

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202190573 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.07.14

(51) Int. Cl. C07K 16/30 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.08.30

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

(31) 62/725,098

(32) 2018.08.30

(33) US

(86) PCT/US2019/049202

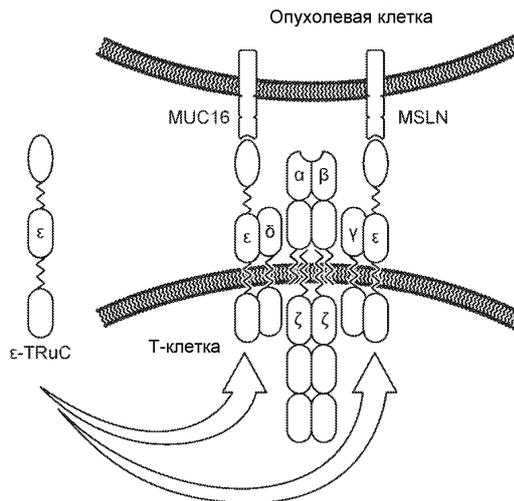
(87) WO 2020/047501 2020.03.05

(71) Заявитель:
TCR2 ТЕРАПЬЮТИКС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Баеурле Патрик Александр,
Хофмейстер Роберт, Дин Цзянь,
Ашминова Ваниа, Лофгрэн Майкл
(US)

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

(57) В настоящем документе предложены гибридные белки (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), обладающие специфичностью к более чем одному ассоциированному с опухолевыми клетками антигену, Т-клетки, сконструированные с возможностью экспрессии одного или более TFP, а также способы их применения для лечения заболеваний, включая рак.



202190573
A1

202190573
A1

**КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ TCR С
ПРИМЕНЕНИЕМ ГИБРИДНЫХ БЕЛКОВ
ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА**

[0001] Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/725098, поданной 30 августа 2018 г., которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

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

[0003] Недавние разработки, которые используют терапию на основе аутологических Т-клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами (CAR), которая основывается на перенаправлении генетически сконструированных Т-клеток на подходящую молекулу клеточной поверхности на раковых клетках, демонстрируют обещающие результаты с точки зрения применения возможностей иммунной системы для лечения раковых заболеваний. Например, клинические результаты продолжающегося исследования с применением Т-клеток с CAR, специфичным к антигену созревания В-клеток (BCMA), продемонстрировали частичную ремиссию у некоторых пациентов с множественной миеломой (одно такое исследование можно найти на clinicaltrials.gov по номеру NCT02215967). Альтернативный подход заключается в применении альфа- и бета-цепей Т-клеточного рецептора (TCR), выбранных для ассоциированного с опухолью пептидного антигена для генетически сконструированных аутологических Т-клеток. Такие цепи TCR будут образовывать полные комплексы TCR и обеспечивать Т-клетки TCR для второй определенной специфичности. Обнадеживающие результаты были получены для сконструированных аутологических Т-клеток, экспрессирующих альфа- и бета-цепи TCR, специфические к NY-ESO-1, у пациентов с синовиальной карциномой.

[0004] Помимо способности генетически модифицированных Т-клеток, экспрессирующих CAR или второй TCR, распознавать и уничтожать соответствующие клетки-мишени *in vitro/ex vivo*, успешная терапия для пациента с применением сконструированных Т-клеток требует, чтобы Т-клетки были способны к сильной активации, размножению, стойкости с течением времени и, в случае рецидива болезни, к обеспечению вторичного иммунного ответа. Высокая и контролируемая клиническая эффективность CAR-Т-клеток на текущий момент ограничена мезотелин-положительными В-клеточными злокачественными опухолями и пациентами, экспрессирующими HLA-A2, с экспрессирующими пептид NY-ESO-1 синовиальными саркомами. Существует очевидная потребность в улучшении генетически сконструированных Т-клеток для более широкого действия против различных злокачественных опухолей у человека. В настоящем документе описаны новые гибридные белки субъединиц TCR, включая CD3 эpsilon, CD3 gamma, CD3 delta, а также альфа- и бета-цепей TCR со связывающими доменами, специфическими к антигенам клеточной поверхности, которые могут потенциально преодолеть ограничения существующих подходов. В настоящем документе описаны новые гибридные белки, которые по сравнению с CAR более эффективно уничтожают клетки-мишени, однако высвобождают сравнительные или более низкие уровни провоспалительных цитокинов. Эти гибридные белки и способы их применения представляют собой преимущество TFP (гибридные белки Т-клеточного рецептора - T cell receptor (TCR) fusion proteins (TFP)) перед CAR, поскольку повышенные уровни таких цитокинов связаны с дозолимитирующей токсичностью адоптивной CAR-Т терапии.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В настоящем документе предложены связывающие белки, обладающие специфичностью к более чем одной мишени, а также антитела и гибридные белки (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащие такие связывающие белки с двойной специфичностью. Кроме того, предложены Т-клетки, сконструированные с возможностью экспрессировать один или более TFP, а также способы их применения для лечения заболеваний. TFP могут обладать двойной специфичностью на одной молекуле, или в одном сконструированном TCR; альтернативно, двойная специфичность может происходить от смешивания двух сконструированных популяций Т-клеток, содержащих TFP, или трансдукции одной популяции Т-клеток двумя различными вирусами.

[0006] Таким образом, в одном аспекте предложена композиция, содержащая выделенную молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую первый гибридный белок (TFP) комплекса Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий: субъединицу TCR, содержащую по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, трансмембранный домен

и внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена, полученного только из субъединицы TCR, выбранной из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, гамма-цепи CD3, дельта-цепи CD3 и эpsilon-цепи CD3; и домен мышинового, человеческого или гуманизированного антитела, содержащий связывающий домен против MUC16, причем субъединица TCR и связывающий домен против MUC16 функционально связаны, и при этом первый TFP функционально взаимодействует с TCR или внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке; и вторую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую второй TFP, содержащий субъединицу TCR, содержащую по меньшей мере часть внеклеточного домена субъединицы TCR, трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена, полученного только из субъединицы TCR, выбранной из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, гамма-цепи CD3, дельта-цепи CD3 и эpsilon-цепи CD3; и (b) домен мышинового, человеческого или гуманизированного антитела, содержащий связывающий домен против мезотелина (MSLN), причем субъединица TCR и связывающий домен против MSLN функционально связаны, и при этом второй TFP функционально взаимодействует с TCR или внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке.

[0007] В другом аспекте предложена композиция, содержащая первую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую первый гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий: субъединицу TCR, содержащую по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена, полученного только из субъединицы TCR, выбранной из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, гамма-цепи CD3, дельта-цепи CD3 и эpsilon-цепи CD3; и первый домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий связывающий домен против MUC16, и второй домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий связывающий домен против MSLN, причем субъединица TCR, первый домен антитела и второй домен антитела функционально связаны, и при этом первый TFP функционально взаимодействует с TCR или внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке.

[0008] В другом аспекте предложена композиция, содержащая выделенную молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую первый гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR, первый домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий первый антигенсвязывающий домен,

который представляет собой связывающий домен против MUC16; и второй гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR, второй домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий второй антигенсвязывающий домен, который представляет собой связывающий домен против MSLN, причем субъединица TCR первого TFP и первый домен антитела функционально связаны, и субъединица TCR второго TFP и второй домен антитела функционально связаны.

[0009] В другом аспекте предложена композиция, содержащая выделенную молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую первый гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу комплекса TCR, первый домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который представляет собой связывающий домен против MUC16, и второй домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий второй антигенсвязывающий домен, который представляет собой связывающий домен против MSLN; и причем субъединица TCR первого TFP, первый домен антитела и второй домен антитела функционально связаны.

[0010] В одном варианте осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены кодируемой субъединицы TCR первого TFP получены только из субъединицы TCR, выбранной из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, гамма-цепи CD3, дельта-цепи CD3 и эпсилон-цепи CD3. В другом варианте осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из субъединицы TCR, выбранной из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR и эпсилон-цепи TCR. В другом варианте осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR первого TFP получены только из альфа-цепи TCR. В другом варианте осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR первого TFP получены только из бета-цепи TCR. В другом варианте осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR первого TFP получены только из гамма-цепи TCR. В другом варианте осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR первого TFP получены только из дельта-цепи TCR. В другом варианте осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR первого TFP получены только из гамма-цепи CD3. В другом варианте осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR первого TFP получены только из дельта-цепи CD3. В другом

варианте осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR первого TFP получены только из эпсилон-цепи CD3.

[0011] В другом варианте осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из альфа-цепи TCR. В другом варианте осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из бета-цепи TCR. В другом варианте осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из гамма-цепи TCR. В другом варианте осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из дельта-цепи TCR. В другом варианте осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из гамма-цепи CD3. В другом варианте осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из дельта-цепи CD3. В другом варианте осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из эпсилон-цепи CD3.

[0012] В одном варианте осуществления первый TFP, второй TFP или и тот, и другой внедряются в TCR или функционально взаимодействуют с TCR при экспрессии в Т-клетке. В другом варианте осуществления первый TFP, второй TFP или и тот, и другой внедряются в TCR или функционально взаимодействуют с TCR при экспрессии в Т-клетке. В другом варианте осуществления кодируемый первый антигенсвязывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR первого TFP посредством первой линкерной последовательности, кодируемый второй антигенсвязывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR второго TFP посредством второй линкерной последовательности, или и первый антигенсвязывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR первого TFP посредством первой линкерной последовательности, и кодируемый второй антигенсвязывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR второго TFP посредством второй линкерной последовательности. В другом варианте осуществления первая линкерная последовательность и вторая линкерная последовательность содержат $(G_4S)_n$, где n=от 1 до 4. В другом варианте осуществления субъединица TCR первого TFP, субъединица TCR второго TFP или и та, и другая содержат внеклеточный домен TCR. В другом варианте осуществления субъединица TCR первого TFP, субъединица TCR второго TFP или и та, и другая содержат трансмембранный домен TCR. В другом варианте осуществления субъединица TCR первого TFP, субъединица TCR

второго TFP или и та, и другая содержат внутриклеточный домен TCR. В другом варианте осуществления субъединица TCR первого TFP, субъединица TCR второго TFP или и та, и другая содержат (i) внеклеточный домен TCR, (ii) трансмембранный домен TCR и (iii) внутриклеточный домен TCR, причем по меньшей мере два из (i), (ii) и (iii) относятся к одной субъединице TCR. В другом варианте осуществления субъединица TCR первого TFP, субъединица TCR второго TFP или и та, и другая содержат внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен, выбранный из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, или аминокислотную последовательность, имеющую в дополнение по меньшей мере одну модификацию. В другом варианте осуществления субъединица TCR первого TFP, субъединица TCR второго TFP или и та, и другая содержат внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен, выбранный из функционального сигнального домена 4-1BB и/или функционального сигнального домена CD3 дзета, или аминокислотную последовательность, имеющую в дополнение по меньшей мере одну модификацию.

[0013] В одном варианте осуществления первый домен человеческого или гуманизированного антитела, второй домен человеческого или гуманизированного антитела или и тот, и другой содержат фрагмент антитела. В другом варианте осуществления первый домен человеческого или гуманизированного антитела, второй домен человеческого или гуманизированного антитела или и тот, и другой содержат scFv или домен V_H. В другом варианте осуществления композиция содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую (i) CDR1 легкой цепи (LC), CDR2 LC и CDR3 LC аминокислотной последовательности связывающего домена легкой цепи с 70–100% идентичности последовательности с последовательностью легкой цепи из таблицы 2 и/или (ii) CDR1 тяжелой цепи (HC), CDR2 HC и CDR3 HC последовательности тяжелой цепи из таблицы 2. В одном варианте осуществления рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует переменный участок легкой цепи, причем переменный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи из таблицы 2, или последовательность с 95–99% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного участка легкой цепи из таблицы 2. В другом варианте осуществления композиция содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей переменный участок тяжелой цепи, причем переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций аминокислотной последовательности переменного участка тяжелой цепи из таблицы 2, или последовательность с 95–99% идентичности с

аминокислотной последовательностью варибельного участка тяжелой цепи из таблицы 2. В одном варианте осуществления кодируемый первый TFP, кодируемый второй TFP или и тот, и другой включают в себя внеклеточный домен субъединицы TCR, который содержит внеклеточный домен, или его часть, из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В другом варианте осуществления кодируемый первый TFP и кодируемый второй TFP включают в себя трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

[0014] В одном варианте осуществления кодируемый первый TFP и кодируемый второй TFP включают в себя трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, дзета-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В другом варианте осуществления рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую костимулирующий домен. В другом варианте осуществления костимулирующий домен является функциональным сигнальным доменом, полученным из белка, выбранного из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137), а также их аминокислотных последовательностей, имеющих в дополнение по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В другом варианте осуществления рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую внутриклеточный сигнальный домен. В другом варианте осуществления рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую лидерную последовательность. В другом варианте осуществления рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую участок расщепления протеазой. В одном варианте осуществления в дополнение по меньшей мере одна, но не более 20 модификаций содержат модификацию аминокислоты, которая опосредует клеточную сигнализацию, или модификацию аминокислоты, которая фосфорилируется в ответ на связывание лиганда с первым TFP, со

вторым TFP или и с тем, и с другим.

[0015] В одном варианте осуществления выделенная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты представляет собой мРНК.

[0016] В одном варианте осуществления первый TFP, второй TFP или и тот, и другой включают в себя иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) субъединицы TCR, который содержит ITAM, или его часть, белка, выбранного из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, дзета-цепи TCR, цепи Fc-эпсилон-рецептора 1, цепи Fc-эпсилон-рецептора 2, цепи Fc-гамма-рецептора 1, цепи Fc-гамма-рецептора 2a, цепи Fc-гамма-рецептора 2b1, цепи Fc-гамма-рецептора 2b2, цепи Fc-гамма-рецептора 3a, цепи Fc-гамма-рецептора 3b, цепи Fc-бета-рецептора 1, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих в дополнение по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

[0017] В другом варианте осуществления ITAM замещает ITAM CD3 гамма, CD3 дельта или CD3 эпсилон. В другом варианте осуществления ITAM выбран из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта, и замещает другой ITAM, выбранный из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта. В одном варианте осуществления кодируемая рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит лидерную последовательность.

[0018] В другом аспекте предложена композиция, содержащая полипептидную молекулу, кодируемую любой из молекул нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе. В одном варианте осуществления полипептид содержит первый полипептид, кодируемый первой молекулой нуклеиновой кислоты, и второй полипептид, кодируемые второй молекулой нуклеиновой кислоты.

[0019] В другом аспекте предложена композиция, содержащая молекулу рекомбинантного TFP, кодируемую любой из молекул нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе.

