-1+TIM-3+ Т-клеток на 6-й день по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR, что указывает на активацию, но с уменьшенной частотой экспрессии после длительного воздействия на микроокружение опухоли (день 13) по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR, что указывает на устойчивость к устойчивой экспрессии ингибиторного рецептора. Т-клетки, выделенные из селезенки, не проявляли экспрессии PD-1+TIM-3+ ни на 6, ни на 13 день, демонстрируя специфичность активации только к опухоли, экспрессирующей GPC3. Фиг. 19A-19D. Т-клетки, совместно экспрессирующие CAR и GOT2, показали более высокую частоту встречаемости PD-1+TIM-3+ Т-клеток на 6 день по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR. Фиг. 19A и 18B. С другой стороны, Т-клетки, совместно экспрессирующие CAR и GOT2, показали более низкую частоту встречаемости PD-1+TIM-3+ Т-клеток на 13 день после длительного воздействия на микроокружения опухоли, что указывает на устойчивость к устойчивой экспрессии ингибиторного рецептора по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR. Фиг. 19C и 19D. Т-клетки, выделенные из селезенки, не проявляли экспрессии PD-1+TIM-3+ ни на 6, ни на

13 день, демонстрируя специфичность активации Т-клеток только в опухоли, экспрессирующей GPC3. Фиг. 19А-19D.

Эти эксперименты демонстрируют, что экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, в Т-клетках обеспечивает устойчивость к устойчивой экспрессии ингибиторного рецептора в микроокружении солидной опухоли.

Пример 22: Совместная экспрессия гена, модулирующего цикл Кребса (GOT2), и CAR, нацеленного на GPC3, в Т-клетках приводит к устойчивой функциональности Т-клеток после воздействия на микроокружение опухоли *in vivo*.

Полипептид, модулирующий цикл Кребса (GOT2) (SEQ ID NO: 88), совместно экспрессировали в одних Т-клетках с полипептидом CAR-Т, нацеленным на GPC3 (SEQ ID NO: 104). Т-клетки трансдуцировали вирусом, кодирующим только полипептид CAR или CAR и GOT2, разделенные последовательностью проскока рибосомы P2A.

Функцию клеток, трансдуцированных CAR, оценивали на модели опухоли мышей. Для этих экспериментов линия опухолевых клеток гепатоцеллюлярной карциномы GPC3+, JHH7, была инокулирована мышам NSGTM (NOD scidgamma, NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rg^{tmWj1}/SzJ, штамм 005557). Лечение Т-клетками начинали, когда объем опухоли достигал приблизительно 80 мм³ (10 день после инокуляции). Мышей рандомизировали в группы лечения по 3 мышей в каждой на основании объема опухоли и лечили Т-клетками, экспрессирующими CAR, нацеленный на GPC3, в дозе 5×10^6 CAR+ Т-клеток в 11 день после инокуляции.

Подкожные опухоли собирали у мышей с опухолью JHH7 на 3 день после введения дозы CAR. Опухоли измельчали лезвием бритвы и ферментативно расщепляли с использованием набора для диссоциации опухолей человека (Miltenyi Biotec) в течение 1 часа при 37 °C. Расщепленные опухоли пропускали через сетчатый фильтр для клеток 70 мкм перед посевом в 24-луночный планшет (1×10^6 клеток/объем 1 мл). После инкубации в течение 18 часов при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ супернатанты клеток собирали для анализа цитокинов. Концентрацию IFN γ и IL-17A в клеточных супернатантах определяли с использованием гомогенного флуоресцентного анализа с временным разрешением (Cisbio) и технологии анализа Meso Scale Discovery V-Plex, соответственно. Оба анализа были выполнены в соответствии с протоколом производителя.

Т-клетки в опухолях мышей, которым вводили дозу Т-клеток, совместно экспрессирующих GOT2 и CAR, продемонстрировали повышенную продукцию IFN γ и IL-17A по сравнению с Т-клетками в опухолях мышей, которым вводили дозу Т-клеток, экспрессирующих только CAR. Фиг. 20А-20В. Эти эксперименты демонстрируют, что экспрессия полипептида, модулирующего цикл Кребса, в Т-клетках оказывает положительное влияние на функцию Т-клеток в микроокружении опухоли.

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Все признаки, раскрытые в данном описании, могут быть объединены в любой комбинации. Каждый признак, раскрытый в данном описании, может быть заменен альтернативным признаком, служащим той же, эквивалентной или аналогичной цели.

Таким образом, если четко не указано иное, каждый раскрытый признак является только примером общей серии эквивалентных или аналогичных признаков.

Из приведенного выше описания специалист в данной области техники может легко установить существенные характеристики настоящего изобретения, не отступая от его сущности и объема, может внести различные изменения и модификации изобретения, чтобы адаптировать его к различным применениям и условиям. Таким образом, другие варианты осуществления также находятся в пределах формулы изобретения.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Несмотря на то, что несколько патентоспособных вариантов осуществления были описаны и проиллюстрированы в данном документе, специалисты в данной области техники легко определяют множество других способов, и/или структур для обеспечения функции, и/или получения результатов, и/или одного или более преимуществ, описанных в настоящем документе, и каждый из таких вариантов и/или модификаций считается находящимся в пределах объема вариантов осуществления описанного в настоящем документе изобретения. В более общем смысле специалистам в данной области техники будет понятно, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в данном документе, предназначены для иллюстрации и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или применений, для которых используются идеи изобретения. Специалисты в данной области техники узнают или смогут установить, используя не более чем обычные эксперименты, многие эквиваленты конкретных патентоспособных вариантов осуществления изобретения, описанных в данном документе. Следовательно, следует понимать, что вышеупомянутые варианты осуществления представлены только в качестве примера и что в рамках прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов варианты осуществления изобретения могут быть реализованы иначе, чем конкретно описано и заявлено. Патентоспособные варианты осуществления настоящего изобретения направлены на каждый отдельный признак, систему, изделие, материал, набор и/или способ, описанный в данном документе. Кроме того, любая комбинация двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов, наборов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы, наборы и/или способы не противоречат друг другу, включается в объем настоящего изобретения.

Все определения, как они определены и используются в данном документе, следует понимать как контролирующие определения словаря, определения в документах, включенных посредством ссылки, и/или общепринятые значения определенных терминов.

Все ссылки, патенты и патентные заявки, раскрытые в данном документе, включены посредством ссылки в отношении объекта, для которого каждый из них цитируется, что в некоторых случаях может охватывать весь документ.

Упоминания единственного числа в описании и формуле изобретения, если явно не указано иное, следует понимать как означающие «по меньшей мере один».

Фразу «и/или», употребляемую в данном документе в описании и в формуле изобретения, следует понимать как означающую «любой из или оба вместе» для элементов, соединенных таким образом, *т. е.* элементов, которые в одних случаях присутствуют вместе, а в других - раздельно. Множественные элементы, перечисленные с помощью «и/или», должны толковаться одинаково, *то есть* «один или более» из элементов, соединенных таким образом. При желании могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно обозначенных условием «и/или», независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на «А и/или В» при использовании в сочетании с неограничивающей формулировкой, такой как «содержащий», может относиться в одном варианте осуществления только к А (необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления только к В (необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления как к А, так и к В (необязательно включая другие элементы); и *т.п.*

Используемый в данном документе в описании и в формуле изобретения «или» следует понимать как имеющий то же значение, что и «и/или», как определено выше. Например, при разделении элементов в списке «или» или «и/или» следует интерпретировать как включающее, *т. е.*, включение по крайней мере одного, но также и более одного, из количества или списка элементов, и, необязательно, дополнительных элементов, не внесенных в список. Только термины, явно указывающие на обратное, такие как «только один из» или «ровно один из» или, при использовании в формуле изобретения, «состоящий из» будут относиться к включению ровно одного элемента из количества или списка элементов. Как правило, термин «или», используемый в данном документе, должен интерпретироваться только как указывающий на исключительные альтернативы (*то есть* «один или другой, но не оба»), когда ему предшествуют условия исключительности, такие как «либо», «один из», «только один из» или «ровно один из». «Состоящий по существу из» при использовании в формуле изобретения имеет свое обычное значение, используемое в области патентного права.

Используемая в данном документе в описании и формуле изобретения фраза «по меньшей мере один» в отношении списка из одного или более элементов должна пониматься как означающая по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или более элементов в списке элементов, но не обязательно включая по меньшей мере один из каждого элемента, конкретно перечисленного в списке элементов, и не исключая любые комбинации элементов в списке элементов. Это определение также допускает, что могут необязательно присутствовать другие элементы помимо элементов, специально указанных в списке элементов, к которым относится фраза «по меньшей мере один», независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера «по меньшей мере один из А и В» (или, эквивалентно, «по меньшей мере один из А или В» или, что эквивалентно, «по меньшей мере один из А и/или В») может относиться в одном варианте

осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, А, при отсутствии В (и необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, В, при отсутствии А (и необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, А, и по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, В (и необязательно включающему другие элементы); и т.п.

Также следует понимать, что, если явно не указано иное, в любых заявленных в данном документе способах, которые включают более одной стадии или действия, порядок стадий или действий способа не обязательно ограничивается порядком, в котором стадии или действия способа указаны.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка, которая имеет модулированный цикл Кребса по сравнению с нативной гемопозитической клеткой того же типа.

2. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка по п. 1, которая экспрессирует или сверхэкспрессирует

(i) фактор модуляции цикла Кребса.

3. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка по п. 2, отличающаяся тем, что фактор модуляции цикла Кребса представляет собой полипептид, модулирующий цикл Кребса.

4. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка по п. 3, отличающаяся тем, что полипептид, модулирующий цикл Кребса, представляет собой (а) фермент, который катализирует реакцию в цикле Кребса, (b) фермент, который использует метаболит цикла Кребса в качестве субстрата, или (с) фермент, который превращает предшественник в метаболит цикла Кребса.

5. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка по п. 4, отличающаяся тем, что полипептид, модулирующий цикл Кребса, представляет собой (а), который представляет собой изоцитратдегидрогеназу (IDH), малатдегидрогеназу (MDH) или фосфоглицератдегидрогеназу (PHGDH).

6. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка по п. 5, отличающаяся тем, что IDH представляет собой IDH1 или IDH2, и/или MDH представляет собой MDH1 или MDH2.

7. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка по п. 4, отличающаяся тем, что полипептид, модулирующий цикл Кребса, представляет собой (b), который представляет собой глутамино-щавелевоуксусную трансаминазу (GOT) или фосфоенолпируваткарбоксикиназу 1 (PCK1).

8. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка по п. 7, отличающаяся тем, что GOT представляет собой GOT1 или GOT2.

9. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка по п. 4, отличающаяся тем, что полипептид, модулирующий цикл Кребса, представляет собой (с), который представляет собой фосфосериаминотрансферазу (PSAT1), глутаматдегидрогеназу (GDH1), глутамат-пируваттрансаминазу 1 (GPT1) или глутаминазу (GLS).

10. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка по любому из пп. 1-9, которая дополнительно экспрессирует:

(ii) полипептид химерного рецептора, при этом полипептид химерного рецептора содержит:

(а) внеклеточный мишень-связывающий домен;

- (b) трансмембранный домен; и
- (с) цитоплазматический сигнальный домен.

11. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по п. 10, отличающаяся тем, что полипептид химерного рецептора представляет собой полипептид Т-клеточного рецептора, связанного с антителом (АСТР - англ.: antibody-coupled T cell receptor), в котором (а) представляет собой внеклеточный Fc-связывающий домен.

12. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по п. 10, отличающаяся тем, что полипептид химерного рецептора представляет собой полипептид химерного антигенного рецептора (CAR), в котором (а) представляет собой внеклеточный антигенсвязывающий домен.

13. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 10-12, отличающаяся тем, что полипептид химерного рецептора дополнительно содержит по меньшей мере один костимулирующий сигнальный домен.

14. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 10-12, отличающаяся тем, что полипептид химерного рецептора, который необязательно представляет собой полипептид АСТР, не содержит костимулирующих сигнальных доменов.

15. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 10-14, отличающаяся тем, что цитоплазматический сигнальный домен содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ИТАМ).

16. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 10-15, отличающаяся тем, что (с) расположен на С-конце полипептида химерного рецептора.

17. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 10-16, отличающаяся тем, что полипептид химерного рецептора дополнительно содержит шарнирный домен, который расположен на С-конце (а) и N-конце (b).

18. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 10-17, отличающаяся тем, что полипептид химерного рецептора дополнительно содержит сигнальный пептид на своем N-конце.

19. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 10-18, отличающаяся тем, что полипептид химерного рецептора представляет собой полипептид АСТР, в котором внеклеточный мишень-связывающий домен (а) представляет собой внеклеточный Fc-связывающий домен, и при этом Fc-связывающий домен выбран из группы, состоящей из:

- (А) внеклеточного лиганд-связывающего домена Fc-рецептора,
- (В) фрагмента антитела, который связывает Fc-часть иммуноглобулина,
- (С) встречающегося в природе белка, который связывает Fc-часть

иммуноглобулина или его Fc-связывающий фрагмент, и

(D) синтетического полипептида, который связывает Fc-часть иммуноглобулина.

20. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка по п. 19, отличающаяся тем, что Fc-связывающий домен представляет собой (A), который представляет собой внеклеточный лиганд-связывающий домен рецептора Fc-гамма, рецептора Fc-альфа или рецептора Fc-эпсилон.

21. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка по п. 20, отличающаяся тем, что Fc-связывающий домен представляет собой внеклеточный лиганд-связывающий домен CD16A, CD32A или CD64A.

22. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка по п. 20, отличающаяся тем, что Fc-связывающий домен представляет собой внеклеточный лиганд-связывающий домен F158 CD16A или V158 CD16A.

23. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка по п. 19, отличающаяся тем, что Fc-связывающий домен представляет собой (B), который представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) или однодоменное антитело.

24. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка по п. 19, отличающаяся тем, что Fc-связывающий домен представляет собой (C), который представляет собой белок A или белок G, или их Fc-связывающий фрагмент.

25. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка по п. 19, отличающаяся тем, что Fc-связывающий домен представляет собой (D), который представляет собой пептид Кунитца, SMIP, авимер, аффитело, DARPin или антикалин.

26. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка по любому из пп. 10-18, отличающаяся тем, что полипептид химерного рецептора представляет собой полипептид CAR, в котором внеклеточный мишень-связывающий домен (a) представляет собой антигенсвязывающий домен, и при этом антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный фрагмент антитела, который связывается с опухолевым антигеном, патогенным антигеном или иммунной клеткой, специфичной к аутоантигену.

27. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка по п. 26, отличающаяся тем, что опухолевый антиген связан с гематологической опухолью.

28. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка по п. 27, отличающаяся тем, что опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, каппа-цепи, CD30, CD123, CD33, LeY, CD138, CD5, BCMA, CD7, CD40 и IL-1RAP.

29. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка по п. 26, отличающаяся тем, что опухолевый антиген связан с солидной опухолью.

30. Генетически сконструированная гемопозитическая клетка по п. 29,

отличающаяся тем, что опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из GD2, GPC3, FOLR, HER2, EphA2, EFGRVIII, IL13RA2, VEGFR2, ROR1, NKG2D, EpCAM, CEA, мезотелина, MUC1, CLDN18.2, CD171, CD133, PSCA, cMET, EGFR, PSMA, FAP, CD70, MUC16, L1-CAM и CAIX.

31. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по п. 26, отличающаяся тем, что патогенный антиген представляет собой бактериальный антиген, вирусный антиген или грибковый антиген.

32. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 10-31, отличающаяся тем, что трансмембранный домен (b) представляет собой однопроходный трансмембранный белок.

33. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по п. 32, отличающаяся тем, что трансмембранный домен представляет собой мембранный белок, выбранный из группы, состоящей из CD8 α , CD8 β , 4-1BB, CD28, CD34, CD4, Fc ϵ RI γ , CD16A, OX40, CD3 ζ , CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ , TCR α , CD32, CD64, VEGFR2, FAS и FGFR2B.

34. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 10-31, отличающаяся тем, что трансмембранный домен (b) представляет собой не встречающийся в природе сегмент гидрофобного белка.

35. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 10-13 и 15-34, отличающаяся тем, что по меньшей мере один костимулирующий сигнальный домен представляет собой костимулирующую молекулу, выбранную из группы, состоящей из 4-1BB, CD28, варианта CD28_{LL $\square$ GG}, OX40, ICOS, CD27, GITR, ICOS, HVEM, TIM1, LFA1 и CD2.

36. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по п. 35, отличающаяся тем, что по меньшей мере один костимулирующий сигнальный домен представляет собой костимулирующий сигнальный домен CD28 или костимулирующий сигнальный домен 4-1BB.

37. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 10-13 и 15-36, отличающаяся тем, что полипептид химерного рецептора содержит два костимулирующих сигнальных домена.

38. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по п. 37, отличающаяся тем, что два костимулирующих домена представляют собой:

CD28 и 4-1BB; или

вариант CD28_{LL $\square$ GG} и 4-1BB.

39. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по п. 37, отличающаяся тем, что один из костимулирующих сигнальных доменов представляет собой костимулирующий сигнальный домен CD28; и при этом другой костимулирующий домен выбран из группы, состоящей из костимулирующего сигнального домена 4-1BB, костимулирующего сигнального домена OX40,

костимулирующего сигнального домена CD27 и костимулирующего сигнального домена ICOS.

40. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 10-39, отличающаяся тем, что цитоплазматический сигнальный домен (с) представляет собой цитоплазматический домен CD3 ζ или Fc ϵ R1 γ .

41. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 17-40, отличающаяся тем, что шарнирный домен имеет длину от 1 до 60 аминокислот.

42. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 17-41, отличающаяся тем, что шарнирный домен представляет собой CD28, CD16A, CD8 α , или IgG.

43. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 17-42, отличающаяся тем, что шарнирный домен представляет собой не встречающийся в природе пептид.

44. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по п. 43, отличающаяся тем, что шарнирный домен представляет собой удлинённый рекомбинантный полипептид (XTEN) или полипептид (Gly₄Ser)_n, в котором n является целым числом от 3 до 12 включительно.

45. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 10-16 и 18-40, отличающаяся тем, что полипептид химерного рецептора, который необязательно представляет собой полипептид ACTR, не содержит какого-либо шарнирного домена.

46. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 10-44, отличающаяся тем, что химерный рецептор, который необязательно представляет собой полипептид ACTR, не содержит шарнирного домена любого рецептора, отличного от CD16A.

47. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по п. 19, отличающаяся тем, что полипептид ACTR содержит (i) костимулирующий домен CD28; и (ii) трансмембранный домен CD28, шарнирный домен CD28 или их комбинацию.

48. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по п. 19, отличающаяся тем, что полипептид ACTR содержит компоненты (a)-(e), как показано в Таблице 3.

49. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по п. 19, отличающаяся тем, что полипептид ACTR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-80.

50. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по п. 26, отличающаяся тем, что полипептид химерного рецептора представляет собой полипептид CAR, который содержит (i) костимулирующий домен CD28 в комбинации с трансмембранным доменом CD28, шарнирным доменом CD28, или их комбинацией, или

(ii) костимулирующего домена 4-1BB в комбинации с трансмембранным доменом CD8, шарнирным доменом CD8 или их комбинацией.

51. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по п. 26, отличающаяся тем, что полипептид CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104 или SEQ ID NO: 105.

52. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 1-51, отличающаяся тем, что гемопоэтическая стволовая клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку или иммунную клетку, необязательно при этом иммунная клетка представляет собой естественную клетку-киллер, макрофаг, нейтрофил, эозинофил или Т-клетку.

53. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по п. 52, отличающаяся тем, что иммунная клетка представляет собой Т-клетку, в которой экспрессия эндогенного Т-клеточного рецептора, эндогенного главного комплекса гистосовместимости, эндогенного бета-2-микроглобулина или их комбинации ингибирована или устранена.

54. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 1-53, отличающаяся тем, что гемопоэтическая клетка представляет собой иммунную клетку, которая получена из моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК).

55. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 1-54, отличающаяся тем, что гемопоэтическая клетка содержит нуклеиновую кислоту или набор нуклеиновых кислот, которые в совокупности содержат:

(А) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, модулирующий метаболит цикла Кребса; и, необязательно,

(В) вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид химерного рецептора.

56. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по п. 55, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот представляют собой молекулу РНК или набор молекул РНК.

57. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по пп. 55 или 56, отличающаяся тем, что гемопоэтическая клетка содержит нуклеиновую кислоту, которая содержит как первую нуклеотидную последовательность, так и вторую нуклеотидную последовательность.

58. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по п. 57, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота дополнительно содержит третью нуклеотидную последовательность, расположенную между первой нуклеотидной последовательностью и второй нуклеотидной последовательностью, причем третья

нуклеотидная последовательность кодирует участок проскока рибосомы, внутренний участок посадки рибосомы (IRES) или второй промотор.

59. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по п. 57, отличающаяся тем, что третья нуклеотидная последовательность кодирует участок проскока рибосомы, который представляет собой пептид P2A.

60. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по любому из пп. 55-59, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот содержится в векторе или наборе векторов.

61. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по п. 60, отличающаяся тем, что вектор или набор векторов представляет собой вектор экспрессии или набор векторов экспрессии.

62. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по пп. 60 или 61, отличающаяся тем, что вектор или набор векторов содержит один или более вирусных векторов.

63. Генетически сконструированная гемопоэтическая клетка по п. 62, отличающаяся тем, что один или более вирусных векторов представляют собой ретровирусный вектор, который необязательно представляет собой лентивирусный вектор или гамма-ретровирусный вектор.

64. Фармацевтическая композиция, содержащая генетически сконструированную гемопоэтическую клетку по любому из пп. 1-63 и фармацевтически приемлемый носитель.

65. Фармацевтическая композиция по п. 64, отличающаяся тем, что генетически сконструированная гемопоэтическая клетка экспрессирует полипептид ACTR, и при этом композиция дополнительно содержит Fc-содержащий терапевтический агент.

66. Фармацевтическая композиция по п. 65, отличающаяся тем, что Fc-содержащий терапевтический агент представляет собой терапевтическое антитело или Fc-слитый белок.

67. Фармацевтическая композиция по пп. 65 или 66, отличающаяся тем, что Fc-содержащий терапевтический агент связывается с целевым антигеном, который необязательно представляет собой опухолевый антиген, патогенный антиген или иммунную клетку, специфичную к аутоантигену.

68. Фармацевтическая композиция по п. 67, отличающаяся тем, что патогенный антиген представляет собой бактериальный антиген, вирусный антиген или грибковый антиген.

69. Фармацевтическая композиция по п. 68, отличающаяся тем, что Fc-содержащий терапевтический агент представляет собой терапевтическое антитело, выбранное из группы, состоящей из адалимумаба, адо-трастузумаба эмтанзина, алемтузумаба, базиликсимаба, бевацизумаба, белиумаба, брентуксимаба,

канакинумаба, цетуксимаба, цертолизумаба, даклизумаба, деносумаба, динутуксимаба, экулизумаба, эфализумаба, эспратузумаба, гемтузумаба, голимумаба, hu14.18K322A, ибритумомаба, инфликсимаба, ипилимумаба, лабетузумаба, муромонаба, натализумаба, обинутузумаба, офатумумаба, омализумаба, паливизумаба, панитумумаба, пертузумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, ритуксимаба, тоцилизумаба, трастузумаба, тозитумомаба, устекинумаба и ведолизумаба.

70. Набор, содержащий:

первую фармацевтическую композицию, которая содержит генетически сконструированную гемопоэтическую клетку по любому из пп. 10-63 и фармацевтически приемлемый носитель; и

вторую фармацевтическую композицию, которая содержит Fc-содержащий терапевтический агент и фармацевтически приемлемый носитель.

71. Набор по п. 70, отличающийся тем, что Fc-содержащий терапевтический агент представляет собой Fc-слитый белок или терапевтическое антитело.

72. Набор по пп. 70 или 71, отличающаяся тем, что Fc-содержащий терапевтический агент связывается с целевым антигеном, который необязательно представляет собой опухолевый антиген, патогенный антиген или иммунную клетку, специфичную к аутоантигену.

73. Набор по п. 72, отличающийся тем, что терапевтическое антитело выбрано из группы, состоящей из адалимумаба, адо-трастузумаба эмтанзина, алемтузумаба, базиликсимаба, бевацизумаба, белимумаба, брентуксимаба, канакинумаба, цетуксимаба, цертолизумаба, даклизумаба, деносумаба, динутуксимаба, экулизумаба, эфализумаба, эспратузумаба, гемтузумаба, голимумаба, hu14.18K322A, ибритумомаба, инфликсимаба, ипилимумаба, лабетузумаба, муромонаба, натализумаба, обинутузумаба, офатумумаба, омализумаба, паливизумаба, панитумумаба, пертузумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, ритуксимаба, тоцилизумаба, трастузумаба, тозитумомаба, устекинумаба и ведолизумаба.

74. Способ ингибирования клеток, экспрессирующих целевой антиген, у субъекта, который включает введение нуждающемуся в этом субъекту популяции генетически сконструированных гемопоэтических клеток, приведенной в любом из пп. 10-63.

75. Способ по п. 74, отличающийся тем, что генетически сконструированные гемопоэтические клетки экспрессируют полипептид ASTR, и при этом субъект получал лечение или получает лечение Fc-содержащим терапевтическим агентом, специфичным к целевому антигену.

76. Способ по п. 74, отличающийся тем, что генетически сконструированные гемопоэтические клетки экспрессируют полипептид CAR, который содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный к целевому антигену.

77. Способ по пп. 75 или 76, отличающийся тем, что целевой антиген

представляет собой опухолевый антиген, патогенный антиген или иммунную клетку, специфичную к аутоантигену.

78. Способ по п. 77, отличающаяся тем, что патогенный антиген представляет собой бактериальный антиген, вирусный антиген или грибковый антиген.

79. Способ по любому из пп. 75-78, отличающийся тем, что по меньшей мере некоторые из клеток, экспрессирующих целевой антиген, расположены в среде с низким содержанием глюкозы.