[0020] В другом аспекте предложена композиция, содержащая вектор, кодирующий полипептид или молекулу рекомбинантного TFP, описанные в настоящем документе. В одном варианте осуществления вектор содержит а) первый вектор, содержащий первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый TFP; и б) второй вектор,

содержащий вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй TFP. В другом варианте осуществления вектор содержит первый TFP и второй TFP, причем последовательность, кодирующая первый TFP, и последовательность, кодирующая второй TFP, разделены участком расщепления. Вектор выбирается из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, вектора на основе вируса саркомы Рауса (ВСП) или ретровирусного вектора. В одном варианте осуществления вектор содержит промотор. В одном варианте осуществления вектор представляет собой транскрибированный *in vitro* вектор. В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно кодирует поли(А)-хвост. В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно кодирует 3'-UTR. В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно кодирует участок расщепления протеазой.

[0021] В одном варианте осуществления композиция дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанной со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена. В другом варианте осуществления ингибирующая молекула содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть PD1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и домен первичной сигнализации.

[0022] В другом аспекте предложен вектор, содержащий последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем документе. В одном варианте осуществления вектор содержит первую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты. В другом варианте осуществления вектор содержит вторую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

[0023] В другом аспекте предложена клетка, содержащая композицию, содержащую любую из выделенных молекул рекомбинантных нуклеиновых кислот, векторов или полипептидов, описанных в настоящем документе. В одном варианте осуществления клетка представляет собой человеческую Т-клетку. В другом варианте осуществления Т-клетка представляет собой CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетку. В одном варианте осуществления клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанной со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена. В одном варианте осуществления ингибирующая

молекула содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть PD1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и домен первичной сигнализации.

[0024] В другом аспекте предложена человеческая CD8⁺ или CD4⁺ T-клетка, содержащая по меньшей мере две молекулы TFP, содержащие связывающий домен против MUC16, связывающий домен против MSLN, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR в человеческой CD8⁺ или CD4⁺ T-клетке, около нее и/или на ее поверхности. В другом варианте осуществления предложен белковый комплекс, содержащий первую молекулу TFP, содержащую связывающий домен против MUC16, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; вторую молекулу TFP, содержащую связывающий домен против MSLN, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; и по меньшей мере одну эндогенную субъединицу TCR или эндогенный комплекс TCR.

[0025] В другом аспекте предложен белковый комплекс, содержащий молекулу TFP, содержащую связывающий домен против MUC16, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; а также по меньшей мере одну эндогенную субъединицу TCR или эндогенный комплекс TCR.

[0026] В другом аспекте предложен белковый комплекс, содержащий молекулу TFP, содержащую связывающий домен против MSLN, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; а также по меньшей мере одну эндогенную субъединицу TCR или эндогенный комплекс TCR.

[0027] В одном варианте осуществления TCR в белковом комплексе содержит внеклеточный домен, или его часть, из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта. В одном варианте осуществления связывающий домен против MUC16, связывающий домен против MSLN или и тот, и другой соединены с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В одном варианте осуществления линкерная область содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 4.

[0028] В другом аспекте предложена человеческая CD8⁺ или CD4⁺ T-клетка, содержащая по меньшей мере два разных белка TFP в любом из белковых комплексов, описанных в настоящем документе. В другом аспекте предложена человеческая CD8⁺ или CD4⁺ T-клетка, содержащая по меньшей мере две разных молекулы TFP, кодируемые любой из выделенных молекул нуклеиновых кислот, описанных в настоящем

документе.

[0029] В другом аспекте предложена популяция человеческих CD8⁺ или CD4⁺ Т-клеток, причем Т-клетки популяции отдельно или в совокупности содержат по меньшей мере две молекулы TFP, содержащие связывающий домен против MUC16, или связывающий домен против MSLN, или как связывающий домен против MUC16, так и связывающий домен против MSLN, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR в человеческой CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетке, около нее и/или на ее поверхности.

[0030] В другом аспекте предложена популяция человеческих CD8⁺ или CD4⁺ Т-клеток, причем Т-клетки популяции отдельно или в совокупности содержат по меньшей мере две молекулы TFP, кодируемые любой из выделенных молекул рекомбинантных нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе. В другом аспекте предложена фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество композиции, вектора, клетки или белкового комплекса, описанных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[0031] В другом аспекте предложен способ лечения млекопитающего с заболеванием, связанным с экспрессией MSLN или MUC16, включающий в себя введение млекопитающему эффективного количества любой из описанных в настоящем документе композиций. В одном варианте осуществления заболевание, связанное с экспрессией MSLN или MUC16, выбрано из группы, состоящей из пролиферативного заболевания, рака, злокачественной опухоли, миелодисплазии, миелодиспластического синдрома, предлейкоза, неассоциированного с раком признака, связанного с экспрессией MUC16, неассоциированного с раком признака, связанного с экспрессией MSLN, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака кожи, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака почки, рака печени, рака головного мозга, лимфомы, лейкоза, рака легкого, рака пищевода, рака желудка и неоперабельного рака яичника с рецидивирующим или рефрактерным заболеванием. В другом варианте осуществления заболевание представляет собой рак крови, выбранный из группы, состоящей из В-клеточного острого лимфоидного лейкоза (В-ОЛЛ), Т-клеточного острого лимфоидного лейкоза (Т-ОЛЛ), острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ); хронического миелолейкоза (ХМЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, бластного образования из плазмцитоподобных дендритных клеток, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, мелкоклеточной фолликулярной

лимфомы, крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественных лимфопролиферативных состояний, MALT-лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, лимфомы из клеток маргинальной зоны, множественной миеломы, миелодисплазии, миелодиспластического синдрома, неходжкинской лимфомы, плазмобластической лимфомы, новообразования из плазмоцитоподобных дендритных клеток, макроглобулинемии Вальденстрема, предлейкоза, заболевания, связанного с экспрессией MUC16 или MSLN, или их комбинаций. В другом варианте осуществления клетка или популяция клеток, экспрессирующих первую молекулу TFP и вторую молекулу TFP, вводятся в комбинации с веществом, которое повышает эффективность клетки или популяции клеток, экспрессирующих первую молекулу TFP и вторую молекулу TFP. В одном варианте осуществления у млекопитающего высвобождается меньше цитокинов по сравнению с млекопитающим, которому вводят эффективное количество Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) против MSLN, CAR против MUC16, CAR против MSLN и CAR против MUC16; или их комбинацию. В другом варианте осуществления клетки, экспрессирующие первую молекулу TFP и вторую молекулу TFP, вводятся в комбинации с веществом, которое облегчает один или более побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей первую молекулу TFP и вторую молекулу TFP. В другом варианте осуществления первая молекула TFP и вторая молекула TFP вводятся в комбинации с веществом, которое лечит заболевание, связанное с MSLN или MUC16.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0032] Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в данном описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0033] На **фиг. 1** представлено изображение, показывающее некоторые способы двойного нацеливания на раковые клетки, описанные в настоящем документе. Антигены-мишени опухолевых клеток MUC16 и MSLN являются иллюстративными антигенами.

[0034] На **фиг. 2** изображены белковые последовательности, показывающие связывающий эпитоп на последовательности эктодомена MUC16 антител к MUC16 R3MU4 и R3MU29 в сравнении с описанным эпитопом другого антитела, 4H11.

[0035] На **фиг. 3** представлена серия изображений из анализа FACS клеток Jurkat, которые не были трансдуцированы (фиг. 3А, «NT»), были трансдуцированы TFP против мезотелина (фиг. 3В, «MSLN TFP»), были трансдуцированы TFP против MUC16 (фиг. 3С, «MUC16

TFP») или TFP с двойной специфичностью (фиг. 3D). Все клетки Jurkat (NT, MSLN TFP, MUC16 TFP, TFP с двойной специфичностью) сначала одновременно окрашивали меченым Fc_MSLN и MUC16-биотином, а затем окрашивали стрептавидином-PE.

[0036] На **фиг. 4** представлен график, показывающий измерение выработки IL-2 клетками Jurkat, которые не были трансдуцированы или были трансдуцированы MSLN TFP, MUC16 TFP или TFP с двойной специфичностью и совместно культивировались с клетками K562 («DN», круги), клетками K562, экспрессирующими MSLN («MSLN+», квадраты), клетками K562, экспрессирующими MUC16 («MUC16+», направленные вверх стрелки), и клетками K562, экспрессирующими оба белка («DP», направленные вниз стрелки).

[0037] На **фиг. 5** представлена серия изображений из анализа FACS первичных человеческих Т-клеток, трансдуцированных различными конструкциями. Т-клетки NT (нетрансдуцированные), MSLN TFP, MUC16 TFP и TFP с двойной специфичностью были получены из Т-клеток здорового донора путем трансдукции лентивирусом, кодирующим моноспецифические или двойные специфические TFP. Клетки были размножены и окрашены, как описано для фиг. 3. Экспрессия MSLN-специфических TFP (фиг. 5C), а не MUC16 TFP (фиг. 5D), была обнаружена для Т-клеток MSLN TFP; кроме того, MUC16 TFP (фиг. 5F), а не MSLN TFP (фиг. 5E), были обнаружены для Т-клеток MUC16 TFP. Для Т-клеток TFP с двойной специфичностью на поверхности трансдуцированных клеток были обнаружены как MSLN TFP, так и MUC16 TFP (фиг. 5G и 5H). Для клеток Jurkat NT не было обнаружено ни MSLN TFP, ни MUC16 TFP (фиг. 5A и 5B).

[0038] На **фиг. 6** представлен график, показывающий измерение цитотоксичности (в виде процента от общей величины) первичными человеческими Т-клетками, которые не были трансдуцированы или были трансдуцированы MSLN TFP, MUC16 TFP или TFP с двойной специфичностью и совместно культивировались с клетками K562 («DN», круги), клетками K562, экспрессирующими MSLN («MSLN+», квадраты), клетками K562, экспрессирующими MUC16 («MUC16+», направленные вверх стрелки), и клетками K562, экспрессирующими оба белка («DP», направленные вниз стрелки).

[0039] На **фиг. 7A-C** представлена серия графиков, показывающих мишень-специфическую выработку цитокинов первичными человеческими Т-клетками, которые не были трансдуцированы или были трансдуцированы MSLN TFP, MUC16 TFP или TFP с двойной специфичностью и совместно культивировались с клетками K562 («DN», круги), клетками K562, экспрессирующими MSLN («MSLN+», квадраты), клетками K562, экспрессирующими MUC16 («MUC16+», направленные вверх стрелки), и клетками K562, экспрессирующими оба белка («DP», направленные вниз стрелки). Измеряемыми цитокинами были ИФН- γ (фиг. 7A), ГМ-КСФ (фиг. 7B) и ФНО- α (фиг. 7C).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0040] В настоящем документе предложены композиции вещества и способы применения для лечения заболевания, такого как рак, используя гибридные белки Т-клеточного рецептора (TCR) с двойной специфичностью или популяции Т-клеток с двойной специфичностью. Как используется в настоящем документе, «гибридный белок Т-клеточного рецептора (TCR)» или «TFP» включает в себя рекомбинантный полипептид, полученный из различных полипептидов, содержащих TCR, который, как правило, способен i) связываться с поверхностным антигеном на клетках-мишенях и ii) взаимодействовать с другими полипептидными компонентами интактного комплекса TCR, как правило, при совместном размещении в Т-клетке или на ее поверхности. Как предлагается в настоящем документе, TFP обеспечивают значительные преимущества по сравнению с химерными антигенными рецепторами. Термин «химерный антигенный рецептор» или альтернативно «CAR» относится к рекомбинантному полипептиду, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен в форме scFv, трансмембранный домен и домены цитоплазматической сигнализации (также называемые в настоящем документе как «внутриклеточные сигнальные домены»), содержащие функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы, как определено ниже. В целом, центральный внутриклеточный сигнальный домен CAR получают из дзета-цепи CD3, которая обычно связана с комплексом TCR. Сигнальный домен CD3 дзета может быть конденсирован с одним или более функциональных сигнальных доменов, полученных из по меньшей мере одной костимулирующей молекулы, такой как 4-1BB (т. е., CD137), CD27 и/или CD28.

[0041] В одном аспекте в настоящем документе предложена композиция, содержащая (I) первую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую первый гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий (a) субъединицу TCR, содержащую (i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена, полученного только из субъединицы TCR, выбранной из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи CD3, дельта-цепи CD3 и эпсилон-цепи CD3; и (b) домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий связывающий домен против MUC16, причем субъединица TCR и связывающий домен против MUC16 функционально связаны, и при этом первый TFP функционально взаимодействует с TCR или внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке; и (II) вторую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую TFP, содержащий (a) субъединицу TCR, содержащую (i) по меньшей мере часть

внуклеточного домена TCR, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена, полученного только из субъединицы TCR, выбранной из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи CD3, дельта-цепи CD3 и эпсилон-цепи CD3; и (b) домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий связывающий домен против мезотелина (MSLN), причем субъединица TCR и связывающий домен против MSLN функционально связаны, и при этом второй TFP функционально взаимодействует с TCR или внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке.

[0042] В одном аспекте в настоящем документе предложена композиция, содержащая (I) первую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую первый гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR, содержащую по меньшей мере часть внуклеточного домена TCR, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена, полученного только из субъединицы TCR, выбранной из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи CD3, дельта-цепи CD3 и эпсилон-цепи CD3; и первый домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий связывающий домен против MUC16, и второй домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий связывающий домен против MSLN, причем субъединица TCR, первый домен антитела и второй домен антитела функционально связаны, и при этом первый TFP функционально взаимодействует с TCR или внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке.

[0043] В одном аспекте в настоящем документе предложена композиция, содержащая молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую: первый гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR, первый домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который представляет собой связывающий домен против MUC16; и второй гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR, второй домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий второй антигенсвязывающий домен, который представляет собой связывающий домен против MSLN, причем субъединица TCR первого TFP и первый домен антитела функционально связаны, и субъединица TCR второго TFP и второй домен антитела функционально связаны.

[0044] В одном аспекте в настоящем документе предложена композиция, содержащая молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую: первый гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR, первый домен

человеческого или гуманизированного антитела, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который представляет собой связывающий домен против MUC16, и второй домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий второй антигенсвязывающий домен, который представляет собой связывающий домен против MSLN; и причем субъединица TCR первого TFP, первый домен антитела и второй домен антитела функционально связаны.

[0045] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR первого TFP получены только из субъединицы TCR, выбранной из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи CD3, дельта-цепи CD3 и эpsilon-цепи CD3.

[0046] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из субъединицы TCR, выбранной из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR и эpsilon-цепи TCR.

[0047] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR первого TFP получены только из альфа-цепи TCR.

[0048] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR первого TFP получены только из бета-цепи TCR.

[0049] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR первого TFP получены только из гамма-цепи TCR.

[0050] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR первого TFP получены только из дельта-цепи TCR.

[0051] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR первого TFP получены только из гамма-цепи CD3.

[0052] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR первого TFP получены только из дельта-цепи CD3.

[0053] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR первого TFP получены только из эpsilon-цепи CD3.

[0054] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из альфа-цепи TCR.

[0055] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из бета-цепи TCR.

[0056] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из гамма-цепи TCR.