80. Способ по любому из пп. 74-79, отличающийся тем, что генетически сконструированные гемопоэтические клетки являются аутологичными.

81. Способ по любому из пп. 74-79, отличающийся тем, что генетически сконструированные гемопоэтические клетки являются аллогенными.

82. Способ по любому из пп. 74-81, отличающийся тем, что генетически сконструированные гемопоэтические клетки активируются, размножаются или и то, и другое *ex vivo*.

83. Способ по любому из пп. 75 и 77-80, отличающаяся тем, что Fc-содержащий терапевтический агент представляет собой терапевтическое антитело или Fc-слитый белок.

84. Способ по п. 83, отличающаяся тем, что Fc-содержащий терапевтический агент представляет собой терапевтическое антитело, выбранное из группы, состоящей из адалимумаба, ада-трастузумаба эмтанзина, алемтузумаба, базиликсимаба, бевацизумаба, белиумаба, брентуксимаба, канакинумаба, цетуксимаба, цертолизумаба, даклизумаба, деносумаба, динутуксимаба, экулизумаба, эфализумаба, эпратузумаба, гемтузумаба, голимумаба, hu14.18K322A, ибритумомаба, инфликсимаба, ипилиумаба, лабетузумаба, муромонаба, натализумаба, обинутузумаба, офатумаба, обинутузумаба, омализумаба, паливизумаба, панитумаба, пертузумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, ритуксимаба, тоцилизумаба, тозитумомаба, трастузумаба, устекинумаба и ведолизумаба.

85. Способ по любому из пп. 74-84, отличающийся тем, что субъект представляет собой пациента-человека, имеющего рак, а целевой антиген представляет собой опухолевый антиген.

86. Способ по п. 85, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из карциномы, лимфомы, саркомы, бластомы и лейкоза.

87. Способ по пп. 85 или 86, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из рака В-клеточного происхождения, рака молочной железы, рака желудка, нейробластомы, остеосаркомы, рака легких, рака кожи, рака предстательной железы, рака толстой кишки, почечно-клеточной карциномы, рака яичников, рабдомиосаркомы, лейкемии, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи, ретинобластомы, глиомы, глиобластомы, рака печени и рака щитовидной железы.

88. Способ по п. 87, отличающийся тем, что рак В-клеточного происхождения

выбран из группы, состоящей из острого лимфобластного лейкоза В-линии, В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза и В-клеточной неходжкинской лимфомы.

89. Способ по любому из пп. 74-88, отличающийся тем, что генетически сконструированные гемопоэтические клетки включают Т-клетки, которые активируются в присутствии одного или более из анти-CD3 антитела, анти-CD28 антитела, IL-2, фитогемагглютинаина и сконструированной искусственной стимулирующей клетки или частицы.

90. Способ по п. 74, отличающийся тем, что генетически сконструированные гемопоэтические клетки включают естественные клетки-киллеры, которые активируются в присутствии одного или более из лиганда 4-1BB, анти-4-1BB антитела, IL-15, антитела к рецептору IL-15, IL-2, IL-12, IL-21, клеток K562 и сконструированной искусственной стимулирующей клетки или частицы.

91. Нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот, который в совокупности содержит:

(А) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид Т-клеточного рецептора, связанного с антителом (АСТР), приведенную в любом из пп. 10-51; и

(В) вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, модулирующий цикл Кребса.

92. Нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот по п. 91, отличающийся тем, что полипептид, модулирующий цикл Кребса, выбран из группы, состоящей из: фосфоенолпируваткарбоксикиназы 1 (PCK1), глютамино-щавелевоуксусной трансаминазы (GOT), изоцитратдегидрогеназы (IDH), малатдегидрогеназы (MDH), фосфоглицератдегидрогеназы (PHGDH), фосфосерин аминотрансферазы (PSAT1), глутаматдегидрогеназы (GDH1), глутамат-пируват трансаминазы 1 (GPT1) и глутаминазы (GLS).

93. Нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот по п. 92, отличающийся тем, что GOT представляет собой GOT1 или GOT2.

94. Нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот по п. 92, отличающийся тем, что IDH представляет собой IDH1 или IDH2, и/или MDH представляет собой MDH1 или MDH2.

95. Нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот по любому из пп. 89-94, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот представляет собой молекулу РНК или набор молекул РНК.

96. Нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот по любому из пп. 89-95, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота содержит как первую нуклеотидную последовательность, так и вторую нуклеотидную последовательность, и при этом

нуклеиновая кислота дополнительно содержит третью нуклеотидную последовательность, расположенную между первой нуклеотидной последовательностью и второй нуклеотидной последовательностью, при этом третья нуклеотидная последовательность кодирует участок проскока рибосомы, внутренний участок посадки рибосомы (IRES) или второй промотор.

97. Нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот по п. 96, отличающийся тем, что участок проскока рибосомы представляет собой пептид Р2А.

98. Нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот по любому из пп. 91-97, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот содержится в векторе или наборе векторов.

99. Нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот по п. 98, отличающийся тем, что вектор или набор векторов представляет собой вектор экспрессии или набор векторов экспрессии.

100. Нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот по пп. 98 или 99, отличающийся тем, что вектор или набор векторов содержит один или более вирусных векторов.

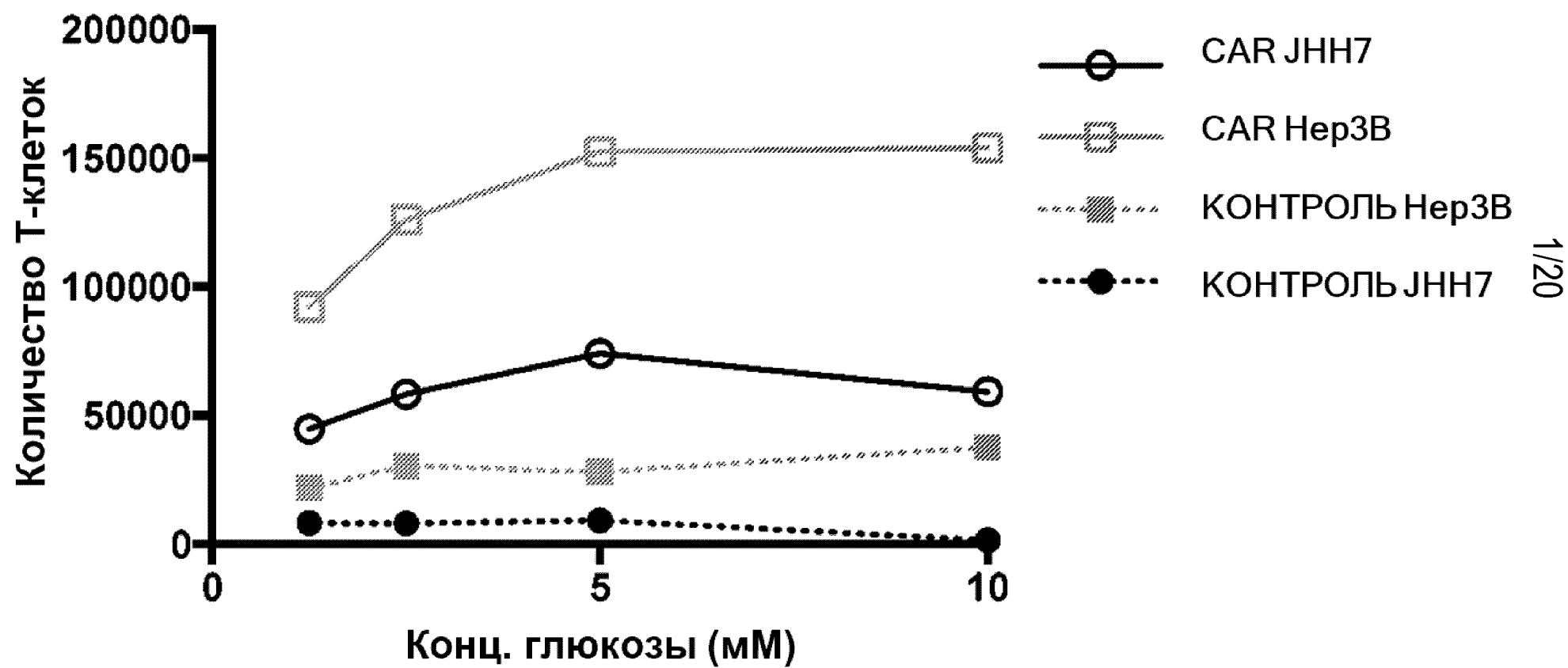
101. Нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот по п. 100, отличающийся тем, что один или более вирусных векторов представляет собой ретровирусный вектор, который необязательно представляет собой лентивирусный вектор или гамма-ретровирусный вектор.

102. Способ получения модифицированных гемопоэтических клеток *in vivo*, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту нуклеиновой кислоты или набора нуклеиновых кислот по любому из пп. 91-101.

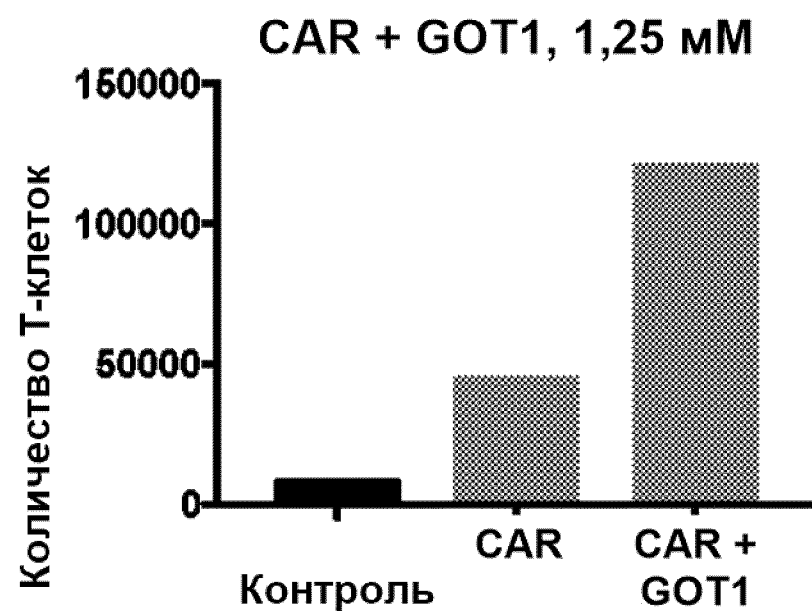
103. Способ по п. 101, дополнительно включающий введение субъекту Fc-содержащего терапевтического агента, специфичного к целевому антигену.