[0057] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из дельта-цепи TCR.

[0058] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из гамма-цепи CD3.

[0059] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из дельта-цепи CD3.

[0060] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из эпсилон-цепи CD3.

[0061] В некоторых вариантах осуществления первый TFP, второй TFP или и тот, и другой внедряются в TCR или функционально взаимодействуют с TCR при экспрессии в Т-клетке.

[0062] В некоторых вариантах осуществления первый TFP, второй TFP или и тот, и другой внедряются в TCR или функционально взаимодействуют с TCR при экспрессии в Т-клетке.

[0063] В некоторых вариантах осуществления кодируемый первый антигенсвязывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR первого TFP посредством первой линкерной последовательности, кодируемый второй антигенсвязывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR второго TFP посредством второй линкерной последовательности, или и первый антигенсвязывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR первого TFP посредством первой линкерной последовательности, и кодируемый второй антигенсвязывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR второго TFP посредством второй линкерной последовательности.

[0064] В некоторых вариантах осуществления первая линкерная последовательность и вторая линкерная последовательность содержат $(G4S)_n$, где n =от 1 до 4.

[0065] В некоторых вариантах осуществления субъединица TCR первого TFP, субъединица TCR второго TFP или и та, и другая содержат внеклеточный домен TCR.

[0066] В некоторых вариантах осуществления субъединица TCR первого TFP, субъединица TCR второго TFP или и та, и другая содержат трансмембранный домен TCR.

[0067] В некоторых вариантах осуществления субъединица TCR первого TFP, субъединица TCR второго TFP или и та, и другая содержат внутриклеточный домен TCR.

[0068] В некоторых вариантах осуществления субъединица TCR первого TFP, субъединица TCR второго TFP или и та, и другая содержат (i) внеклеточный домен TCR, (ii) трансмембранный домен TCR и (iii) внутриклеточный домен TCR, причем по меньшей мере два из (i), (ii) и (iii) относятся к одной субъединице TCR.

[0069] В некоторых вариантах осуществления субъединица TCR первого TFP, субъединица TCR второго TFP или и та, и другая содержат внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен, выбранный из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, или аминокислотную последовательность, имеющую в дополнение по меньшей мере одну модификацию.

[0070] В некоторых вариантах осуществления субъединица TCR первого TFP, субъединица TCR второго TFP или и та, и другая содержат внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен, выбранный из функционального сигнального домена 4-1BB и/или функционального сигнального домена CD3 дзета, или аминокислотную последовательность, имеющую в дополнение по меньшей мере одну модификацию.

[0071] В некоторых вариантах осуществления первый домен человеческого или гуманизованного антитела, второй домен человеческого или гуманизованного антитела или и тот, и другой содержат фрагмент антитела.

[0072] В некоторых вариантах осуществления первый домен человеческого или гуманизованного антитела, второй домен человеческого или гуманизованного антитела или и тот, и другой содержат scFv или домен VH.

[0073] В некоторых вариантах осуществления композиция кодирует (i) CDR1 легкой цепи (LC), CDR2 LC и CDR3 LC аминокислотной последовательности связывающего домена легкой цепи с 70–100% идентичности последовательности с последовательностью легкой цепи из таблицы 2 и/или (ii) CDR1 тяжелой цепи (HC), CDR2 HC и CDR3 HC последовательности тяжелой цепи из таблицы 2.

[0074] В некоторых вариантах осуществления композиция кодирует переменный участок легкой цепи, причем переменный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи из таблицы 2, или

последовательность с 95–99% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного участка легкой цепи из таблицы 2.

[0075] В некоторых вариантах осуществления композиция кодирует переменный участок тяжелой цепи, причем переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций аминокислотной последовательности переменного участка тяжелой цепи из таблицы 2, или последовательность с 95–99% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного участка тяжелой цепи из таблицы 2.

[0076] В некоторых вариантах осуществления кодируемый первый TFP, кодируемый второй TFP или и тот, и другой включают в себя внеклеточный домен субъединицы TCR, который содержит внеклеточный домен, или его часть, из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

[0077] В некоторых вариантах осуществления кодируемый первый TFP и кодируемый второй TFP включают в себя трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

[0078] В некоторых вариантах осуществления кодируемый первый TFP и кодируемый второй TFP включают в себя трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, дзета-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

[0079] В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит последовательность, кодирующую костимулирующий домен.

[0080] В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен является функциональным сигнальным доменом, полученным из белка, выбранного из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CD28, CD30, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137), а также их аминокислотных последовательностей, имеющих в

дополнение по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

[0081] В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит последовательность, кодирующую внутриклеточный сигнальный домен.

[0082] В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит лидерную последовательность.

[0083] В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит участок расщепления протеазой.

[0084] В некоторых вариантах осуществления в дополнение по меньшей мере одна, но не более 20 модификаций содержат модификацию аминокислоты, которая опосредует клеточную сигнализацию, или модификацию аминокислоты, которая фосфорилируется в ответ на связывание лиганда с первым TFP, со вторым TFP или и с тем, и с другим.

[0085] В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой мРНК.

[0086] В некоторых вариантах осуществления первый TFP, второй TFP или и тот, и другой включают в себя иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) субъединицы TCR, который содержит ITAM, или его часть, белка, выбранного из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, дзета-цепи TCR, цепи Fc-эпсилон-рецептора 1, цепи Fc-эпсилон-рецептора 2, цепи Fc-гамма-рецептора 1, цепи Fc-гамма-рецептора 2а, цепи Fc-гамма-рецептора 2b1, цепи Fc-гамма-рецептора 2b2, цепи Fc-гамма-рецептора 3а, цепи Fc-гамма-рецептора 3b, цепи Fc-бета-рецептора 1, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих в дополнение по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

[0087] В некоторых вариантах осуществления ITAM замещает ITAM CD3 гамма, CD3 дельта или CD3 эпсилон.

[0088] В некоторых вариантах осуществления ITAM выбран из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта, и замещает другой ITAM, выбранный из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта.

[0089] В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит лидерную последовательность.

[0090] В одном аспекте в настоящем документе предложена композиция, содержащая полипептидную молекулу, кодируемую молекулой нуклеиновой кислоты композиции,

описанной в настоящем документе.

[0091] В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит первый полипептид, кодируемый первой молекулой нуклеиновой кислоты, и второй полипептид, кодируемый второй молекулой нуклеиновой кислоты.

[0092] В одном аспекте в настоящем документе предложена композиция, содержащая молекулу рекомбинантного TFP, кодируемую молекулой нуклеиновой кислоты композиции, описанной в настоящем документе.

[0093] В одном аспекте в настоящем документе предложена композиция, содержащая вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид или молекулу рекомбинантного TFP, описанные в настоящем документе.

[0094] В некоторых вариантах осуществления вектор содержит а) первый вектор, содержащий первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый TFP; и б) второй вектор, содержащий вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй TFP.

[0095] В некоторых вариантах осуществления вектор выбран из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, вектора на основе вируса саркомы Рауса (VCP) или ретровирусного вектора.

[0096] В некоторых вариантах осуществления вектор дополнительно содержит промотор.

[0097] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой транскрибированный *in vitro* вектор.

[0098] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно кодирует поли(А)-хвост.

[0099] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно кодирует 3'-UTR.

[0100] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно кодирует участок расщепления протеазой.

[0101] В одном аспекте в настоящем документе предложена композиция, содержащая клетку, содержащую композицию, описанную в настоящем документе.

[0102] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой человеческую Т-клетку.

[0103] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой CD8+ или CD4+ Т-клетку.

[0104] В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть ингибирующей молекулы,

связанной со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена.

[0105] В некоторых вариантах осуществления ингибирующая молекула содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть PD1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и домен первичной сигнализации.

[0106] В одном аспекте в настоящем документе предложен способ лечения млекопитающего с заболеванием, связанным с экспрессией MSLN или MUC16, включающий в себя введение млекопитающему эффективного количества композиции, описанной в настоящем документе.

[0107] В некоторых вариантах осуществления заболевание, связанное с экспрессией MSLN или MUC16, выбрано из группы, состоящей из пролиферативного заболевания, рака, злокачественной опухоли, миелодисплазии, миелодиспластического синдрома, предлейкоза, неассоциированного с раком признака, связанного с экспрессией MUC16, неассоциированного признака, связанного с экспрессией MSLN, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака кожи, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака почки, рака печени, рака головного мозга, лимфомы, лейкоза, рака легкого, рака пищевода, рака желудка и неоперабельного рака яичника с рецидивирующим или рефрактерным заболеванием.

[0108] В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак крови, выбранный из группы, состоящей из В-клеточного острого лимфоидного лейкоза (В-ОЛЛ), Т-клеточного острого лимфоидного лейкоза (Т-ОЛЛ), острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ); хронического миелолейкоза (ХМЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, бластного образования из плазмоцитоидных дендритных клеток, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, мелкоклеточной фолликулярной лимфомы, крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественных лимфопролиферативных состояний, MALT-лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, лимфомы из клеток маргинальной зоны, множественной миеломы, миелодисплазии, миелодиспластического синдрома, неходжкинской лимфомы, плазмабластической лимфомы, новообразования из плазмоцитоидных дендритных клеток, макроглобулинемии Вальденстрема, предлейкоза, заболевания, связанного с экспрессией MUC16 или MSLN, или их комбинаций.

[0109] В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие первую молекулу TFR и вторую молекулу TFR, вводятся в комбинации с веществом, которое повышает эффективность клетки, экспрессирующей первую молекулу TFR и вторую молекулу TFR.

[0110] В некоторых вариантах осуществления у млекопитающего высвобождается меньше цитокинов по сравнению с млекопитающим, которому вводят эффективное количество Т-клеток, экспрессирующих: химерный антигенный рецептор (CAR) против MSLN; CAR против MUC16, CAR против MSLN и CAR против MUC16; или их комбинацию.

[0111] В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие первую молекулу TFP и вторую молекулу TFP, вводятся в комбинации с веществом, которое облегчает один или более побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей первую молекулу TFP и вторую молекулу TFP.

[0112] В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие первую молекулу TFP и вторую молекулу TFP, вводятся в комбинации с веществом, которое лечит заболевание, связанное с MSLN или MUC16.

[0113] В одном аспекте в настоящем документе описаны выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), который содержит субъединицу TCR и домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий связывающий домен против опухолевого антигена, такой как домен против BCMA, против CD19, против CD20, против CD22, против MUC16, против MSLN и т. д. В некоторых вариантах осуществления субъединица TCR содержит внеклеточный домен TCR. В других вариантах осуществления субъединица TCR содержит трансмембранный домен TCR. В еще одних вариантах осуществления субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR. В дополнительных вариантах осуществления субъединица TCR содержит (i) внеклеточный домен TCR, (ii) трансмембранный домен TCR и (iii) внутриклеточный домен TCR, причем по меньшей мере два из (i), (ii) и (iii) относятся к одной субъединице TCR. В других дополнительных вариантах осуществления субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен, выбранный из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, или аминокислотную последовательность, имеющую в дополнение по меньшей мере одну, две или три модификации. В других дополнительных вариантах осуществления субъединица TCR содержит внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен, выбранный из функционального сигнального домена 4-1BB и/или функционального сигнального домена CD3 дзета, или аминокислотную последовательность, имеющую в дополнение по меньшей мере одну, две или три модификации.

[0114] В некоторых вариантах осуществления домен человеческого или гуманизированного антитела содержит фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления домен человеческого или гуманизированного антитела содержит scFv или домен V_H.

[0115] В некоторых вариантах осуществления выделенные молекулы нуклеиновой кислоты содержат (i) CDR1 легкой цепи (LC), CDR2 LC и CDR3 LC любой аминокислотной последовательности связывающего домена легкой цепи против ассоциированного с опухолью антигена, представленной в настоящем документе, и/или (ii) CDR1 тяжелой цепи (HC), CDR2 HC и CDR3 HC любой аминокислотной последовательности связывающего домена тяжелой цепи против ассоциированного с опухолью антигена, представленной в настоящем документе.

[0116] В некоторых вариантах осуществления переменный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 30, 20 или 10 модификаций аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи, представленной в настоящем документе, или последовательность с 95–99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в настоящем документе. В других вариантах осуществления переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 30, 20 или 10 модификаций аминокислотной последовательности переменного участка тяжелой цепи, представленной в настоящем документе, или последовательность с 95–99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в настоящем документе.

[0117] В некоторых вариантах осуществления TFP включает в себя внеклеточный домен субъединицы TCR, который содержит внеклеточный домен, или его часть, из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа- или бета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3 дельта, CD3 эпсилон или CD3 гамма, или их функциональных фрагментов, или аминокислотной последовательности, имеющей в дополнение по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций. В других вариантах осуществления кодируемый TFP включает в себя трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета-цепи TCR или субъединиц TCR CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, или их функционального фрагмента, или аминокислотной последовательности, имеющей в дополнение по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций.

[0118] В некоторых вариантах осуществления кодируемый TFP включает в себя трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи TCR или CD3 эпсилон, CD3 гамма и CD3 дельта CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154, или их функционального фрагмента, или аминокислотной

последовательности, имеющей в дополнение по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций.

[0119] В некоторых вариантах осуществления кодируемый связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В некоторых случаях кодируемая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 1 до 4. В некоторых случаях кодируемая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 2 до 4. В некоторых случаях кодируемая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 1 до 3.

[0120] В некоторых вариантах осуществления выделенные молекулы нуклеиновой кислоты дополнительно содержат последовательность, кодирующую костимулирующий домен. В некоторых случаях костимулирующий домен является функциональным сигнальным доменом, полученным из белка, выбранного из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137), или аминокислотной последовательности, имеющей в дополнение по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций.

[0121] В некоторых вариантах осуществления выделенные молекулы нуклеиновой кислоты дополнительно содержат лидерную последовательность.

[0122] Также в настоящем документе предложены выделенные полипептидные молекулы, кодируемые любой из описанных ранее молекул нуклеиновой кислоты.

[0123] Также в другом аспекте в настоящем документе предложены выделенные молекулы гибридного белка (TFP) Т-клеточного рецептора, которые содержат человеческий или гуманизированный связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR. В некоторых вариантах осуществления выделенные молекулы TFP содержат антитело или фрагмент антитела, содержащие человеческий или гуманизированный связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR.

[0124] В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена представляет собой scFv или домен V_H . В других вариантах осуществления связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена содержит легкую цепь и тяжелую цепь аминокислотной последовательности, представленной в настоящем документе, или их функциональный фрагмент, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 30, 20 или 10 модификаций аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи, представленного в настоящем документе, или

последовательность с 95–99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления выделенные молекулы TFP содержат внеклеточный домен TCR, который содержит внеклеточный домен, или его часть, из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа- или бета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3 дельта, CD3 эпсилон или CD3 гамма, или аминокислотной последовательности, имеющей в дополнение по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций.

[0125] В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В некоторых случаях линкерная область содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 1 до 4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 2 до 4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 1 до 3.