По доверенности

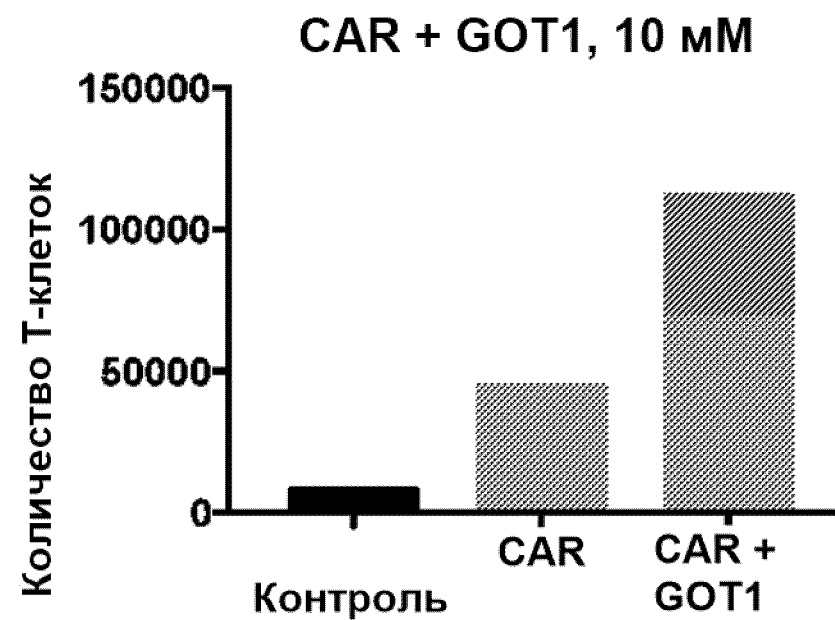
ФИГ. 1



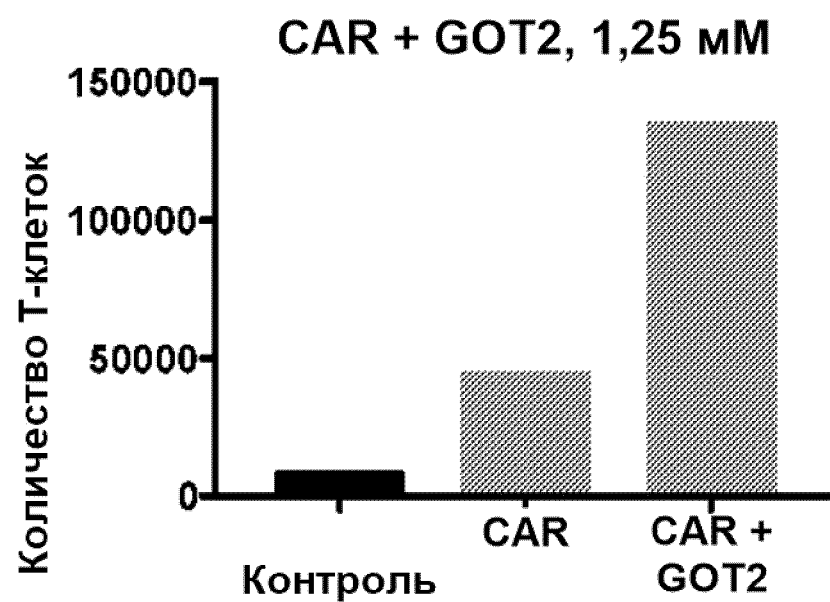
ФИГ. 2А



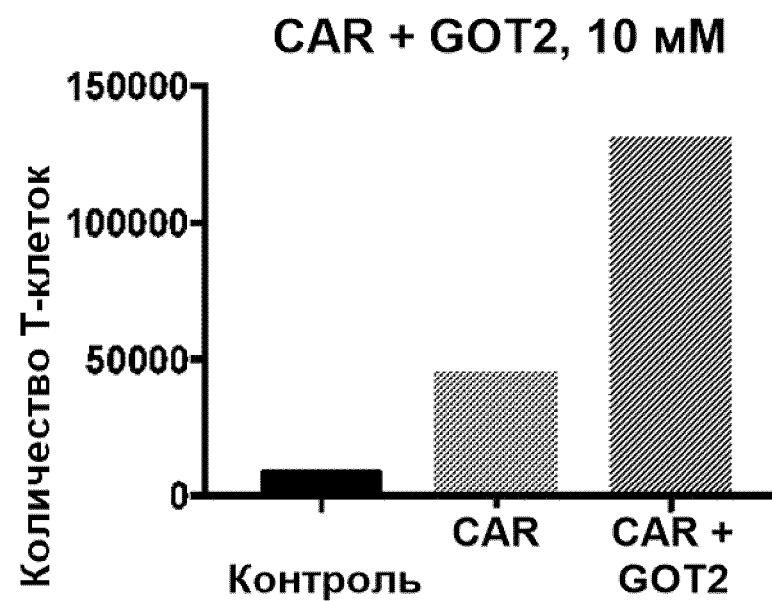
ФИГ. 2В



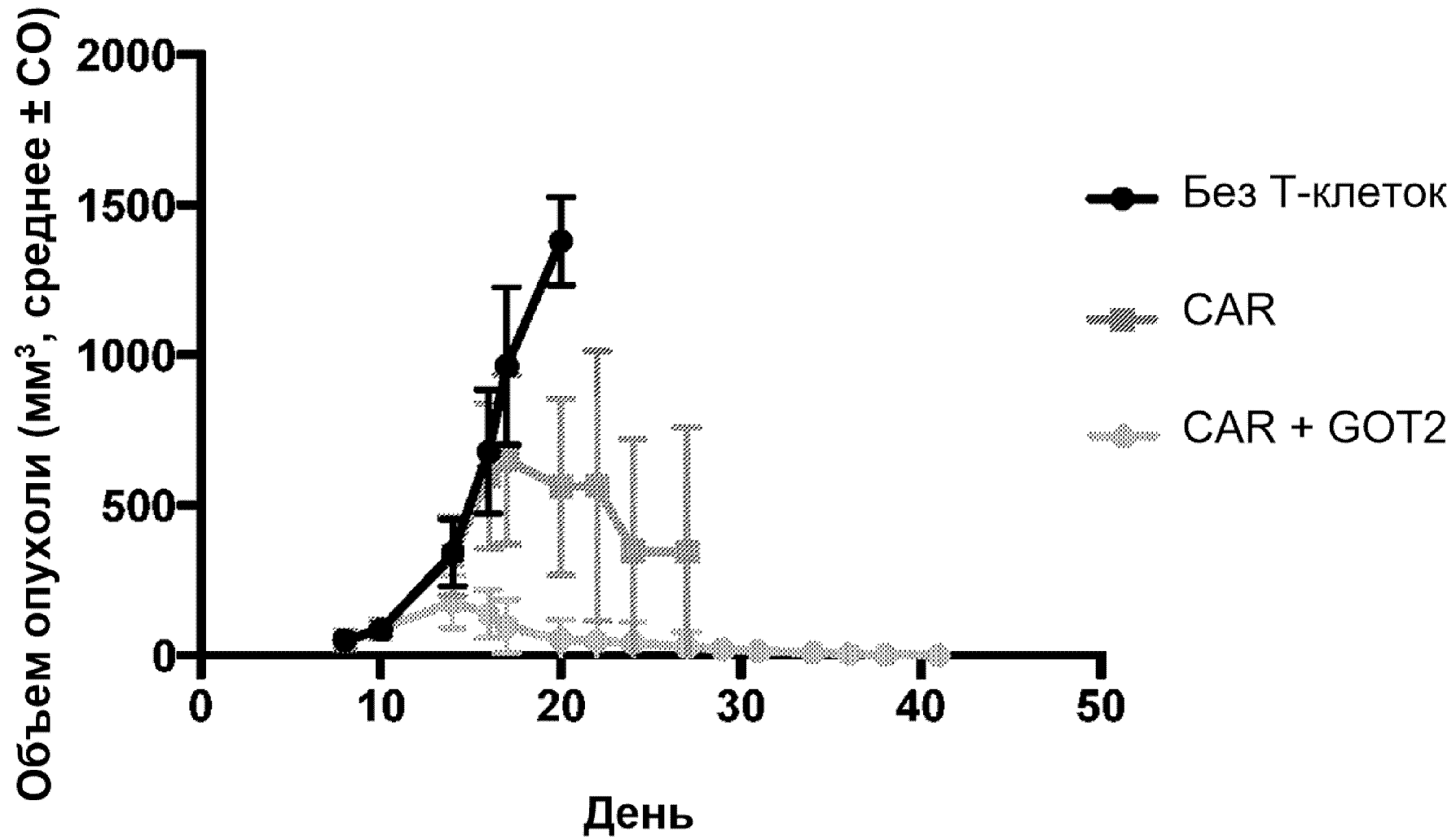
ФИГ. 3А



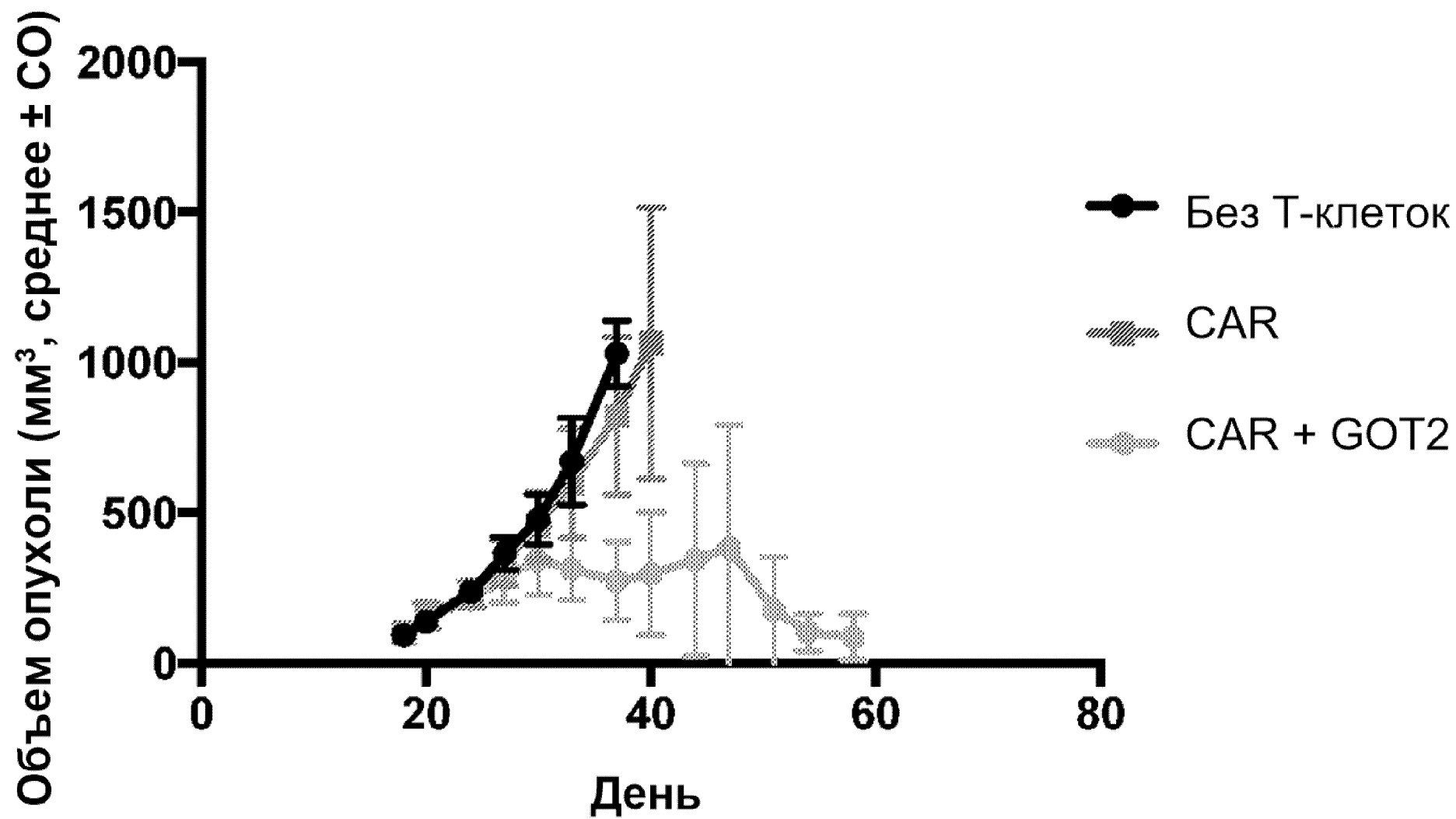
ФИГ. 3В



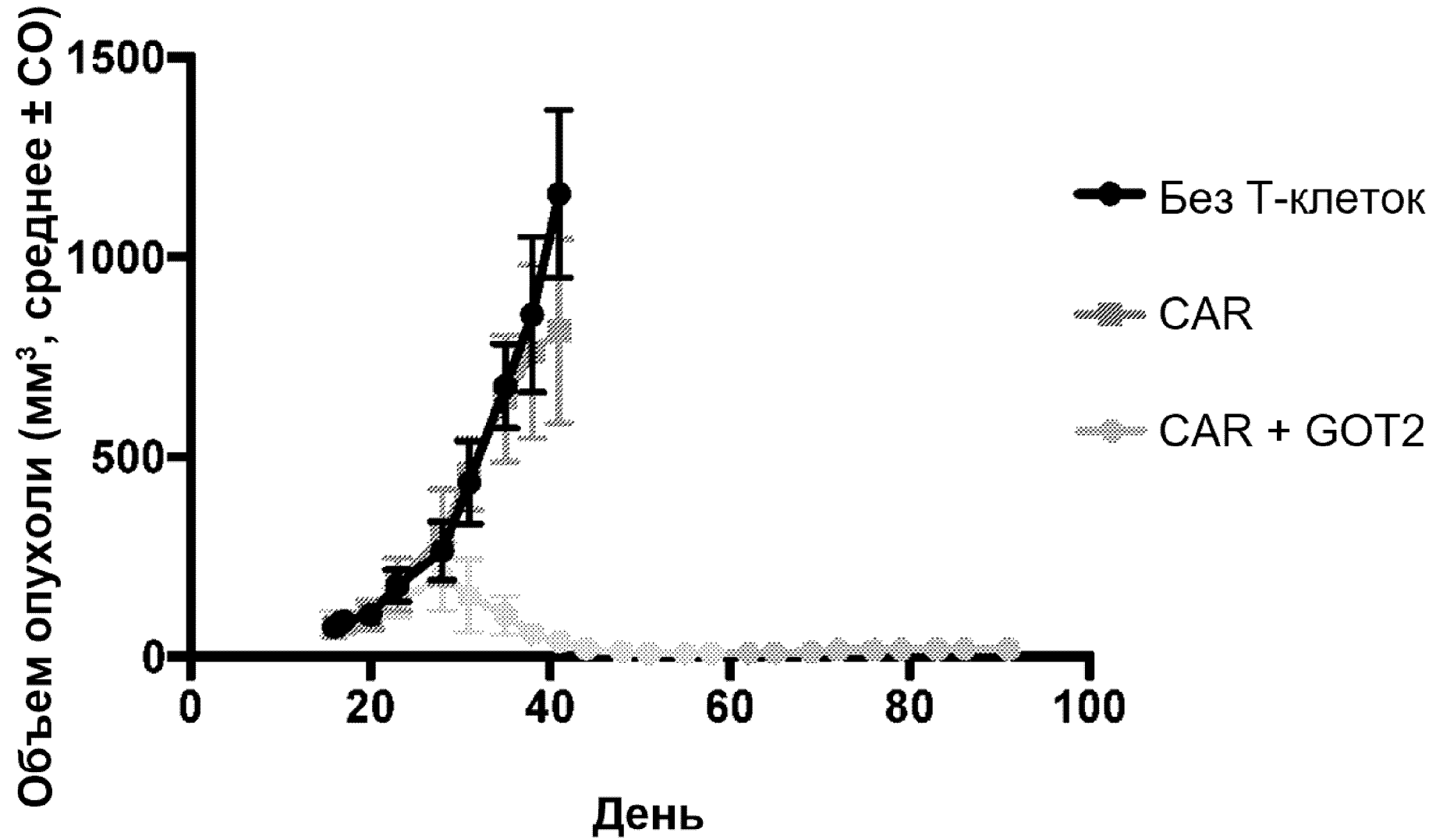
ФИГ. 4



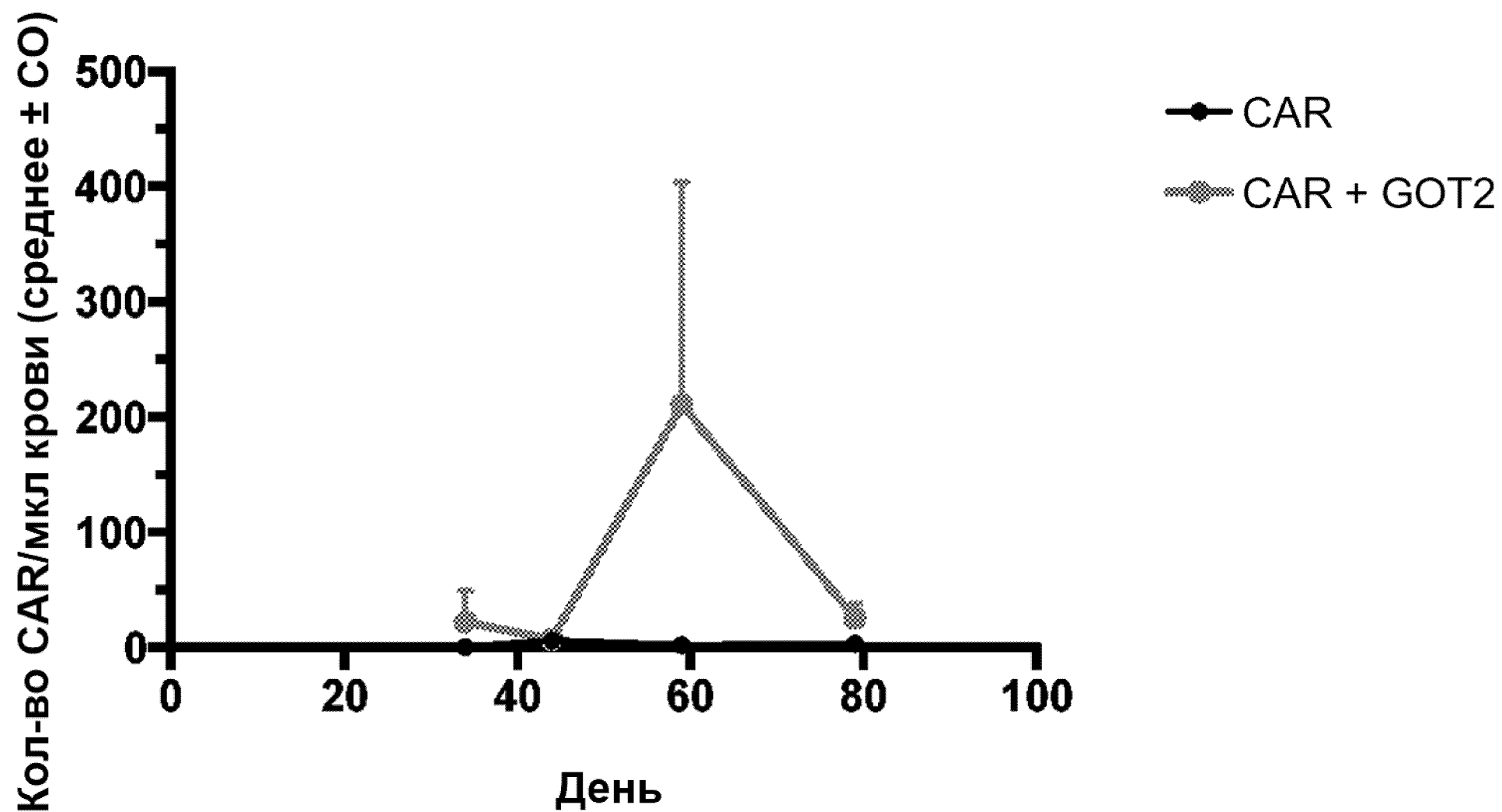
ФИГ. 5



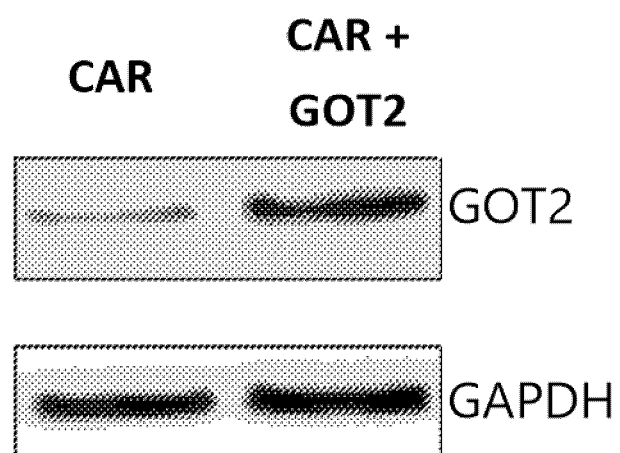