[0126] В некоторых вариантах осуществления выделенные молекулы TFP дополнительно содержат последовательность, кодирующую костимулирующий домен. В других вариантах осуществления выделенные молекулы TFP дополнительно содержат последовательность, кодирующую внутриклеточный сигнальный домен. В еще одних вариантах осуществления выделенные молекулы TFP дополнительно содержат лидерную последовательность.

[0127] Также в настоящем документе предложены векторы, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую любую из описанных ранее молекул TFP. В некоторых вариантах осуществления вектор выбран из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора или ретровирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вектор дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой транскрибированный *in vitro* вектор. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит поли(А)-хвост. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит 3'UTR.

[0128] Также в настоящем документе предлагаются клетки, которые содержат любой из описанных векторов. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой человеческую Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетку. В других вариантах осуществления клетки дополнительно содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанной со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал

от внутриклеточного сигнального домена. В некоторых случаях ингибирующая молекула содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть PD1, и второй полипептид, содержащий

костимулирующий домен и домен первичной сигнализации.

[0129] В другом аспекте в настоящем документе предложены выделенные молекулы TFP, которые содержат человеческий или гуманизированный связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR.

[0130] В другом аспекте в настоящем документе предложены выделенные молекулы TFP, которые содержат человеческий или гуманизированный связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональной интеграции в эндогенный комплекс TCR.

[0131] В другом аспекте в настоящем документе предложены человеческие CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетки, которые содержат по меньшей мере две молекулы TFP, содержащие человеческий или гуманизированный связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR в человеческой CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетке, около нее и/или на ее поверхности.

[0132] В другом аспекте в настоящем документе предложены белковые комплексы, которые содержат i) молекулу TFP, содержащую человеческий или гуманизированный связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; и ii) по меньшей мере один эндогенный комплекс TCR.

[0133] В некоторых вариантах осуществления TCR содержит внеклеточный домен, или его часть, из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа- или бета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3 дельта, CD3 эпсилон или CD3 гамма. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В некоторых случаях линкерная область содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 1 до 4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 2 до 4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 1 до 3.

[0134] Также в настоящем документе предложены человеческие CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетки, которые содержат по меньшей мере два различных белка TFP на каждый из описанных белковых комплексов.

[0135] В другом аспекте в настоящем документе предложена популяция человеческих CD8⁺ или CD4⁺ Т-клеток, причем Т-клетки популяции отдельно или в совокупности содержат по меньшей мере две молекулы TFP, содержащие человеческий или гуманизированный связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR в человеческой CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетке, около нее и/или на ее поверхности.

[0136] В другом аспекте в настоящем документе предложена популяция человеческих CD8⁺ или CD4⁺ Т-клеток, причем Т-клетки популяции отдельно или в совокупности содержат по меньшей мере две молекулы TFP, кодируемые выделенной молекулой нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе.

[0137] В другом аспекте в настоящем документе предложены способы создания клетки, включающие в себя трансдукцию Т-клетки с помощью любого из описанных векторов.

[0138] В другом аспекте в настоящем документе предложены способы получения популяции РНК-сконструированных клеток, включающие в себя введение транскрибированной *in vitro* РНК или синтетической РНК в клетку, причем РНК содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую любую из описанных молекул TFP.

[0139] В другом аспекте в настоящем документе предложены способы обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, включающие в себя введение млекопитающему эффективного количества клетки, экспрессирующей любую из описанных молекул TFP. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аутологическую Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аллогенную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой человека.

[0140] В другом аспекте в настоящем документе предложены способы лечения млекопитающего с заболеванием, связанным с экспрессией ассоциированного с опухолью антигена, включающие в себя введение млекопитающему эффективного количества клетки, содержащей любую из описанных молекул TFP. В некоторых вариантах осуществления заболевание, связанное с экспрессией ассоциированного с опухолью антигена, выбрано из пролиферативного заболевания, такого как рак или злокачественная опухоль, или предракового состояния, такого как миелодисплазия, миелодиспластический синдром или

предлейкоз, либо оно представляет собой нераковое сходное показание, связанное с экспрессией ассоциированного с опухолью антигена. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак крови, выбранный из группы, состоящей из одного или более острых лейкозов, включая без ограничения В-клеточный острый лимфоидный лейкоз («В-ОЛЛ»), Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз («Т-ОЛЛ»), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ); одного или более хронических лейкозов, включая без ограничения хронический миелолейкоз (ХМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ); дополнительных гематологических раковых заболеваний или гематологических состояний, включая без ограничения В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, бластное образование из плазматоидных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, MALT-лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, вялотекущую множественную миелому, одиночную плазмцитому, лимфоплазматическую лимфому, лейкоз плазматических клеток, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, плазмабластическую лимфому, новообразование из плазматоидных дендритных клеток, макроглобулинемию Вальденстрема и «предлейкоз», которые представляют собой разнообразную коллекцию гематологических состояний, объединенных неэффективной выработкой (или дисплазией) миелоидных клеток крови, а также заболевания, связанные с экспрессией ассоциированного с опухолью антигена, включают в себя без ограничения атипические и/или неклассические раковые заболевания, злокачественные новообразования, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, экспрессирующие ассоциированный с опухолью антиген; и их комбинаций.

[0141] В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие любую из описанных молекул TFR, вводятся в комбинации с веществом, которое облегчает один или более побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей молекулу TFR. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие любую из описанных молекул TFR, вводятся в комбинации с веществом, которое лечит заболевание, связанное с ассоциированным с опухолью антигеном.

[0142] Также в настоящем документе для применения в качестве лекарственного препарата предложены любые из описанных выделенных молекул нуклеиновой кислоты, любые из описанных выделенных полипептидных молекул, любые из описанных выделенных TFR, любые из описанных белковых комплексов, любые из описанных векторов или любые из

описанных клеток.

1. Определения

[0143] Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такое же значение, которое обычно понимается обычным специалистом в области техники, к которой относится изобретение.

[0144] Форма единственного числа используется для обозначения одного или более чем одного (т. е. по меньшей мере одного) грамматического объекта. В качестве примера, «элемент» означает один элемент или более одного элемента.

[0145] Используемый в настоящем документе термин «около» может означать плюс или минус меньше 1 или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 или более 30 процентов, в зависимости от ситуации и от того, что известно специалисту в данной области техники.

[0146] Как используется в настоящем описании, «субъект», или «субъекты», или «индивиды» могут включать в себя, помимо прочего, млекопитающих, таких как люди или млекопитающие, не относящиеся к человеку, *например*, одомашненные, сельскохозяйственные или дикие животные, а также птицы и водные животные. «Пациенты» — это субъекты, страдающие от заболевания, нарушения или состояния, подверженные риску их развития либо любым другим образом нуждающиеся в композициях и способах, представленных в настоящем документе.

[0147] Как используется в настоящем документе, термины «лечить» или «лечение» относятся к любому признаку успеха при лечении или облегчении заболевания или состояния. Лечение может включать в себя, например, уменьшение, замедление или облегчение тяжести одного или более симптомов заболевания или состояния, или оно может включать в себя уменьшение частоты, с которой у пациента проявляются симптомы заболевания, дефекта, нарушения или неблагоприятного состояния и т. п. Как используется в настоящем документе, термин «лечить или предотвратить» иногда используется для обозначения способа, который дает в результате определенный уровень лечения или облегчения заболевания или состояния и предполагает ряд результатов, направленных для достижения этой цели, включая, помимо прочего, полное предотвращение состояния.

[0148] Как используется в настоящем документе, термин «предотвращение» относится к предотвращению заболевания или состояния, например, образования опухоли, у пациента. Например, если индивид, подверженный риску развития опухоли или другой формы рака, получает лечение способами по настоящему изобретению, и у него впоследствии не будет развиваться опухоль или другая форма рака, в таком случае у этого индивида заболевание будет предотвращено, по крайней мере в течение определенного периода времени.

[0149] Как используется в настоящем документе, «терапевтически эффективное количество» представляет собой такое количество композиции или ее активного компонента, которого будет достаточно для обеспечения положительного эффекта или для сокращения любым другим образом пагубного влияния на индивида, которому вводят эту композицию. Под термином «терапевтически эффективная доза» в настоящем документе понимают дозу, которая обеспечивает один или более желаемых или предпочтительных (например, положительных) эффектов, для достижения которых ее вводят, при этом подобное введение происходит один или более раз в течение заданного периода времени. Точная доза будет зависеть от цели лечения и устанавливаться специалистом в данной области техники с применением известных методик (см., например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); и Pickar, *Dosage Calculations* (1999))

[0150] Как используется в настоящем документе, «гибридный белок Т-клеточного рецептора (TCR)» или «TFP» включает в себя рекомбинантный полипептид, полученный из различных полипептидов, содержащих TCR, который, как правило, способен i) связываться с поверхностным антигеном на клетках-мишенях и ii) взаимодействовать с другими полипептидными компонентами интактного комплекса TCR, как правило, при совместном размещении в Т-клетке или на ее поверхности.

[0151] Как используется в настоящем документе, термин «антитело» относится к белковым или полипептидным последовательностям, полученным из молекулы иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном. Антитела могут представлять собой интактные иммуноглобулины поликлонального или моноклонального происхождения или их фрагменты и могут быть получены из естественных или рекомбинантных источников.

[0152] Термины «фрагмент антитела» или «связывающий домен антитела» относятся к по меньшей мере одной части антитела или ее рекомбинантным вариантам, которые содержат антигенсвязывающий домен, т. е. антигенный определяющий переменный участок интактного антитела, которых будет достаточно для обеспечения распознавания и специфического связывания фрагмента антитела с мишенью, такой как антиген и его определенный эпитоп. К примерам фрагментов антител относятся, помимо прочего, Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты, одноцепочечные (sc)Fv-фрагменты антител («scFv»), линейные антитела, однодоменные антитела (сокращенно «sdAb») (V_L либо V_H), верблюжьи домены V_{HH} и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[0153] Термин «scFv» относится к гибриднему белку, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменный участок легкой цепи, и по меньшей мере

один фрагмент антитела, содержащий переменный участок тяжелой цепи, причем переменные участки легкой и тяжелой цепи непрерывно соединены посредством короткого гибкого полипептидного линкера и способны быть экспрессированы как одна полипептидная цепь, и причем scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он был получен.

[0154] «Переменный участок тяжелой цепи» или « V_H » (или в случае однодоменных антител, например, нанотел, — « V_{HH} ») в отношении антитела относится к фрагменту тяжелой цепи, который содержит три CDR, перемежающих фланкирующие участки, известные как каркасные области, эти каркасные области, как правило, более высоко консервативны, чем CDR, и образуют каркас для поддержки CDR.

[0155] Как используется в настоящем документе, если не указано иное, scFv может иметь участки V_L и V_H в любом порядке, *например*, по отношению к N-терминальным или C-терминальным концам полипептида, scFv может содержать V_L -линкер- V_H или V_H -линкер- V_L .

[0156] Часть композиции TFP по настоящему изобретению, содержащая антитело или фрагмент этого антитела, может существовать в различных формах, где антигенсвязывающий домен экспрессируется как часть непрерывной полипептидной цепи, включая, например, фрагмент однодоменного антитела (sdAb) или антитела с тяжелыми цепями HCAb 242:423-426). В одном аспекте антигенсвязывающий домен композиции TFP по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В дополнительном аспекте TFP содержит фрагмент антитела, который содержит scFv или sdAb.

[0157] Термин «тяжелая цепь антитела» относится к большей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях, и которая обычно определяет класс, к которому принадлежит антитело.

[0158] Термин «легкая цепь антитела» относится к меньшей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях. Каппа («K») и лямбда («λ») легкие цепи относятся к двум основным изотипам легких цепей антитела.

[0159] Термин «рекомбинантное антитело» относится к антителу, которое получают с применением технологии рекомбинантной ДНК, такому как, например, антитело, экспрессируемое бактериофагом или экспрессирующей системой дрожжей. Термин также следует воспринимать как обозначающий антитело, которое было получено путем синтеза молекулы ДНК, кодирующей антитело, и которая экспрессирует белок антитела, или аминокислотной последовательности, определяющей антитело, причем ДНК или аминокислотная последовательность были получены с применением технологии

рекомбинантной ДНК или аминокислотной последовательности, которая является доступной и хорошо известной в данной области техники.

[0160] Термин «антиген» или «Ag» относится к молекуле, которая способна специфически связываться антителом или которая провоцирует иммунный ответ каким-либо другим образом. Такой иммунный ответ может предполагать или выработку антител, или активацию специфических иммуно-компетентных клеток, или и то, и другое.

[0161] Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить в качестве антигена. Более того, антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность или часть нуклеотидной последовательности, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, таким образом кодирует «антиген» в том значении, в котором этот термин используется в настоящем документе. Более того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген не обязательно должен кодироваться исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Очевидно, что настоящее изобретение включает в себя, помимо прочего, применение частей нуклеотидных последовательностей более одного гена, и что эти нуклеотидные последовательности располагаются в различных комбинациях для того, чтобы кодировать полипептиды, которые вызывают желаемый иммунный ответ. Более того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген совсем не обязательно должен кодироваться «геном». Очевидно, что антиген может быть образован путем синтеза, или может быть получен из биологического образца, или может представлять собой макромолекулу, помимо полипептида. Подобный биологический образец может включать в себя, помимо прочего, образец тканей, образец опухоли, клетку или жидкость с другими биологическими компонентами.

[0162] Термин «противоопухолевый эффект» относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными способами, включая, помимо прочего, *например*, уменьшение объема опухоли, уменьшение количества опухолевых клеток, уменьшение количества метастазов, увеличение вероятной продолжительности жизни, снижение пролиферации опухолевых клеток, снижение выживаемости опухолевых клеток или облегчение различных физиологических симптомов, связанных с раковым состоянием. «Противоопухолевый эффект» также может проявляться в способности пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител по настоящему изобретению в первую очередь предотвращать появление опухоли.

[0163] Термин «аутологический» относится к любому материалу, полученному от того же

индивида, которому впоследствии он будет вводиться.

[0164] Термин «аллогенный» относится к любому материалу, полученному от другого животного того же вида или другого пациента, отличных от того индивида, которому будет вводиться материал. Считается, что два или более индивидов являются аллогенными по отношению друг к другу, когда гены в одном или более локусов не являются идентичными. В некоторых аспектах аллогенный материал, полученный от индивидов одного и того же вида, может достаточно отличаться генетически для антигенного взаимодействия.

[0165] Термин «ксеногенный» относится к трансплантату, полученному от животного другого вида.

[0166] Термин «рак» относится к заболеванию, которое характеризуется быстрым и неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Раковые клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части тела. Примеры различных раковых заболеваний описаны в настоящем документе, к ним относится, помимо прочего, рак молочных желез, рак предстательной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почек, рак печени, рак головного мозга, лимфома, лейкоз, рак легкого, рак пищевода, рак желудка, неоперабельного рака яичника с рецидивирующим или рефрактерным заболеванием и т. п.

[0167] Термин «консервативные модификации в последовательностях» относится к аминокислотным модификациям, которые в значительной степени не влияют и не изменяют характеристики связывания антитела или фрагмента антитела, содержащего аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают в себя аминокислотные замещения, вставки и делеции. Модификации могут быть внесены в антитело или фрагмент антитела по настоящему изобретению с помощью стандартных способов, известных в данной области техники, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замещения — это такие замещения, в которых аминокислотный остаток замещают аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники. Эти семейства включают в себя аминокислотные остатки с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (*например*, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (*например*, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (*например*, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (*например*, тирозин, фенилаланин, триптофан,

гистидин). Таким образом, один или более аминокислотных остатков в пределах TFP по настоящему изобретению могут быть замещены другими аминокислотными остатками из одного и того же семейства боковых цепей, а измененный TFP может быть протестирован с помощью функциональных анализов, описанных в настоящем документе.

[0168] Термин «стимуляция» относится к первичному ответу, индуцированному связыванием стимулирующего домена или стимулирующей молекулы (*например*, комплекс TCR/CD3) с их распознаваемым лигандом, опосредуя, таким образом, событие передачи сигналов, такое как, помимо прочего, передача сигналов через комплекс TCR/CD3. Стимуляция может опосредовать измененную экспрессию определенных молекул и/или реорганизацию цитоскелетных структур и т. п.

[0169] Термин «стимулирующая молекула» или «стимулирующий домен» относится к молекуле или ее части, экспрессируемой Т-клеткой, которая обеспечивает последовательности первичной цитоплазматической сигнализации, которые регулируют первичную активацию комплекса TCR стимулирующим путем для по меньшей мере некоторого аспекта сигнального пути Т-клетки. В одном аспекте первичный сигнал инициируется посредством, например, связывания комплекса TCR/CD3 с молекулой МНС, загруженной пептидом, что приводит к опосредованию Т-клеточного ответа, включая, помимо прочего, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т. п. Последовательность первичной цитоплазматической сигнализации (также называемая «домен первичной сигнализации»), которая действует стимулирующим путем, может содержать мотив сигнализации, который известен как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или «ITAM». К примерам последовательности первичной цитоплазматической сигнализации, содержащей ITAM, для конкретного применения в настоящем изобретении относятся, помимо прочего, производные от TCR дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также известный как «ICOS») и CD66d.

[0170] Термин «антигенпрезентирующая клетка» или «APC» относится к клетке иммунной системы, такой как вспомогательная клетка (*например*, В-клетка, дендритная клетка и т. п.), которая демонстрирует чужеродный антиген, входящий в состав основных комплексов гистосовместимости (МНС), на ее поверхности. Т-клетки могут распознавать такие комплексы с помощью Т-клеточных рецепторов (TCR). APC обрабатывают антигены и представляют их Т-клеткам.

[0171] Как используется в настоящем документе, термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к внутриклеточной части молекулы. Внутриклеточный сигнальный домен генерирует сигнал, который стимулирует иммунную эффекторную функцию клетки,

содержащей TFR, *например*, TFR-экспрессирующей Т-клетки. К примерам иммунной эффекторной функции, *например*, в TFR-экспрессирующей Т-клетке, относится цитолитическая активность и активность хелперных Т-клеток, включая секрецию цитокинов. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать домен первичной внутриклеточной сигнализации. К примерам доменов первичной внутриклеточной сигнализации относятся домены, полученные от молекул, которые отвечают за первичную стимуляцию или стимуляцию, зависящую от антигена. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать костимулирующий внутриклеточный домен. К примерам костимулирующих внутриклеточных сигнальных доменов относятся домены, полученные из молекул, которые отвечают за костимулирующие сигналы или стимуляцию, зависящую от антигена.

[0172] Домен первичной внутриклеточной сигнализации может содержать ITAM («иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив»). К примерам последовательностей первичной цитоплазматической сигнализации, содержащих ITAM, относятся, помимо прочего, производные CD3 дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d DAP10 и DAP12.

[0173] Термин «костимулирующая молекула» относится к распознаваемому партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, опосредуя, таким образом, костимулирующий ответ Т-клетки, такой как, помимо прочего, пролиферация. Костимулирующие молекулы являются молекулами клеточной поверхности, отличными от рецепторов антигенов или их лигандов, которые необходимы для эффективного иммунного ответа. Костимулирующие молекулы включают в себя, помимо прочего, молекулу MHC класса 1, BTLA и рецептор к Толл-лигандам, а также OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1, (CD11a/CD18) и 4-1BB (CD137). Костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может представлять собой внутриклеточную часть костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула может быть представлена в следующих семействах белков: ФНО рецепторные белки, иммуноглобулиноподобные белки, рецепторы к цитокинам, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM) и активирующие рецепторы NK-клеток. К примерам подобных молекул относится CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83 и т. п. Внутриклеточный сигнальный домен может содержать всю внутриклеточную часть или весь нативный внутриклеточный сигнальный домен молекулы, из которой он был получен, или его функциональный фрагмент. Термин «4-1BB» относится

к члену суперсемейства TNFR с аминокислотной последовательностью, предоставленной под учетным номером GenBank AAA62478.2, или эквивалентным остаткам отличных от человека видов, *например*, мышей, грызунов, мартышковых, человекообразных обезьян и т. п.; а «костимулирующий домен 4-1BB» определяется как аминокислотные остатки 214–255 учетного номера GenBank AAA62478.2 или эквивалентные остатки отличных от человека видов, *например*, мышей, грызунов, мартышковых, человекообразных обезьян и т. п.

[0174] Термин «кодирующий» относится к присущему свойству конкретных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих или определенную последовательность нуклеотидов (*например*, рРНК, тРНК и мРНК), или определенную последовательность аминокислот, а также к биологическим свойствам, полученным в результате этого. Таким образом, ген, кДНК или РНК кодируют белок, если в результате транскрипции и трансляции мРНК, соответствующей этому гену, вырабатывается белок в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно предоставляется в перечнях последовательностей, так и некодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут рассматриваться как кодирующие белок или другой продукт этого гена или кДНК.

[0175] Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность» включает в себя все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза «нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок или РНК» также может включать в себя интроны в той мере, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в некоторых версиях содержать один или более интронов.

[0176] Термины «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к количеству соединения, состава, материала или композиции, как описано в настоящем документе, эффективному для достижения конкретного биологического или терапевтического результата.

[0177] Термин «эндогенный» относится к любому материалу, полученному от организма, клетки, ткани или системы, либо произведенному внутри них.

[0178] Термин «экзогенный» относится к любому материалу, введенному из-за пределов либо произведенному за пределами организма, клетки, ткани или системы.

[0179] Термин «экспрессия» относится к транскрипции и/или трансляции конкретной нуклеотидной последовательности, управляемой промотором.

[0180] Термин «вектор переноса» относится к композиции вещества, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту и которая может использоваться для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. Многочисленные векторы известны в данной области техники, включая, помимо прочего, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин «вектор переноса» включает в себя способную к автономной репликации плазмиду или вирус. Термин также следует воспринимать как такой, который дополнительно включает в себя неплазмидные и невирусные соединения, которые способствуют переносу нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, полилизиновое соединение, липосома и т. п. К примерам вирусных векторов переноса относятся, помимо прочего, аденовирусные векторы, векторы адено-ассоциированного вируса, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и т. п.

[0181] Термин «вектор экспрессии» относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, который содержит регулирующие экспрессию последовательности, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, которая подлежит экспрессии. Вектор экспрессии содержит достаточно цис-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть обеспечены клеткой-хозяином или в *in vitro* системе экспрессии. Векторы экспрессии включают в себя все известные в данной области техники векторы, включая космиды, плазмиды (*например*, «голые» или содержащиеся в липосомах) и вирусы (*например*, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и адено-ассоциированные вирусы), которые содержат рекомбинантный полинуклеотид.

[0182] Термин «лентивирус» относится к роду семейства Retroviridae. Лентивирусы являются уникальными среди ретровирусов благодаря способности инфицировать неделящиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической информации в ДНК клетки-хозяина, таким образом, они являются одним из наиболее эффективных вариантов вектора доставки генов. ВИЧ, вирус иммунодефицита обезьян, вирус кошачьего иммунодефицита являются примерами лентивирусов.

[0183] Термин «лентивирусный вектор» относится к вектору, полученному из по меньшей мере части лентивирусного генома, включая, в особенности, самоинактивирующий лентивирусный вектор, как предлагается у Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). К другим примерам лентивирусных векторов, которые могут использоваться в клинической практике, относится, помимо прочего, *например*, технология доставки генов LENTIVECTOR™ от компании Oxford BioMedica, система векторов LENTIMAX™ от

компании Lentigen и т. п. Неклинические типы лентивирусных векторов также доступны и известны специалисту в данной области техники.

[0184] Термин «гомологичный» или «идентичность» относится к идентичности последовательности субъединицы между двумя полимерными молекулами, *например*, между двумя молекулами нуклеиновой кислоты, такими как две молекулы ДНК или две молекулы РНК, или между двумя полипептидными молекулами. Когда положение субъединицы в обеих молекулах занимает одна и та же мономерная субъединица, *например*, если положение в каждой из двух молекул ДНК занимает аденин, в таком случае они являются гомологичными или идентичными в этом положении. Гомология между двумя последовательностями прямо пропорциональна количеству совпадающих или гомологичных положений; *например*, если половина (*например*, пять положений в полимере длиной десять субъединиц) положений в двух последовательностях будет гомологичной, две последовательности являются на 50% гомологичными; если 90% положений (*например*, 9 из 10) будут совпадать или будут гомологичными, две последовательности являются на 90% гомологичными.

[0185] «Гуманизированные» формы антител нечеловеческого происхождения (*например*, мышьиные) представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие последовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. В большинстве случаев гуманизированные антитела и фрагменты антител представляют собой иммуноглобулины человека (антитело-реципиент или фрагмент антитела), в которых остатки определяющей комплементарности области (CDR) реципиента замещены остатками CDR видов, отличных от человека (антитело-донор), таких как мышь, крыса или кролик, обладающими желаемой специфичностью, аффинностью и эффективностью. В некоторых примерах остатки каркасного участка (FR) Fv человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Более того, гуманизированное антитело/фрагмент антитела может содержать остатки, которые не обнаружены ни в реципиентном антителе, ни в импортированной CDR или каркасных последовательностях. Данные модификации могут дополнительно улучшать и оптимизировать эффективности антител или фрагментов антител. В целом, гуманизированное антитело или фрагмент антитела будут содержать практически все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или практически все области CDR соответствуют таким областям иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, а все или значительная часть областей FR являются областями последовательности иммуноглобулина человека.

Гуманизированное антитело или фрагмент антитела также могут содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, из иммуноглобулина человека. Для получения дополнительной информации см. Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992.

[0186] «Человеческий» или «полностью человеческий» относится к иммуноглобулину, такому как антитело или фрагмент антитела, где вся молекула будет человеческого происхождения или будет состоять из аминокислотной последовательности, идентичной человеческой форме антитела или иммуноглобулина.

[0187] Термин «выделенный» означает измененный или удаленный из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественно присутствующие в живом существе, не являются выделенными, однако эта же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сосуществующих материалов в естественном состоянии, будут выделенными. Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в по существу очищенной форме или могут существовать в чужеродной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

[0188] В контексте настоящего изобретения для часто встречающихся оснований нуклеиновых кислот используются следующие сокращения. «А» относится к аденозину, «С» относится к цитозину, «G» относится к гуанозину, «Т» относится к тимидину, а «U» относится к уридину.

[0189] Термин «функционально связанный» или «транскрипционный контроль» относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной нуклеотидной последовательностью, которая приводит к экспрессии последней. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты является функционально связанной со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты попадает в функциональную взаимосвязь со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Функционально связанные последовательности ДНК могут быть смежными друг с другом и, например, если необходимо соединить две кодирующие белок области, находиться в одной и той же рамке считывания.

[0190] Термин «парентеральное» введение иммуногенной композиции включает в себя, *например*, подкожную (п/к), внутривенную (в/в), внутримышечную (в/м) или внутригрудинную инъекцию, внутриопухолевое введение или методы инфузии.

[0191] Термин «нуклеиновая кислота» или «полинуклеотид» относится к дезоксирибонуклеиновым кислотам (ДНК) или рибонуклеиновым кислотам (РНК) и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме. При отсутствии специальных ограничений данный термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, обладающие свойствами связывания, аналогичными свойствам эталонной нуклеиновой кислоты, и метаболизирующиеся аналогично нуклеотидам природного происхождения. Если не указано иное, то конкретная последовательность нуклеиновых кислот также неявно включает в себя их консервативно модифицированные варианты (*например*, вырожденные замещения кодонов), аллели, ортологи, ОНП (однонуклеотидный полиморфизм) и комплементарные последовательности, а также последовательность, указанную явно. Конкретно, вырожденные замещения кодонов можно получать, генерируя последовательности, в которых третье положение одного или более из выбранных (или всех) кодонов замещено остатками смешанных оснований и/или дезоксиинозина (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91–98 (1994)).

[0192] Термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и относятся к соединению, содержащему аминокислотные остатки, ковалентно связанные пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты и не ограничивается максимальным количеством аминокислот, которые может содержать последовательность белка или пептида. Полипептиды включают в себя любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Как используется в настоящем документе, этот термин относится как к коротким цепям, которые в данной области техники также часто называются пептидами, олигопептидами и олигомерами, например, так и к более длинным цепям, которые в данной области техники обычно называются белками, которых существует множество типов. К «полипептидам» относятся, например, биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, гибридные белки, среди прочих. Полипептид включает в себя природный пептид, рекомбинантный пептид или их комбинацию.

[0193] Термин «промотор» относится к последовательности ДНК, распознаваемой клеточным аппаратом транскрипции или введенным синтетическим аппаратом, необходимыми для инициации специфической транскрипции полинуклеотидной последовательности.

[0194] Термин «промоторная/регуляторная последовательность» относится к

последовательности нуклеиновой кислоты, которая необходима для экспрессии продукта гена, функционально связанного с промоторной/регуляторной последовательностью. В некоторых случаях эта последовательность может являться коровой промоторной последовательностью, а в других случаях эта последовательность может также включать в себя энхансерную последовательность и другие регуляторные элементы, которые необходимы для экспрессии продукта гена. Промоторная/регуляторная последовательность может, например, быть такой, которая экспрессирует продукт гена тканеспецифическим способом.

[0195] Термин «конститутивный» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, если она функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим или определяющим продукт гена, вызывает выработку продукта гена в клетке при большинстве или всех физиологических условиях клетки.

[0196] Термин «индуцибельный» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, если она функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим или определяющим продукт гена, вызывает выработку продукта гена в клетке по существу только тогда, когда в клетке присутствует индуктор, который соответствует этому промотору.

[0197] Термин «тканеспецифический» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, если она функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим ген или определяющимся геном, вызывает выработку продукта гена в клетке по существу только в том случае, если клетка представляет собой клетку такого типа ткани, который соответствует промотору.