ФИГ. 6



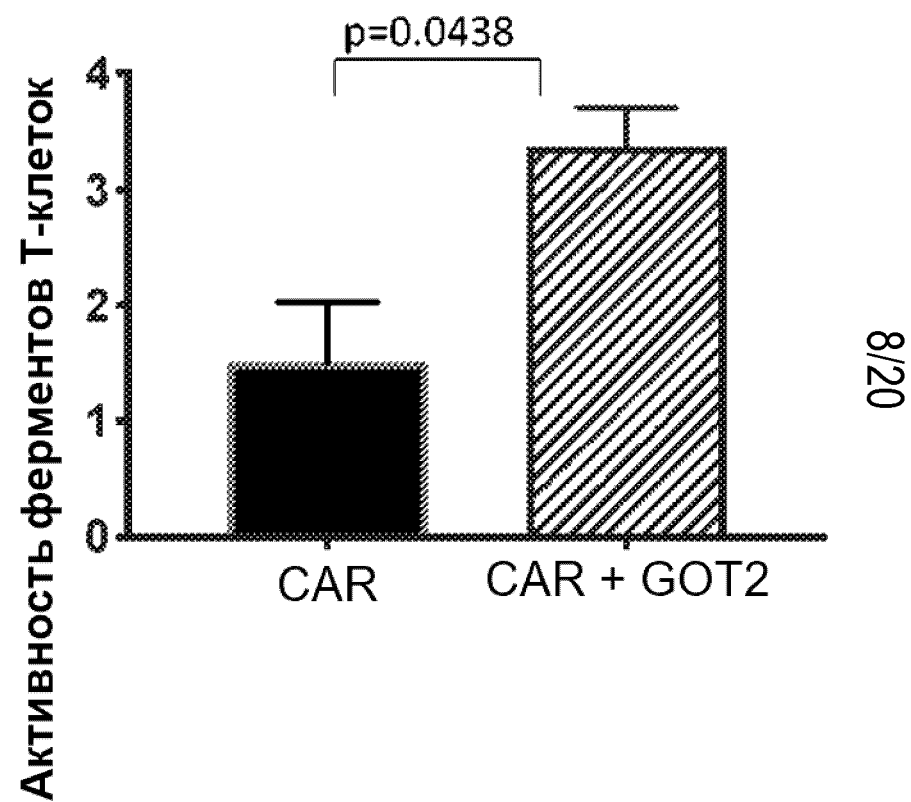
ФИГ. 7



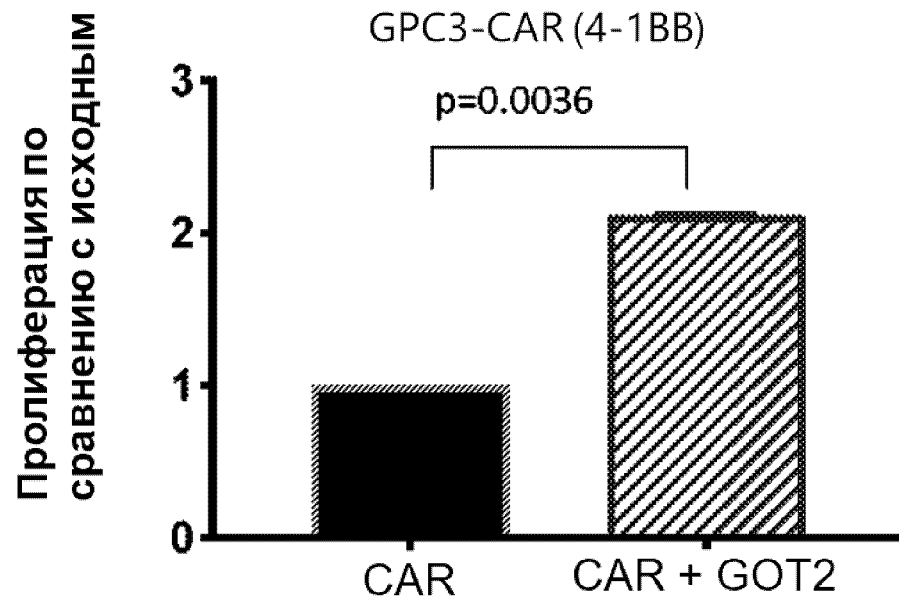
ФИГ. 8А



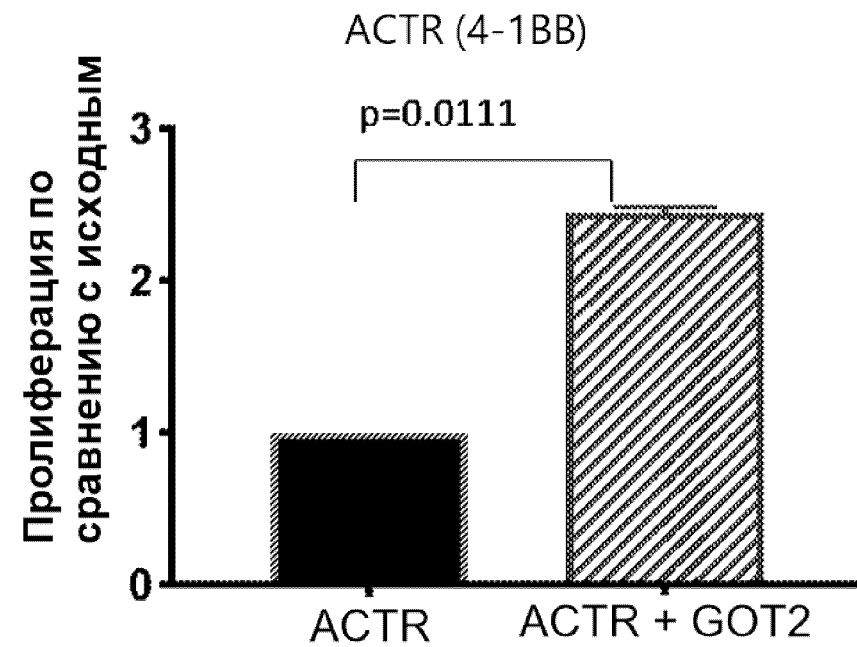
ФИГ. 8В



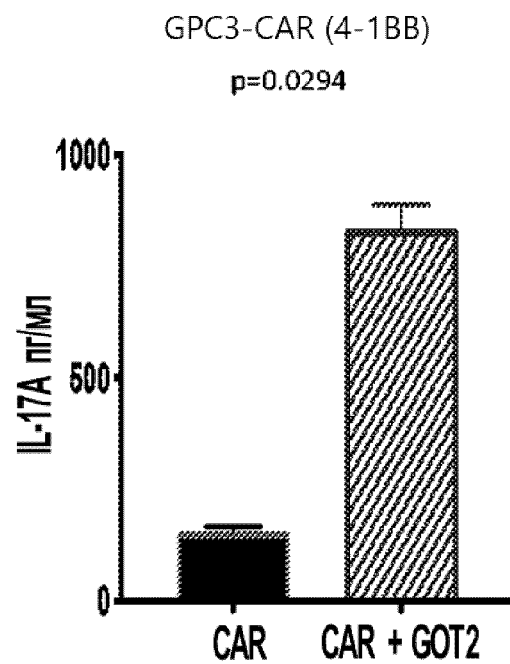
ФИГ. 9А



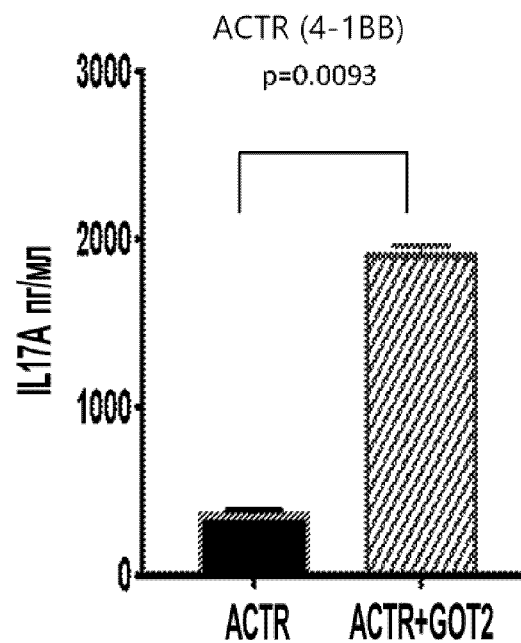
ФИГ. 9В



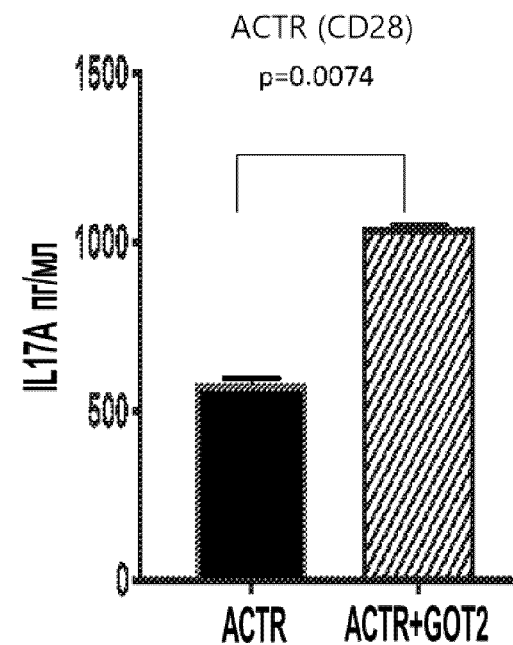
ФИГ. 10А



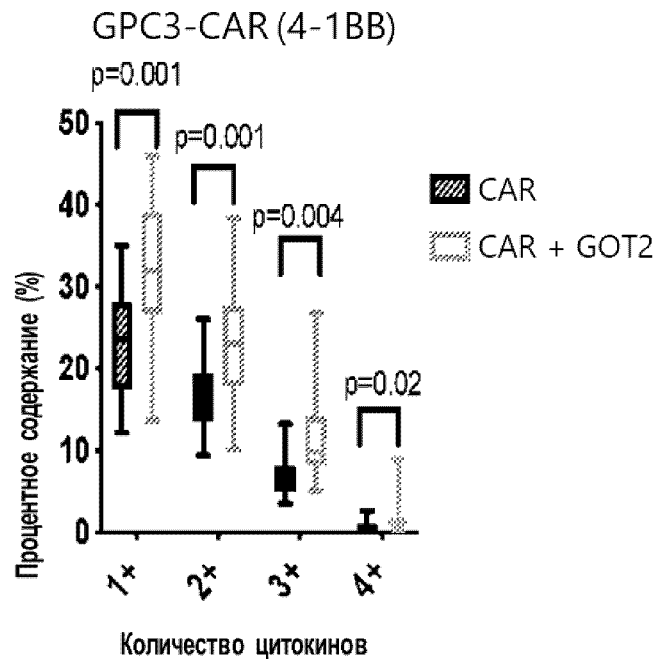
ФИГ. 10В



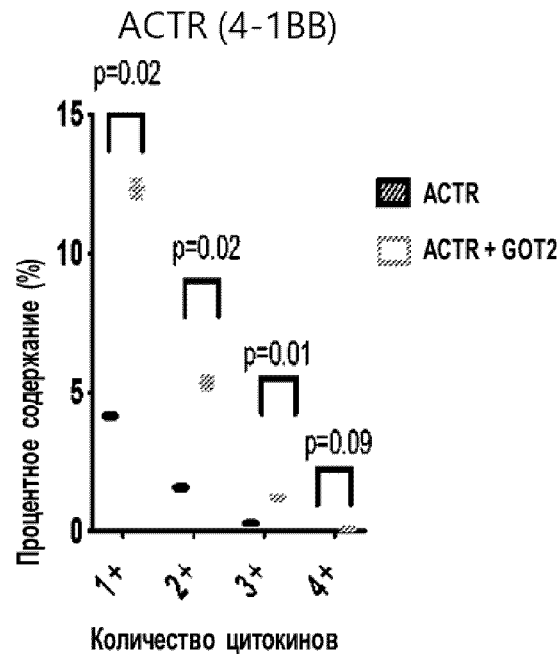
ФИГ. 10С



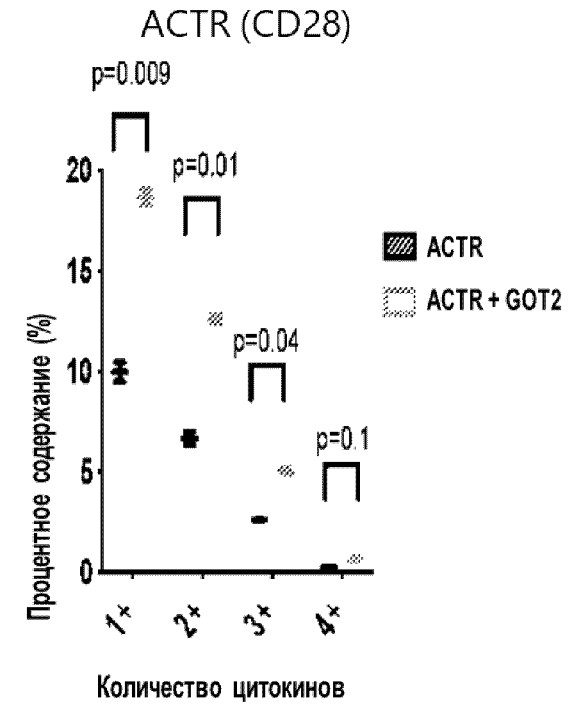
ФИГ. 11А



ФИГ. 11В

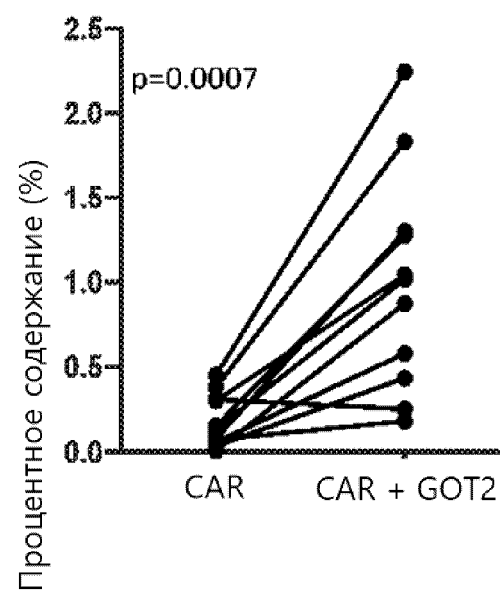


ФИГ. 11С



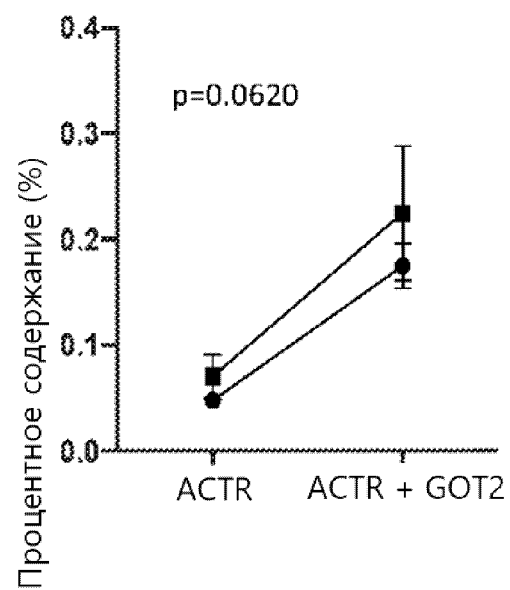
ФИГ. 12А

GPC3-CAR (4-1BB)
CD27+ CD45RA+ CD45RO- CD62L+



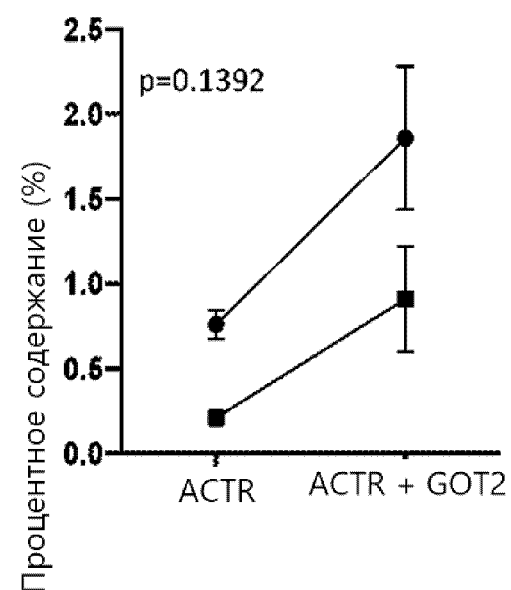
ФИГ. 12В

ACTR (4-1BB)
CD27+CD45RA+CD45RO-CD62L+

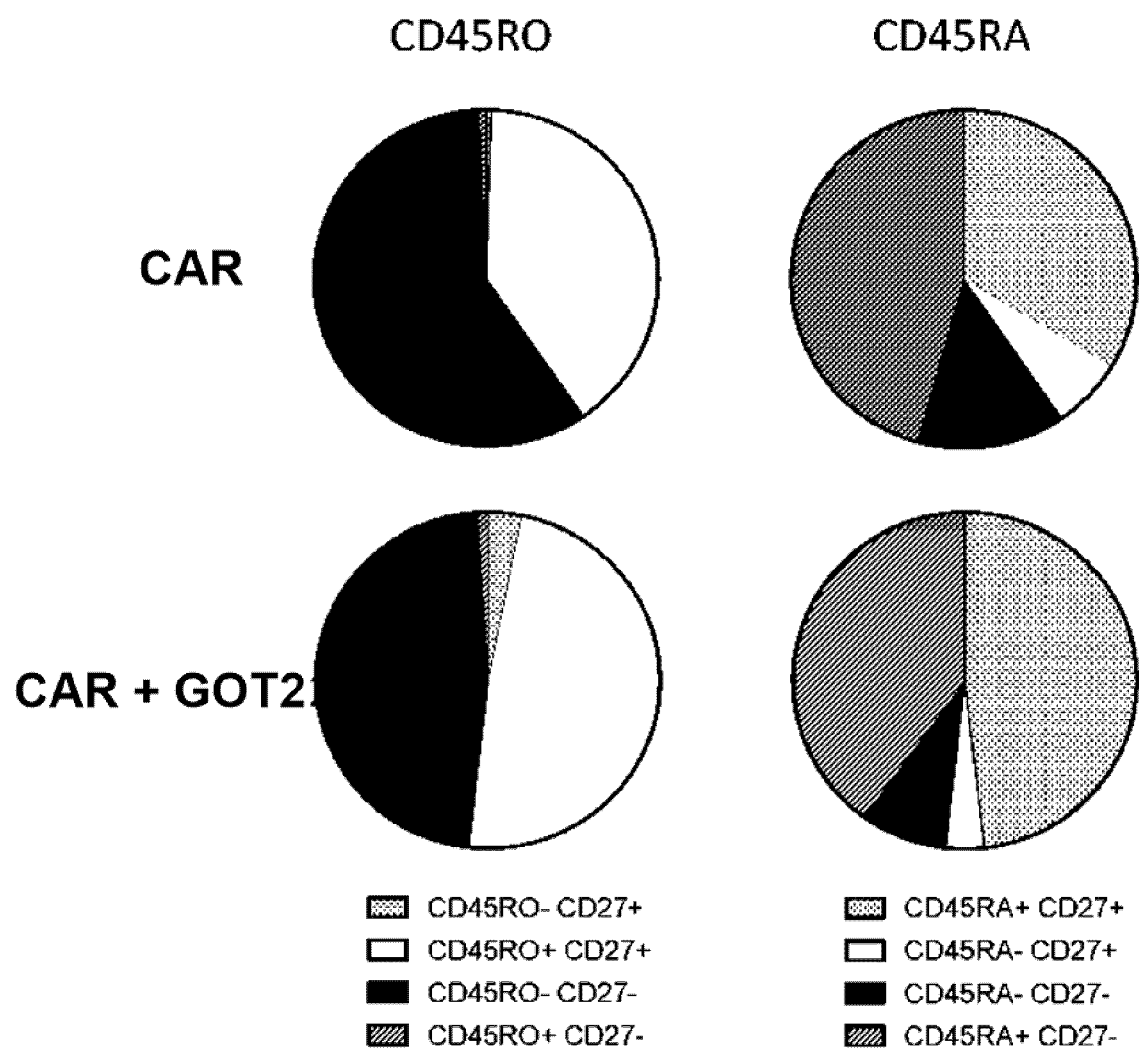


ФИГ. 12С

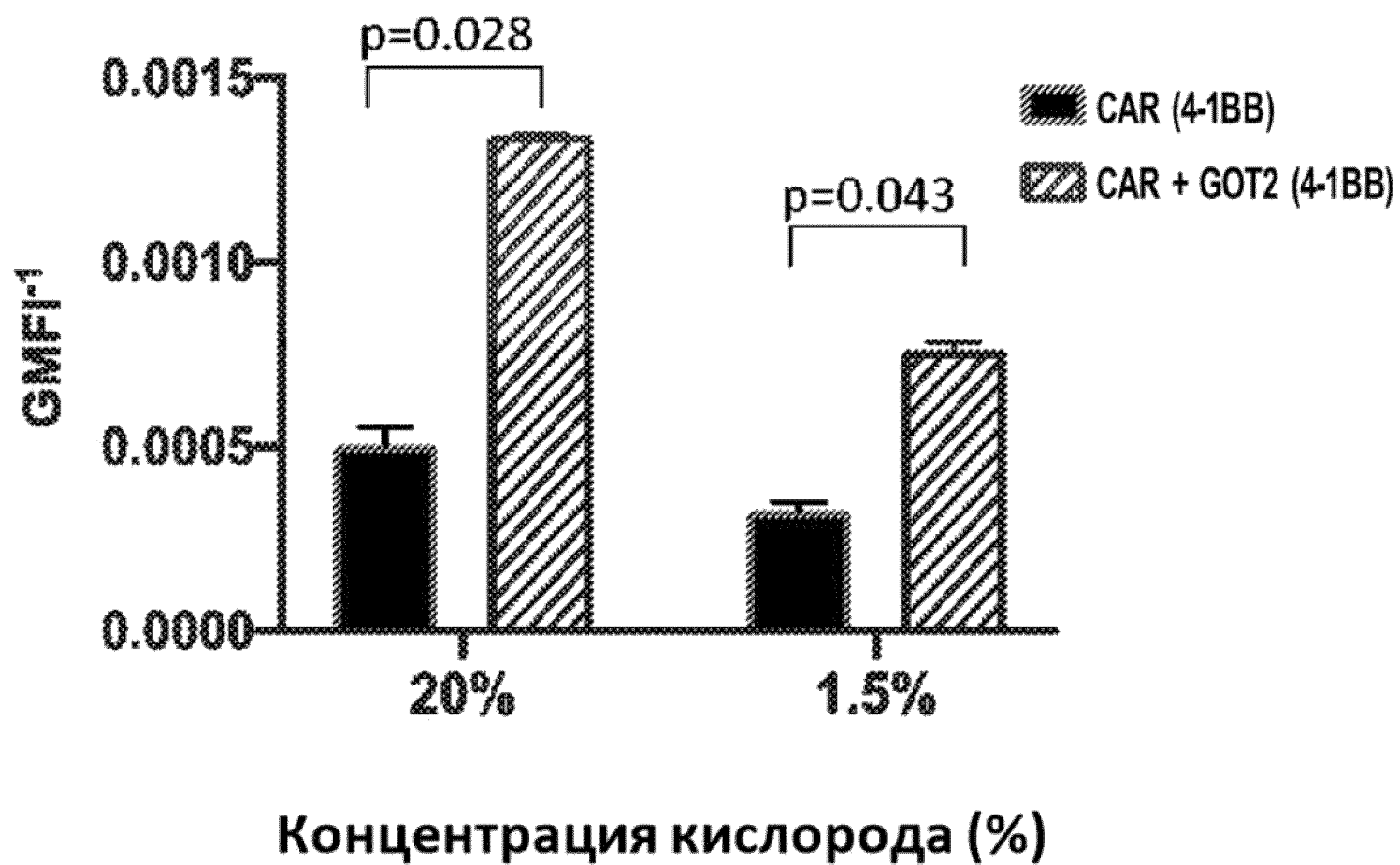