[0198] Термины «линкер» и «гибкий полипептидный линкер», употребляемые в контексте scFv, относятся к пептидному линкеру, который состоит из аминокислот, таких как глициновые и/или сериновые остатки, используемые отдельно или в комбинации, для соединения вместе переменного участка тяжелой цепи и переменного участка легкой цепи. В одном варианте осуществления гибкий полипептидный линкер представляет собой линкер Gly/Ser и содержит аминокислотную последовательность (Gly-Gly-Gly-Ser)_n, где n — это положительное целое число, которое равняется или больше 1. Например, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5, n=6, n=7, n=8, n=9 и n=10. В одном варианте осуществления гибкий полипептидный линкер включает в себя, помимо прочего, (Gly₄Ser)₄ или (Gly₄Ser)₃. В другом варианте осуществления линкеры включают в себя множество повторов (Gly₂Ser), (GlySer) или (Gly₃Ser). В объем настоящего изобретения также включены линкеры, описанные в WO2012/138475 (включен в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых случаях линкерная последовательность содержит (G₄S)_n, где n = от 2 до 4. В

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

[0199] Как используется в настоящем документе, 5'-кэп (также называемый кэп РНК, кэп РНК 7-метилгуанозин или кэп РНК m7G) представляет собой модифицированный гуаниновый нуклеотид, который добавили в «переднюю часть» или к 5'-концу эукариотической матричной РНК вскоре после начала транскрипции. 5'-кэп состоит из концевой группы, которая связана с первым транскрибированным нуклеотидом. Его присутствие является критическим для распознавания рибосомой и защиты от РНКаз. Добавление кэпа связано с транскрипцией и происходит сотранскрипционно таким образом, что одно влияет на другое. Вскоре после начала транскрипции 5'-конец синтезируемой мРНК связывается с синтезирующим кэп комплексом, связанным с РНК-полимеразой. Этот ферментный комплекс катализирует химические реакции, необходимые для кэпирования мРНК. Синтез протекает как многоступенчатая биохимическая реакция. Кэпирующий фрагмент может быть модифицирован для модуляции функциональности мРНК,

такой как ее стабильность или эффективность трансляции.

[0200] Как используется в настоящем документе, термин «транскрибированная *in vitro* РНК» относится к РНК, предпочтительно мРНК, которая была синтезирована *in vitro*. В целом, транскрибированную *in vitro* РНК получают из *in vitro* транскрипционного вектора. *In vitro* транскрипционный вектор содержит матрицу, которая используется для получения транскрибированной *in vitro* РНК.

[0201] Как используется в настоящем документе, «поли(А)» представляет собой серию аденозинов, присоединенных путем полиаденилирования к мРНК. В предпочтительном варианте осуществления конструкции для временной экспрессии поли(А) находится между 50 и 5000, предпочтительно более чем 64, более предпочтительно более чем 100, наиболее предпочтительно более чем 300 или 400. Последовательности поли(А) могут быть модифицированы химически или ферментативно для модуляции функциональности мРНК, такой как локализация, стабильность или эффективность трансляции.

[0202] Как используется в настоящем документе, термин «полиаденилирование» относится к ковалентной связи полиаденилильного фрагмента, или его модифицированного варианта, с молекулой матричной РНК. У эукариот большинство молекул матричной РНК (мРНК) являются полиаденилированными на 3'-конце. 3'-поли(А)-хвост представляет собой длинную последовательность адениновых нуклеотидов (часто несколько сотен), добавленных к пре-мРНК посредством действия фермента полиаденилат-полимеразы. У высших эукариот поли(А)-хвост добавляют на транскрипты, которые содержат конкретную последовательность, сигнал полиаденилирования. Поли(А)-хвост и связанный с ним белок

способствуют защите мРНК от деградации экзонуклеазами. Полиаденилирование также является важным для терминации транскрипции, экспорта мРНК из ядра и трансляции. Полиаденилирование происходит в ядре непосредственно после транскрипции ДНК в РНК, однако может дополнительно происходить позже в цитоплазме. После окончания транскрипции цепь мРНК расщепляется действием комплекса эндонуклеазы, связанного с РНК-полимеразой. Участок расщепления, как правило, характеризуется присутствием последовательности оснований AAUAAA (SEQ ID NO:98) возле участка расщепления. После расщепления мРНК аденозиновые остатки добавляют к свободному 3'-концу на участке расщепления.

[0203] Как используется в настоящем документе, «временный» относится к экспрессии неинтегрированного трансгена в течение периода времени, выраженного в часах, днях или неделях, причем период времени экспрессии меньше, чем период времени для экспрессии гена, интегрированного в геном или содержащегося в стабильном репликоне плазмиды в клетке-хозяине.

[0204] Термин «путь передачи сигнала» относится к биохимической взаимосвязи между различными молекулами передачи сигналов, которые играют роль в передаче сигнала от одной части клетки к другой части клетки. Фраза «рецептор клеточной поверхности» включает в себя молекулы и комплексы молекул, способные принимать сигнал и передавать его через мембрану клетки.

[0205] Термин «субъект» предназначен для включения в себя живых организмов, у которых может быть вызван иммунный ответ (например, млекопитающие, человек).

[0206] Термин «по существу очищенная» клетка относится к клетке, которая практически не содержит другие типы клеток. По существу очищенная клетка также относится к клетке, которая была отделена от других типов клеток, с которыми она обычно связана в своем естественном состоянии. В некоторых случаях популяция по существу очищенных клеток относится к гомогенной популяции клеток. В других случаях этот термин относится просто к клеткам, которые были отделены от клеток, с которыми они естественным образом связаны в своем естественном состоянии. В некоторых аспектах эти клетки культивируются *in vitro*. В других аспектах эти клетки не культивируются *in vitro*.

[0207] Как используется в настоящем документе, термин «терапевтический» означает лечение. Терапевтический эффект достигается путем уменьшения, подавления, ремиссии или устранения болезненного состояния.

[0208] Как используется в настоящем документе, термин «профилактика» означает предотвращение заболевания или болезненного состояния либо их профилактическое лечение.

[0209] В контексте настоящего изобретения «опухолевый антиген», или «антиген гиперпролиферативного заболевания», или «антиген, связанный с гиперпролиферативным заболеванием» относится к антигенам, которые характерны для конкретных гиперпролиферативных заболеваний. В некоторых аспектах антигены гиперпролиферативных заболеваний по настоящему изобретению были получены из раковых заболеваний, включая, помимо прочего, первичную или метастатическую меланому, тимому, лимфому, саркому, рак легкого, рак печени, НХЛ, лейкозы, рак матки, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак почки и аденокарциномы, такие как рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почки, рак печени, рак головного мозга, лимфому, лейкоз, рак легкого, рак пищевода, рак желудка, неоперабельный рак яичника с рецидивирующим или рефрактерным заболеванием.

[0210] Термин «трансфицированный», или «трансформированный», или «трансдуцированный» относится к процессу, посредством которого экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или вводят в клетку-хозяина. «Трансфицированная», или «трансформированная», или «трансдуцированная» клетка — это клетка, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована с помощью экзогенной нуклеиновой кислоты. Клетка включает в себя первичную клетку субъекта и свое потомство.

[0211] Термин «специфически связывается» относится к антителу, фрагменту антитела или конкретному лиганду, который распознает и связывается с распознаваемым партнером по связыванию (*например*, ВСМА), присутствующим в образце, однако который не будет обязательно и по существу распознавать и связываться с другими молекулами в этом образце.

[0212] Диапазоны: по всему тексту этого описания различные аспекты изобретения могут быть представлены в виде диапазонов. Следует понимать, что описание в виде диапазонов предоставляется исключительно для удобства и краткости, и его не следует воспринимать как негибкое ограничение объема настоящего изобретения. Соответствующим образом, описание диапазона следует считать таким, которое конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах этого диапазона. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, следует считать таким, которое конкретно раскрывает поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. п.; а также отдельные числа в пределах этого диапазона, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. В качестве другого примера диапазон, такой как 95–99% идентичности, включает в себя что-либо с 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности, а также включает

в себя поддиапазоны, такие как 96–99%, 96–98%, 96–97%, 97–99%, 97–98% и 98–99% идентичности. Это применяется независимо от ширины диапазона.

2. Гибридные белки (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR)

[0213] Настоящее изобретение охватывает конструкции рекомбинантной ДНК, кодирующие TFP, причем TFP содержит фрагмент антитела, который специфически связывается с ВСМА, *например*, человеческим ВСМА, причем последовательность фрагмента антитела является смежной с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей субъединицу TCR или ее часть, и находится с ней в одной рамке считывания. TFP, представленные в настоящем документе, способны связываться с одной или более эндогенных (или альтернативно, с одной или более экзогенных или с комбинацией эндогенных и экзогенных) субъединиц TCR с целью образования функционального комплекса TCR.

[0214] В одном аспекте TFP по настоящему изобретению содержит мишень-специфический элемент связывания, иначе называемый антигенсвязывающим доменом. Выбор фрагмента зависит от типа и количества антигенов-мишеней, которые определяют поверхность клетки-мишени. Например, антигенсвязывающий домен может выбираться для распознавания антигена-мишени, который выступает в качестве маркера клеточной поверхности на клетках-мишенях, связанных с конкретным болезненным состоянием. Таким образом, примеры маркеров клеточной поверхности, которые могут выступать в качестве антигенов-мишеней для антигенсвязывающего домена в TFP по настоящему изобретению, включают в себя маркеры, связанные с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями; аутоиммунными заболеваниями и раковыми заболеваниями (*например*, злокачественными заболеваниями).

[0215] В одном аспекте TFP-опосредованный Т-клеточный ответ может быть направлен на представляющий интерес антиген путем встраивания антигенсвязывающего домена в TFP, который специфически связывается с желаемым антигеном.

[0216] В одном аспекте часть TFP, содержащая антигенсвязывающий домен, содержит антигенсвязывающий домен, который нацелен на ВСМА. В одном аспекте антигенсвязывающий домен нацелен на человеческий ВСМА.

[0217] Антигенсвязывающий домен может представлять собой любой домен, который связывается с антигеном, включая, помимо прочего, моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело, человеческое антитело, гуманизованное антитело и их функциональные фрагменты, включая, помимо прочего, однодоменное антитело, такое как переменный домен тяжелой цепи (V_H), переменный домен легкой цепи (V_L) и переменный домен (V_{HH}) нанотела верблюжьего

происхождения, а также с альтернативным каркасом, известным в данной области техники, который функционирует в качестве антигенсвязывающего домена, таким как домен рекомбинантного фибронектина, антикалин, DARPIN и т. п. Аналогично, природный или синтетический лиганд, специфически распознающий и связывающийся с антигеном-мишенью, может использоваться в качестве антигенсвязывающего домена для TFP. В некоторых случаях было бы полезно, чтобы антигенсвязывающий домен был получен от того же вида, в котором TFP будет в конечном итоге использоваться. Например, для применения у людей было бы полезно, чтобы антигенсвязывающий домен TFP содержал человеческие или гуманизированные остатки для антигенсвязывающего домена антитела или фрагмента антитела.

[0218] Таким образом, в одном аспекте антигенсвязывающий домен содержит гуманизированное или человеческое антитело или фрагмент антитела, либо мышинное антитело или фрагмент антитела. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий связывающий домен против ВСМА содержит одну или более (*например*, все три) из определяющей комплементарность области 1 легкой цепи (CDR1 LC), определяющей комплементарность области 2 легкой цепи (CDR2 LC) и определяющей комплементарность области 3 легкой цепи (CDR3 LC) гуманизированного или человеческого связывающего домена против ВСМА, описанного в настоящем документе, и/или одну или более (*например*, все три) из определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющей комплементарность области 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и определяющей комплементарность области 3 тяжелой цепи (CDR3 HC) гуманизированного или человеческого связывающего домена против ВСМА, описанного в настоящем документе, *например*, гуманизированный или человеческий связывающий домен против ВСМА содержит одну или более, *например*, все три, CDR LC и одну или более, *например*, все три, CDR HC. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий связывающий домен против ВСМА содержит одну или более (*например*, все три) из определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющей комплементарность области 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и определяющей комплементарность области 3 тяжелой цепи (CDR3 HC) гуманизированного или человеческого связывающего домена против ВСМА, описанного в настоящем документе, *например*, гуманизированный или человеческий связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена имеет два переменных участка тяжелой цепи, каждый из которых содержит CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC, описанные в настоящем документе. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена содержит

гуманизированный или человеческий переменный участок легкой цепи, описанный в настоящем документе, и/или гуманизированный или человеческий переменный участок тяжелой цепи, описанный в настоящем документе. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена содержит гуманизированный переменный участок тяжелой цепи, описанный в настоящем документе, *например*, по меньшей мере два гуманизованных или человеческих переменных участка тяжелой цепи, описанных в настоящем документе. В одном варианте осуществления связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена представляет собой scFv, содержащий легкую цепь и тяжелую цепь аминокислотной последовательности, представленной в настоящем документе. В одном варианте осуществления связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена (*например*, scFv или V_HH nb) содержит: переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (*например*, замещения), но не более 30, 20 или 10 модификаций (*например*, замещений) аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи, представленной в настоящем документе, или последовательность с 95–99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в настоящем документе; и/или переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (*например*, замещения), но не более 30, 20 или 10 модификаций (*например*, замещений) аминокислотной последовательности переменного участка тяжелой цепи, представленной в настоящем документе, или последовательность с 95–99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в настоящем документе. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена представляет собой scFv, а переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, описанную в настоящем документе, присоединен к переменному участку тяжелой цепи, содержащему аминокислотную последовательность, описанную в настоящем документе, посредством линкера, *например*, линкера, описанного в настоящем документе. В одном варианте осуществления гуманизированный связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена включает в себя линкер (Gly₄-Ser)_n, где n равняется 1, 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно 3 или 4. Переменный участок легкой цепи и переменный участок тяжелой цепи scFv могут быть, *например*, в любой из следующих ориентаций: переменный участок легкой цепи–линкер–переменный участок тяжелой цепи или переменный участок тяжелой цепи–линкер–переменный участок легкой цепи. В

некоторых случаях линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 2 до 4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 1 до 3.

[0219] В некоторых аспектах нечеловеческое антитело является гуманизированным, где конкретные последовательности или участки антитела модифицируют для повышения сходства с антителом, которое естественным образом вырабатывается у человека, или его фрагментом. В одном аспекте антигенсвязывающий домен является гуманизированным.