ACTR (CD28)
CD27+CD45RA+CD45RO-CD62L+



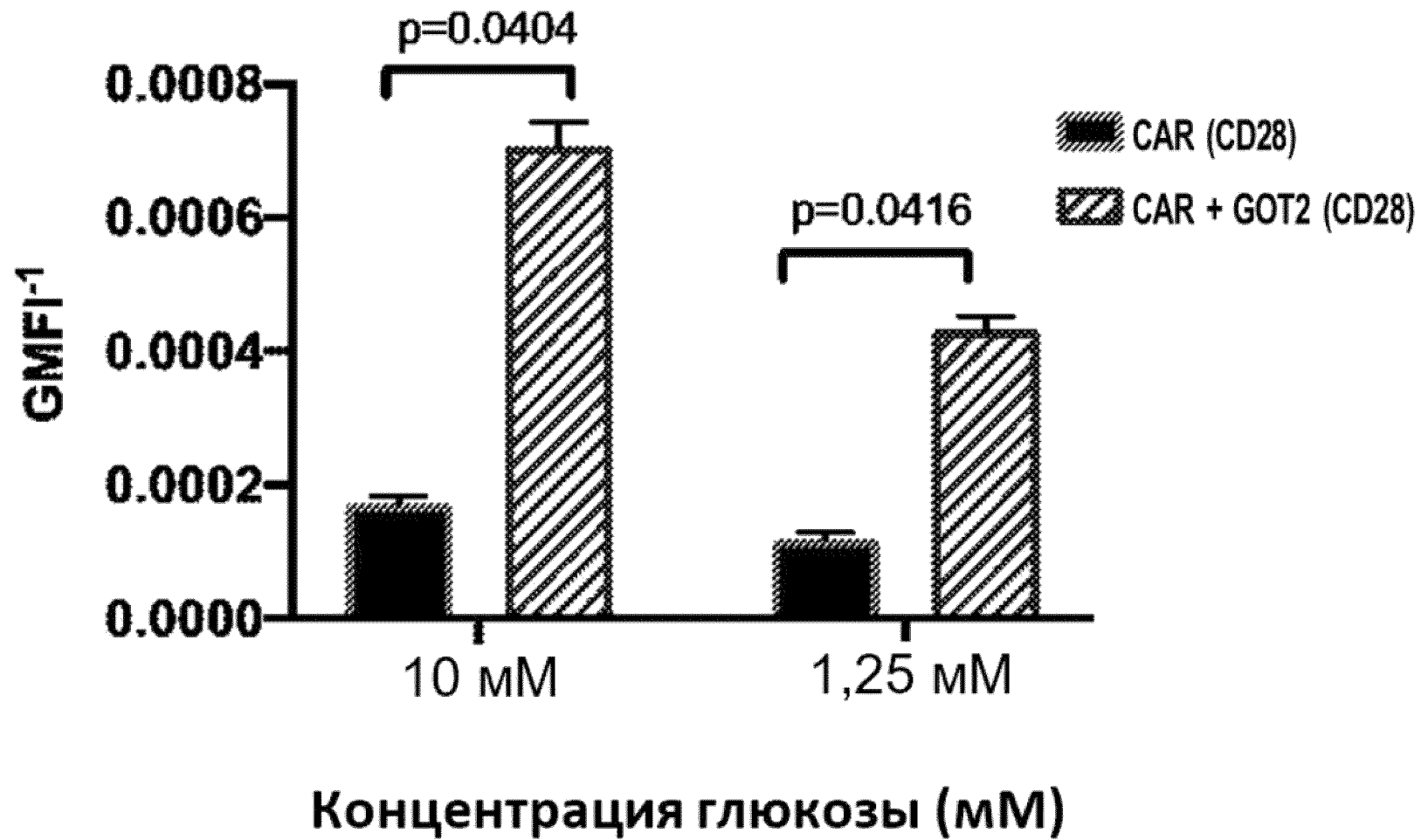
ФИГ. 13



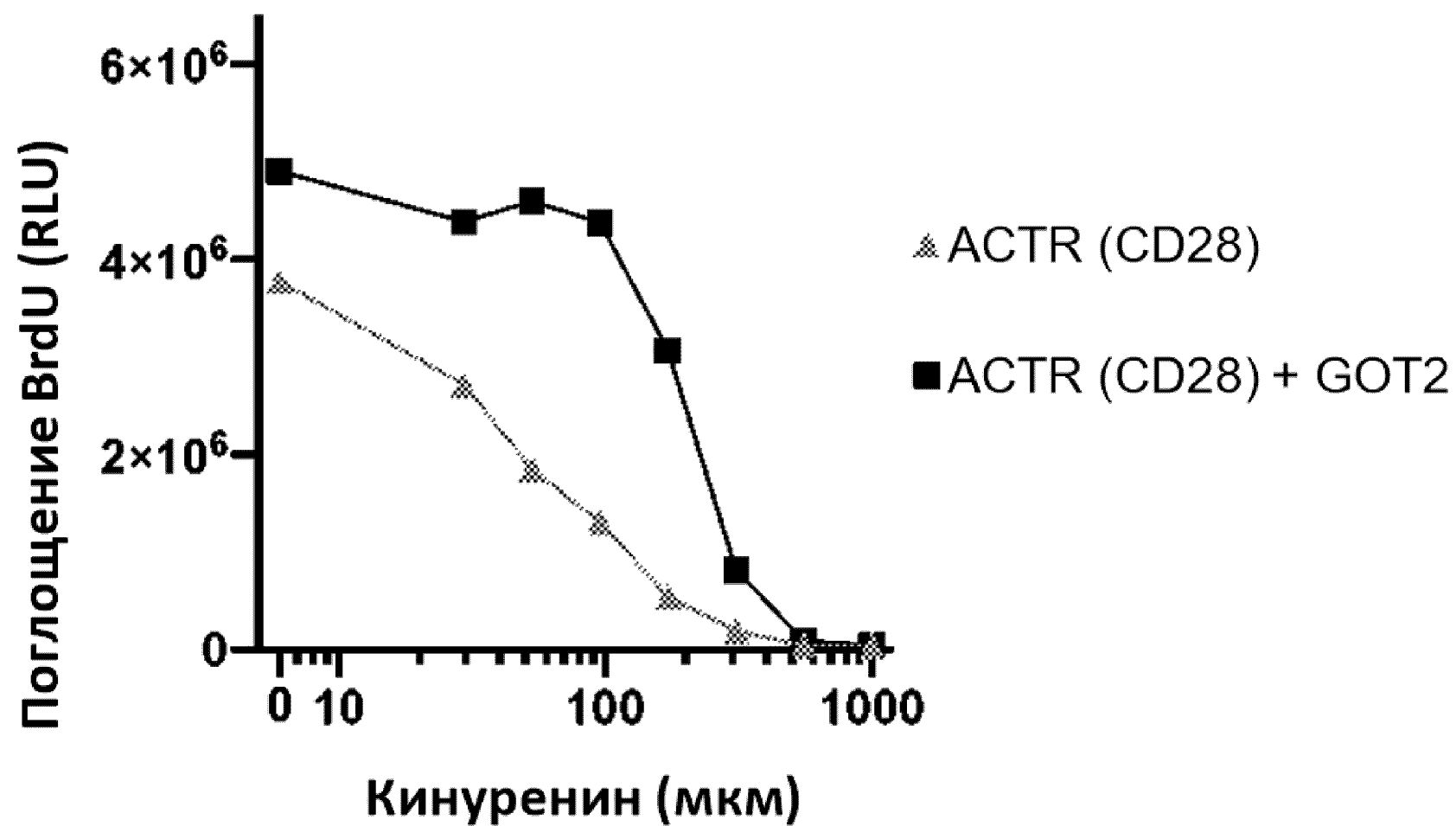
ФИГ. 14



ФИГ. 15

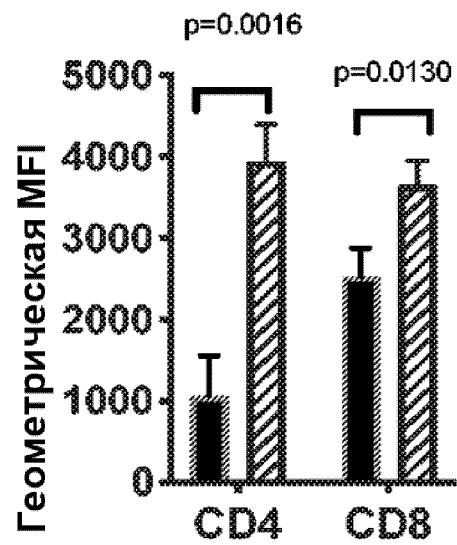


ФИГ. 16



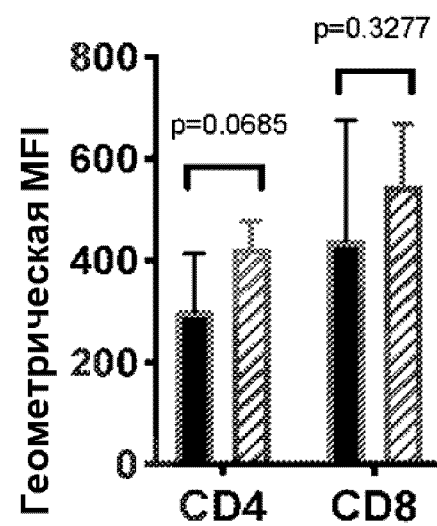
ФИГ. 17А

CD69



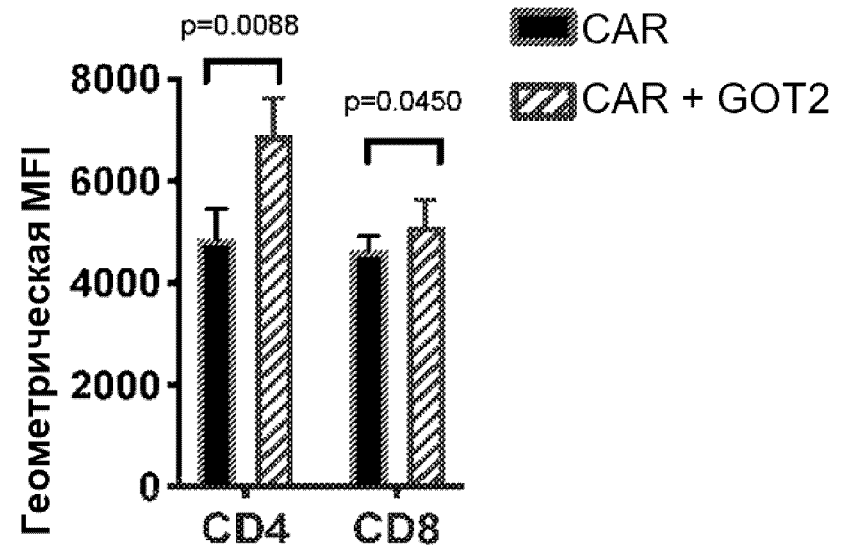
ФИГ. 17В

CD25



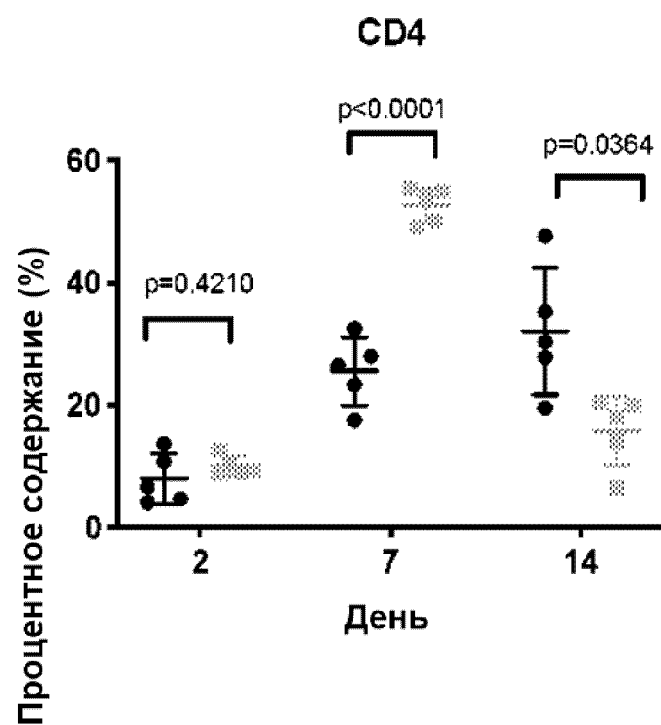
ФИГ. 17С

ICOS

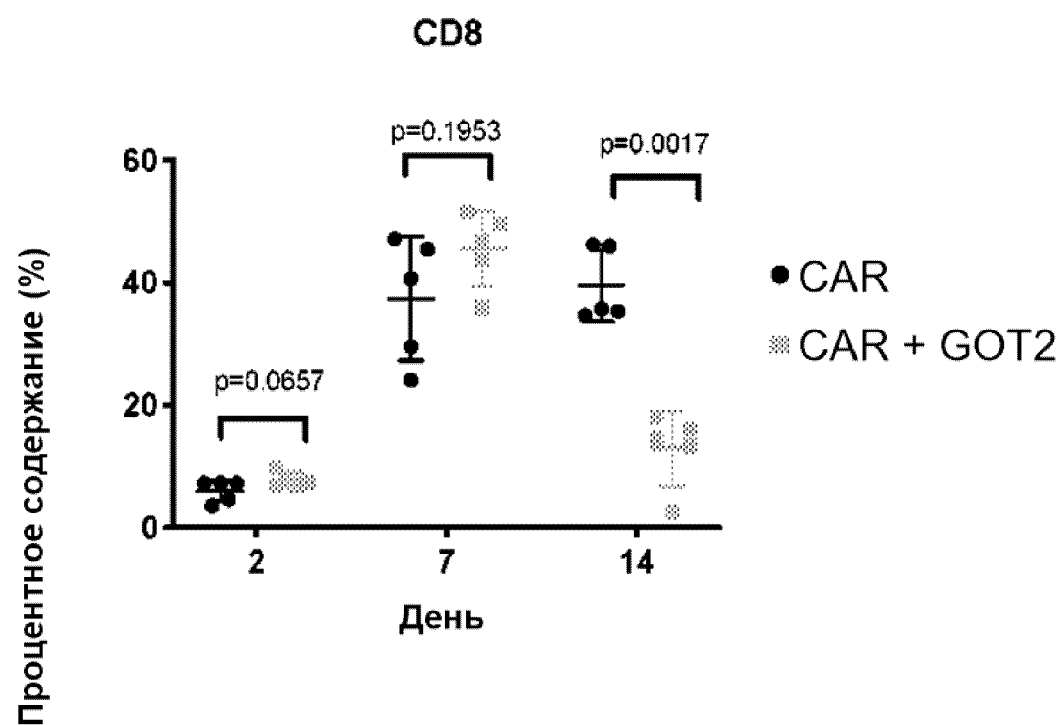


ФИГ. 18А

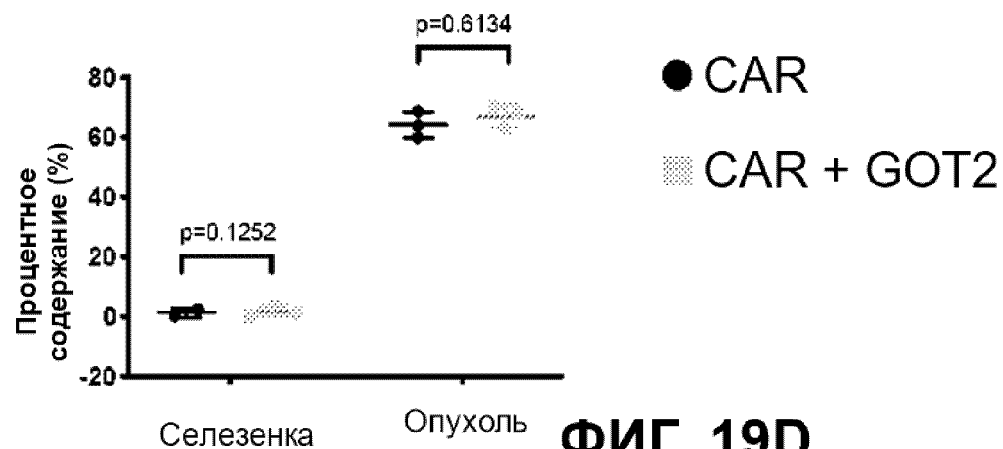
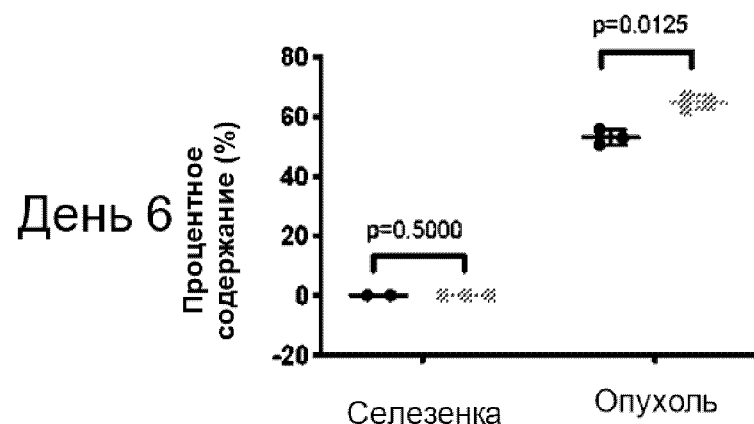
PD-1+TIM-3+



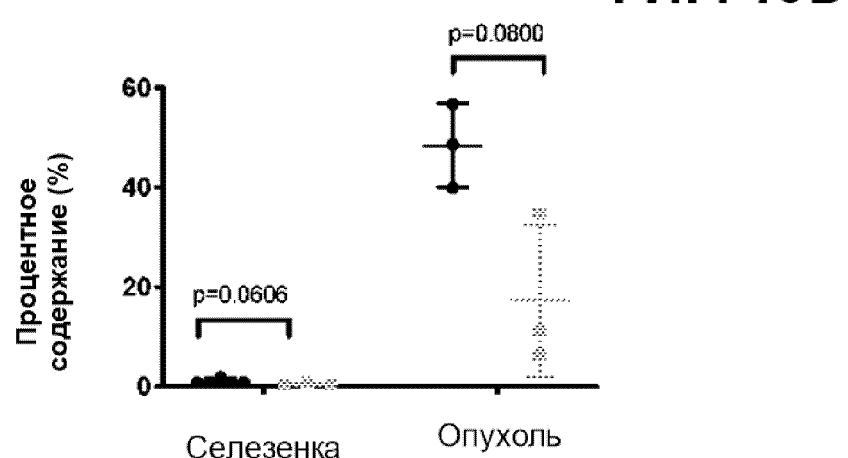
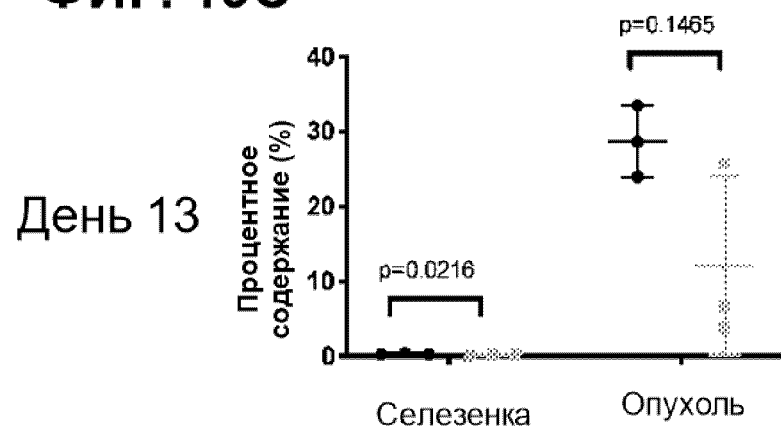
ФИГ. 18В



ФИГ. 19А Двойные положительные по PD-1+TIM-3+ **ФИГ. 19В**



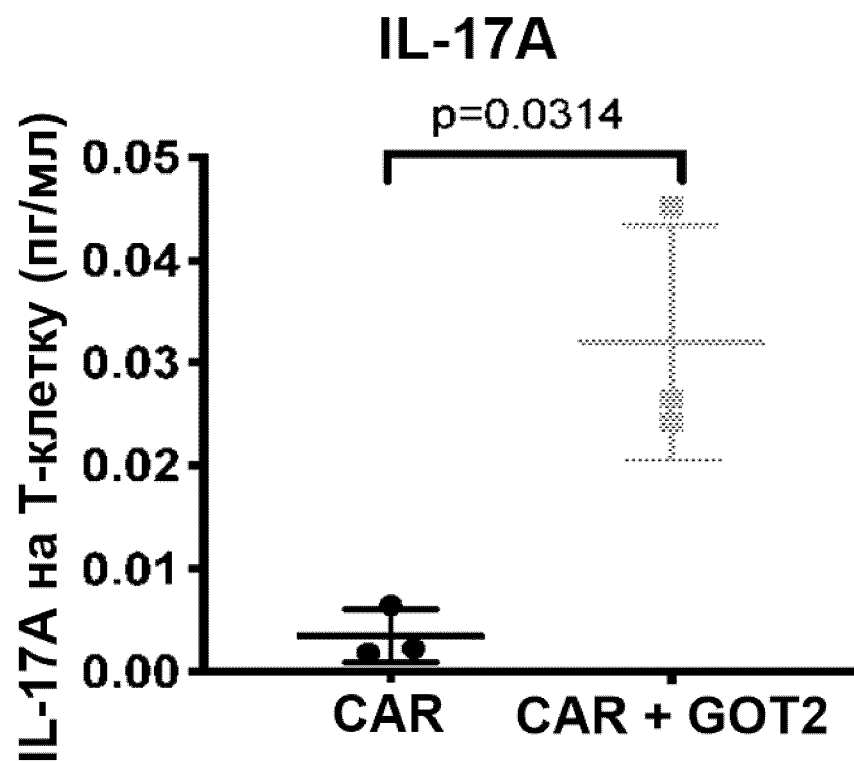
ФИГ. 19С



(процентное содержание
CD4+CD3+)

(процентное содержание
CD8+CD3+)

ФИГ. 20А



ФИГ. 20В