[0220] Гуманизированное антитело может быть получено с помощью различных методик, известных в данной области техники, включая, помимо прочего, CDR-прививки (см., *например*, Европейский патент № EP 239,400; международную публикацию № WO 91/09967; и патенты США №№ 5,225,539, 5,530,101 и 5,585,089, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки), маскировку поверхностных остатков или изменение поверхности (см., *например*, Европейские патенты №№ EP 592,106 и EP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814 и Roguska et al., 1994, *PNAS*, 91:969-973, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки), перестановку цепей (см., *например*, патент США № 5,565,332, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки), а также методики, описанные, *например*, в публикации заявки на патент США № US2005/0042664, публикации заявки на патент США № US2005/0048617, патенте США № 6,407,213, патенте США № 5,766,886, международной публикации № WO 9317105, Tan et al., *I. Immunol.*, 169:1119-25 (2002), Caldas et al., *Protein Eng.*, 13(5):353-60 (2000), Morea et al., *Methods*, 20(3):267-79 (2000), Vaca et al., *J. Biol. Chem.*, 272(16): 10678-84 (1997), Roguska et al., *Protein Eng.*, 9(10):895-904 (1996), Couto et al., *Cancer Res.*, 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., *Cancer Res.*, 55(8): 1717-22 (1995), Sandhu J S, *Gene*, 150(2):409-10 (1994) и Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235(3):959-73 (1994), полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Часто каркасные остатки в каркасных областях будут замещены соответствующим остатком из антитела-донора CDR для изменения, например, улучшения связывания с антигеном. Эти каркасные замещения идентифицируются с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, например, путем моделирования взаимодействий CDR и каркасных остатков для определения каркасных остатков, важных для связывания с антигеном, и сравнения последовательностей для определения необычных каркасных остатков в конкретных положениях (см., *например*, Queen et al., патент США № 5,585,089 и Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323, которые включены в данное описание посредством ссылки в полном объеме.)

[0221] Гуманизированное антитело или фрагмент антитела имеет один или более аминокислотных остатков, оставшихся в нем из источника нечеловеческого происхождения. Такие аминокислотные остатки нечеловеческого происхождения часто называются «импортированными» остатками, которые обычно взяты из «импортированного» переменного домена. Как представлено в настоящем документе, гуманизированные антитела или фрагменты антител содержат одну или более CDR из молекул иммуноглобулина и каркасных областей нечеловеческого происхождения, причем аминокислотные остатки, содержащие каркас, получены полностью или в основном из зародышевой линии человека. Различные методики гуманизации антител или фрагментов антител хорошо известны в данной области техники и могут преимущественно осуществляться, следуя методу Винтера с сотрудниками (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), путем замещения CDR или последовательностей CDR грызунов на соответствующие последовательности человеческого антитела, т. е., CDR-прививки (EP 239,400; публикация согласно PCT № WO 91/09967 и патенты США №№ 4,816,567; 6,331,415; 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 6,548,640, содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки). В таких гуманизированных антителах и фрагментах антител по существу менее чем интактный человеческий переменный домен был замещен соответствующей последовательностью отличного от человека вида. Гуманизированные антитела часто являются человеческими антителами, в которых некоторые остатки CDR и, вероятно, некоторые каркасные (FR) остатки замещены остатками аналогичных участков антител грызунов. Гуманизация антител и фрагментов антител также может достигаться путем маскировки поверхностных остатков, или изменения поверхности (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., *Protein Engineering*, 7(6):805-814 (1994) и Roguska et al., *PNAS*, 91:969-973 (1994)), или перестановки цепей (патент США № 5,565,332), содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0222] Выбор человеческих переменных доменов, как легких, так и тяжелых, которые будут использоваться для создания гуманизированных антител, заключается в уменьшении антигенности. Согласно так называемому методу «наилучшего соответствия» проводится скрининг последовательности переменного домена антитела грызуна по всей библиотеке известных человеческих последовательностей переменного домена. Человеческая последовательность, которая будет ближайшей к последовательности грызуна, затем принимается за человеческий каркас (FR) для гуманизированного антитела (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987), содержание которых

полностью включено в настоящий документ посредством ссылки). В другом методе используют конкретный каркас, полученный из консенсусной последовательности всех человеческих антител конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Аналогичный каркас может использоваться для нескольких различных гуманизированных антител (см., *например*, Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993), полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления каркасную область, *например*, все четыре каркасные области, переменного участка тяжелой цепи получают из последовательности зародышевой линии V_H4-4-59. В одном варианте осуществления каркасная область может содержать одну, две, три, четыре или пять модификаций, *например*, замещений, *например*, из аминокислоты в соответствующей мышинной последовательности. В одном варианте осуществления каркасная область, *например*, все четыре каркасные области переменного участка легкой цепи получают из последовательности зародышевой линии VK3-1.25. В одном варианте осуществления каркасная область может содержать одну, две, три, четыре или пять модификаций, *например*, замещений, *например*, из аминокислоты в соответствующей мышинной последовательности.

[0223] В некоторых аспектах часть композиции TFP по настоящему изобретению, которая содержит фрагмент антитела, является гуманизированной с сохранением высокой аффинности к антигену-мишени и других предпочтительных биологических свойств. В соответствии с одним аспектом изобретения гуманизированные антитела и фрагменты антител получают в процессе анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов, используя трехмерные модели исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулина являются общедоступными и известны специалистам в данной области техники. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают возможные трехмерные конформационные структуры выбранных потенциально пригодных последовательностей иммуноглобулина. Изучение таких отображений позволяет провести анализ вероятной роли остатков в функционировании потенциально пригодных последовательностей иммуноглобулина, *например*, анализ остатков, которые влияют на способность потенциально пригодного иммуноглобулина связываться с антигеном-мишенью. Следовательно, FR-остатки могут выбираться и объединяться из реципиентных и импортированных последовательностей, таким образом, что будет достигаться желаемая характеристика антитела или фрагмента антитела, такая как повышенная аффинность к антигену-мишени. В целом, остатки CDR непосредственно и в существенной степени

вовлечены в воздействие на связывание с антигеном.

[0224] В одном аспекте связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена представляет собой фрагмент, *например*, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) верблюдовой тяжелой цепи (V_HH). В одном аспекте связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена представляет собой Fv, Fab, (Fab')₂ или бифункциональное (*например*, биспецифическое) гибридное антитело (*например*, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). В одном аспекте антитела и их фрагменты по настоящему изобретению связываются с белком ассоциированного с опухолью антигена с аффинностью дикого типа или повышенной аффинностью.

[0225] Также в настоящем документе предложены способы получения антигенсвязывающего домена антитела, специфического к антигену-мишени (например, к ВСМА или любому антигену-мишени, описанному в другом месте настоящего документе, для нацеливания связывающих доменов гибридного фрагмента), при этом способ включает в себя обеспечение путем добавления, делеции, замещения или вставки одной или более аминокислот в аминокислотной последовательности домена V_H (или V_HH), указанного в настоящем документе, причем домен V_H , который является вариантом аминокислотной последовательности домена V_H , необязательно объединяет предоставленный таким образом домен V_H с одним или более доменов V_L , и тестирование домена V_H или комбинации или комбинаций V_H/V_L для выявления конкретного члена связывания или антигенсвязывающего домена антитела, специфического к представляющему интерес антигену-мишени (НАПРИМЕР, ВСМА) и необязательно имеющего одно или более желаемых свойств.

[0226] В некоторых случаях домены V_H и scFv могут быть получены в соответствии со способом, известным в данной области техники (см., например, Bird et al., (1988) Science 242:423-426 и Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Молекулы scFv могут быть получены путем связывания вместе участков V_H и V_L , используя гибкие полипептидные линкеры. Молекулы scFv содержат линкер (например, линкер Ser-Gly) с оптимизированной длиной и/или аминокислотной композицией. Длина линкера может в значительной степени повлиять на то, каким образом будут складываться и взаимодействовать вариабельные участки. Фактически, если используется короткий полипептидный линкер (*например*, между 5 и 10 аминокислотами), предотвращается внутрицепочечное складывание. Внутрицепочечное складывание также требуется для того, чтобы соединить два вариабельных участка вместе для образования участка связывания функционального эпитопа. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 2 до 4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит

$(G_4S)_n$, где $n =$ от 1 до 3. Примеры ориентации и размеров линкера см., *например*, в Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, публикациях заявки на патент США №№. 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794, а также в публикациях согласно РСТ №№ W02006/020258 и W02007/024715, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

[0227] scFv может содержать линкер с около 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более чем 15 остатками между его участками V_L и V_H . Линкерная последовательность может содержать любую встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит аминокислоты глицин и серин. В другом варианте осуществления линкерная последовательность содержит наборы глициновых и сериновых повторов, таких как $(Gly_4Ser)_n$, где n — это положительное целое число, которое равняется или больше 1. В одном варианте осуществления линкер может представлять собой $(Gly_4Ser)_4$ или $(Gly_4Ser)_3$. Вариации длины линкера могут сохранять или повышать активность, обуславливая превосходную эффективность в исследованиях активности. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 2 до 4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 1 до 3.

3. Стабильность и мутации

[0228] Стабильность связывающего домена против ассоциированного с опухолью антигена, *например*, молекул scFv (например, растворимого scFv), можно оценивать по отношению к биофизическим свойствам (например, термической стабильности) традиционной контрольной молекулы scFv или полноразмерного антитела. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий scFv обладает термической стабильностью, которая составляет более чем около 0,1, около 0,25, около 0,5, около 0,75, около 1, около 1,25, около 1,5, около 1,75, около 2, около 2,5, около 3, около 3,5, около 4, около 4,5, около 5, около 5,5, около 6, около 6,5, около 7, около 7,5, около 8, около 8,5, около 9, около 9,5, около 10 градусов, около 11 градусов, около 12 градусов, около 13 градусов, около 14 градусов или около 15 градусов Цельсия по сравнению с родительским scFv в описанных анализах.

[0229] Улучшенная термическая стабильность связывающего домена против ассоциированного с опухолью антигена, *например*, scFv, впоследствии будет присуща всей конструкции ассоциированный с опухолью антиген-TFP, что приведет к улучшению терапевтических свойств конструкции TFP против ассоциированного с опухолью антигена. Термическую стабильность связывающего домена против ассоциированного с опухолью антигена, *например*, scFv, можно улучшить на по меньшей мере около 2°C или 3°C по сравнению с традиционным антителом. В одном варианте осуществления связывающий

домен против ассоциированного с опухолью антигена, *например*, scFv, имеет улучшенную на 1°C термическую стабильность по сравнению с традиционным антителом. В другом варианте осуществления связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена, *например*, scFv, имеет улучшенную на 2°C термическую стабильность по сравнению с традиционным антителом. В другом варианте осуществления scFv имеет улучшенную на 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, 10°C, 11°C, 12°C, 13°C, 14°C или 15°C термическую стабильность по сравнению с традиционным антителом. Сравнения можно проводить, например, между молекулами scFv, описанными в настоящем документе, и молекулами scFv или Fab-фрагментами антитела, из которого были получены V_H и V_L scFv. Термическую стабильность можно измерить с помощью способов, известных в данной области техники. Например, в одном варианте осуществления можно измерить T_M. Способы измерения T_M и другие способы определения стабильности белка описаны далее.

[0230] Мутации в scFv (возникающие вследствие гуманизации или мутагенеза растворимого scFv) изменяют стабильность scFv и улучшают общую стабильность scFv и конструкции TFR против ассоциированного с опухолью антигена. Стабильность гуманизованного scFv сравнивают по отношению к мышинному scFv, используя измерения, такие как T_M, температурная денатурация и температурная агрегация. В одном варианте осуществления связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена, *например*, scFv, содержит по меньшей мере одну мутацию, возникающую вследствие процесса гуманизации таким образом, что мутировавший scFv обеспечивает улучшенную стабильность в конструкции TFR против ассоциированного с опухолью антигена. В другом варианте осуществления связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена, *например*, scFv, содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 мутаций, возникающих вследствие процесса гуманизации таким образом, что мутировавший scFv обеспечивает улучшенную стабильность в конструкции ассоциированный с опухолью антиген-TFR.

[0231] В одном аспекте антигенсвязывающий домен TFR содержит аминокислотную последовательность, которая является гомологичной с аминокислотной последовательностью антигенсвязывающего домена, описанной в настоящем документе, а антигенсвязывающий домен сохраняет желаемые функциональные свойства фрагментов антител к ассоциированному с опухолью антигену, описанных в настоящем документе. В одном конкретном аспекте композиция TFR по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В дополнительном аспекте фрагмент антитела содержит scFv.

[0232] В различных аспектах антигенсвязывающий домен TFR конструируется путем

модификации одной или более аминокислот в пределах одного или обоих переменных участков (*например*, V_H и/или V_L), например, в пределах одной или более областей CDR и/или в пределах одной или более каркасных областей. В одном конкретном аспекте композиция TFP по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В дополнительном аспекте фрагмент антитела содержит scFv.

[0233] Специалисту в данной области техники будет понятно, что антитело или фрагмент антитела по настоящему изобретению может дополнительно модифицироваться таким образом, что они будут отличаться в отношении аминокислотной последовательности (*например*, от дикого типа), однако не в отношении желаемой активности. Например, дополнительные нуклеотидные замещения, приводящие к аминокислотным замещениям в «заменяемых» аминокислотных остатках, могут быть выполнены для белка. Например, заменяемый аминокислотный остаток в молекуле может быть замещен другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. В другом варианте осуществления нить аминокислот может быть замещена структурно аналогичной нитью, которая отличается порядком и/или композицией членов семейства боковых цепей, *например*, может быть осуществлено консервативное замещение, в котором аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь.

[0234] Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (*например*, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (*например*, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (*например*, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (*например*, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (*например*, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (*например*, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

[0235] Процент идентичности в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относится к двум или более последовательностям, которые являются одинаковыми. Две последовательности являются «по существу идентичными», если две последовательности обладают указанным процентным содержанием аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (*например*, 60% идентичности, необязательно 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности в указанном участке или, если это не указано, во всей последовательности), при сравнении или выравнивании для

максимального совпадения в окне сравнения или обозначенной области, как определено с применением одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей, либо путем выравнивания вручную и при визуальной проверке. Необязательно, идентичность существует в отношении области, составляющей в длину по меньшей мере около 50 нуклеотидов (или 10 аминокислот), или более предпочтительно в отношении области, составляющей в длину от 100 до 500 или 1000 или более нуклеотидов (или 20, 50, 200 или более аминокислот).

[0236] При сравнении последовательностей, как правило, одна последовательность служит эталонной последовательностью, с которой сравнивают исследуемые последовательности. При применении алгоритма сравнения последовательностей исследуемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости обозначают координаты последовательности и указывают программные параметры алгоритма для работы с последовательностями. Можно использовать программные параметры по умолчанию или указать альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности последовательностей для исследуемых последовательностей по сравнению с эталонной последовательностью на основании программных параметров. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно выполнять, *например*, посредством алгоритма локальной гомологии согласно Smith and Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c, алгоритма гомологичного выравнивания согласно Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443, поиска по методу сходства согласно Pearson and Lipman, (1988) Proc Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, путем компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., г. Мэдисон, штат Висконсин, США) или ручного выравнивания и визуального осмотра (см., *например*, Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biology). Двумя примерами алгоритмов, подходящих для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 и Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, соответственно. Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST является общедоступным через Национальный центр биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information).

[0237] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает модификации исходной аминокислотной последовательности антитела или фрагмента (*например*, scFv), которая образует функционально эквивалентные молекулы. *Например*, V_H или V_L

связывающего домена против ассоциированного с опухолью антигена, *например*, scFv, содержащийся в TFP, можно модифицировать для сохранения по меньшей мере около 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности исходной каркасной области V_H или V_L связывающего домена против ассоциированного с опухолью антигена, *например*, scFv. Настоящее изобретение предусматривает модификации всей конструкции TFP, *например*, модификации одной или более аминокислотных последовательностей различных доменов конструкции TFP, чтобы получить функционально эквивалентные молекулы. Конструкцию TFP можно модифицировать, чтобы сохранить по меньшей мере около 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности исходной конструкции TFP.

4. Внеклеточный домен

[0238] Внеклеточный домен может быть получен либо из природного, либо из рекомбинантного источника. Если источник является природным, то домен может быть получен из любого белка, но в особенности из связанного с мембраной или трансмембранного белка. В одном аспекте внеклеточный домен способен связываться с трансмембранным доменом. Внеклеточный домен для конкретного применения в настоящем изобретении может включать в себя по меньшей мере внеклеточные области, *например*, альфа-, бета- или дзета-цепи T-клеточного рецептора либо CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, или в альтернативных вариантах осуществления CD28, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154.

5. Трансмембранный домен

[0239] В целом, последовательность TFP содержит внеклеточный домен и трансмембранный домен, кодируемые одной геномной последовательностью. В альтернативных вариантах осуществления TFP может быть сконструирован с возможностью включения в себя трансмембранного домена, который является гетерологичным внеклеточному домену TFP. Трансмембранный домен может включать в себя одну или более дополнительных аминокислот, смежных с трансмембранной областью, *например*, одну или более аминокислот, связанных с внеклеточной областью белка, из которого был получен трансмембранный белок (*например*, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более аминокислот внеклеточной области), и/или одну или более дополнительных аминокислот, связанных с внутриклеточной областью белка, из которого был получен трансмембранный белок (*например*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,

25, 26, 27, 28, 29, 30 или более аминокислот внутриклеточной области). В некоторых случаях трансмембранный домен может включать в себя по меньшей мере 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 или более аминокислот внеклеточной области. В некоторых случаях трансмембранный домен может включать в себя по меньшей мере 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 или более аминокислот внутриклеточной области. В одном аспекте применяют трансмембранный домен, который связан с одним из доменов в TFP. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть выбран из или модифицирован посредством аминокислотного замещения во избежание связывания таких доменов с трансмембранными доменами аналогичных или различных белков поверхностной мембраны, *например*, для сведения к минимуму взаимодействий с другими членами комплекса рецепторов. В одном аспекте трансмембранный домен способен к гомодимеризации с другим TFP на поверхности TFP-Т-клетки. В другом аспекте аминокислотная последовательность трансмембранного домена может быть модифицирована или замещена таким образом, чтобы минимизировать взаимодействия со связывающими доменами нативного партнера по связыванию, который присутствует в том же TFP.

[0240] Трансмембранный домен может быть получен либо из природного, либо из рекомбинантного источника. Если источник является природным, то домен может быть образован из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. В одном аспекте трансмембранный домен способен к передаче сигналов внутриклеточным доменам каждый раз, когда TFP связался с мишенью. Трансмембранный домен для конкретного применения в настоящем изобретении может включать в себя по меньшей мере трансмембранные области, *например*, альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154.

[0241] В некоторых случаях трансмембранный домен может быть присоединен к внеклеточной области TFP, *например*, антигенсвязывающему домену TFP посредством шарнира, *например*, шарнира из человеческого белка. Например, в одном варианте осуществления шарнир может представлять собой шарнир человеческого иммуноглобулина (Ig), *например*, шарнир IgG4 или шарнир CD8a.

6. Линкеры

[0242] Необязательно, короткий олиго- или полипептидный линкер длиной от 2 до 10 аминокислот может образовать связь между трансмембранным доменом и цитоплазматической областью TFP. Глицин-сериновый дублет обеспечивает особенно подходящий линкер. Например, в одном аспекте линкер содержит аминокислотную последовательность **GGGSGGGGS**. В некоторых вариантах осуществления линкер

кодируется нуклеотидной последовательностью
GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC.

7. Цитоплазматический домен

[0243] Цитоплазматический домен TFP может включать в себя внутриклеточный сигнальный домен, если TFP содержит полипептиды CD3 гамма, дельта или эпсилон; субъединицы TCR альфа и TCR бета, как правило, не содержат сигнальный домен. Внутриклеточный сигнальный домен, как правило, отвечает за активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки, в которую был введен TFP. Термин «эффекторная функция» относится к специализированной функции клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность или хелперную активность, в том числе секрецию цитокинов. Таким образом, термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к части белка, которая передает сигнал эффекторной функции и направляет клетку на выполнение специализированной функции. Тогда как обычно может использоваться весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать всю цепь. В той мере, в которой используется усеченная часть внутриклеточного сигнального домена, такая усеченная часть может использоваться вместо интактной цепи до тех пор, пока она будет передавать сигнал эффекторной функции. Таким образом, подразумевается, что термин внутриклеточный сигнальный домен включает в себя любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для передачи сигнала эффекторной функции.

[0244] К примерам внутриклеточных сигнальных доменов для применения в TFP по настоящему изобретению относятся цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR) и корецепторы, которые действуют согласованно для инициации трансдукции сигнала после задействования рецепторов антигенов, а также любое производное или вариант этих последовательностей и любая рекомбинантная последовательность с такой же функциональной способностью.

[0245] Известно, что создаваемых только TCR сигналов недостаточно для полной активации наивных Т-клеток и что требуется вторичный и/или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация наивных Т-клеток может опосредоваться двумя различными классами цитоплазматических последовательностей сигнализации: теми, что иницируют антигензависимую первичную активацию посредством TCR (домены первичной внутриклеточной сигнализации), и теми, что действуют независимым от антигенов образом для обеспечения вторичного или костимулирующего сигнала (вторичный цитоплазматический домен, *например*, костимулирующий домен).

[0246] Домен первичной сигнализации регулирует первичную активацию комплекса TCR либо стимулирующим путем, либо ингибирующим путем. Домены первичной внутриклеточной сигнализации, действующие стимулирующим путем, могут содержать мотивы сигнализации, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM).

[0247] Примеры ITAM, содержащих домены первичной внутриклеточной сигнализации, которые предназначены для конкретного применения в настоящем изобретении, включают в себя ITAM CD3 дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эpsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В одном варианте осуществления TFP по настоящему изобретению содержит внутриклеточный сигнальный домен, *например*, домен первичной сигнализации CD3 эpsilon. В одном варианте осуществления домен первичной сигнализации содержит модифицированный домен ITAM, *например*, мутировавший домен ITAM, который изменил (*например*, повысил или снизил) активность по сравнению с нативным доменом ITAM. В одном варианте осуществления домен первичной сигнализации содержит модифицированный домен первичной внутриклеточной сигнализации, содержащий ITAM, *например*, оптимизированный и/или усеченный домен первичной внутриклеточной сигнализации, содержащий ITAM. В одном варианте осуществления домен первичной сигнализации содержит один, два, три, четыре или более мотивов ITAM.

[0248] Внутриклеточный сигнальный домен TFP может содержать сигнальный домен CD3 дзета отдельно или в комбинации с любыми другими желаемыми внутриклеточными сигнальными доменами, пригодными в контексте TFP по настоящему изобретению. Например, внутриклеточный сигнальный домен TFP может содержать часть эpsilon-цепи CD3 и костимулирующий сигнальный домен. Костимулирующий сигнальный домен относится к части TFP, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности, отличающуюся от рецептора антигена или его лигандов, которая требуется для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. К примерам подобных молекул относятся CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD1, ICOS, связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83, и т. п. Например, было показано, что костимуляция CD27 усиливает размножение, эффекторную функцию и выживаемость человеческих TFP-T-клеток *in vitro* и увеличивает стойкость и противоопухолевую активность человеческих T-клеток *in vivo* (Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706).

[0249] Внутриклеточные сигнальные последовательности в цитоплазматической части TFP

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

[0250] В одном варианте осуществления глицин-сериновый дублет может использоваться в качестве подходящего линкера. В одном варианте осуществления одна аминокислота, *например*, аланин, глицин, может использоваться в качестве подходящего линкера.

[0251] В одном аспекте TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, может дополнительно содержать второй TFP, *например*, второй TFP, который включает в себя другой антигенсвязывающий домен, *например*, для той же мишени (*например*, MUC16 или MSLN) или для другой мишени (*например*, MUC16 или MSLN). В одном варианте осуществления, когда TFP-экспрессирующая клетка содержит два или более различных TFP, антигенсвязывающие домены различных TFP могут быть такими, которые не будут взаимодействовать друг с другом. *Например*, клетка, экспрессирующая первый и второй TFP, может иметь антигенсвязывающий домен первого TFP, *например*, в качестве фрагмента, *например*, scFv, который не будет связываться с антигенсвязывающим доменом второго TFP, *например*, антигенсвязывающий домен второго TFP представляет собой V_{НН}.

[0252] В другом аспекте TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, может дополнительно экспрессировать другое вещество, *например*, вещество, которое повышает активность TFP-экспрессирующей клетки. *Например*, в одном варианте осуществления вещество может быть таким, которое ингибирует ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, *например*, PD1, могут в некоторых вариантах осуществления снижать способность TFP-экспрессирующей клетки установить иммунный эффекторный ответ. К примерам ингибирующих молекул относится PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR бета. В одном варианте осуществления вещество, ингибирующее ингибирующую молекулу, содержит первый полипептид, *например*, ингибирующую молекулу, связанный со вторым полипептидом, который обеспечивает положительный сигнал для клетки, *например*, внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем документе. В одном варианте осуществления вещество содержит первый полипептид, *например*, ингибирующей молекулы, такой как PD1, LAG3, CTLA4, CD160, BTLA, LAIR1, TIM3, 2B4 и TIGIT, или фрагмент любого из них (*например*, по меньшей мере часть внеклеточного домена любого из них), и второй полипептид, который представляет собой внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем документе (*например*, содержащий костимулирующий домен (*например*, 4-1BB, CD27 или CD28, *например*, как было описано в настоящем документе) и/или домен

первичной сигнализации (*например*, сигнальный домен CD3 дзета, описанный в настоящем документе). В одном варианте осуществления вещество содержит первый полипептид PD1 или его фрагмент (*например*, по меньшей мере часть внеклеточного домена PD1) и второй полипептид внутриклеточного сигнального домена, описанного в настоящем документе (*например*, сигнальный домен CD28, описанный в настоящем документе, и/или сигнальный домен CD3 дзета, описанный в настоящем документе). PD1 представляет собой ингибирующий член семейства CD28 рецепторов, которое также включает в себя CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. PD-1 экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и миелоидных клетках (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75). Было продемонстрировано, что два лиганда для PD1, PD-L1 и PD-L2, снижают активацию Т-клеток при связывании с PD1 (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43). PD-L1 является распространенным в раковых заболеваниях человека (Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094).

Иммуносупрессия может быть обратима путем ингибирования локального взаимодействия PD1 с PD-L1.

[0253] В одном варианте осуществления вещество содержит внеклеточный домен (ECD) ингибирующей молекулы, *например*, белок запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1) могут сливаться с трансмембранным доменом и необязательно внутриклеточным сигнальным доменом, таким как 41BB и CD3 дзета (также называемый в настоящем документе как PD1 TFP). В одном варианте осуществления PD1 TFP при применении в комбинациях с TFP против опухолевого антигена, описанным в настоящем документе, улучшает стойкость Т-клетки. В одном варианте осуществления TFP представляет собой PD1 TFP, содержащий внеклеточный домен PD 1. Альтернативно, предложены TFP, содержащие антитело или фрагмент антитела, такой как scFv, который специфически связывается с лигандом запрограммированной гибели клеток 1 (PD-L1) или лигандом запрограммированной гибели клеток 2 (PD-L2).

[0254] В другом аспекте в настоящем изобретении предложена популяция TFP-экспрессирующих Т-клеток, *например*, TFP-Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция TFP-экспрессирующих Т-клеток содержит смесь клеток, экспрессирующих различные TFP. Например, в одном варианте осуществления популяция TFP-Т-клеток может включать в себя первую клетку, экспрессирующую TFP, имеющий связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена, описанный в настоящем документе, и вторую клетку, экспрессирующую TFP, имеющий другой связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена, *например*,

связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена, описанный в настоящем документе, который отличается от связывающего домена против ассоциированного с опухолью антигена в TFP, экспрессируемом первой клеткой. В качестве другого примера, популяция TFP-экспрессирующих клеток может включать в себя первую клетку, экспрессирующую TFP, который включает в себя связывающий домен против ассоциированного с опухолью антигена, *например*, как описано в настоящем документе, и вторую клетку, экспрессирующую TFP, который включает в себя антигенсвязывающий домен для мишени, отличной от ассоциированного с опухолью антигена (*например*, другой ассоциированный с опухолью антиген).

[0255] В другом аспекте в настоящем изобретении предложена популяция клеток, причем по меньшей мере одна клетка в популяции экспрессирует TFP, имеющий домен против ассоциированного с опухолью антигена, описанный в настоящем документе, а вторая клетка экспрессирует другое вещество, *например*, вещество, которое повышает активность TFP-экспрессирующих клеток. Например, в одном варианте осуществления вещество может быть таким, которое ингибирует ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, *например*, могут в некоторых вариантах осуществления снижать способность TFP-экспрессирующей клетки установить иммунный эффекторный ответ. К примерам ингибирующих молекул относится PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR бета. В одном варианте осуществления вещество, ингибирующее ингибирующую молекулу, содержит первый полипептид, *например*, ингибирующую молекулу, связанный со вторым полипептидом, который обеспечивает положительный сигнал для клетки, *например*, внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем документе.

[0256] В настоящем документе описаны способы получения транскрибированной *in vitro* РНК, кодирующей TFP. Настоящее изобретение также включает в себя кодирующую TFP конструкцию РНК, которую можно непосредственно трансфицировать в клетку. Способ получения мРНК для применения с целью трансфекции может включать в себя транскрипцию *in vitro* (IVT) матрицы со специально сконструированными праймерами с последующим добавлением поли(А), чтобы получить конструкцию, содержащую 3' и 5' нетранслируемую последовательность («UTR»), 5'-кэп и/или внутренний участок посадки рибосомы (IRES), нуклеиновую кислоту, подлежащую экспрессии, и поли(А)-хвост, как правило, длиной 50–2000 оснований. Полученная таким образом РНК может эффективно трансфицировать различные типы клеток. В одном аспекте матрица включает в себя последовательности для TFP.

[0257] В одном аспекте TFP против ассоциированного с опухолью антигена кодируется

матричной РНК (мРНК). В одном аспекте мРНК, кодирующая TFR против ассоциированного с опухолью антигена, вводится в Т-клетку для получения TFR-Т-клетки. В одном варианте осуществления транскрибированная *in vitro* РНК TFR может вводиться в клетку как форма временной трансфекции. РНК получают путем транскрипции *in vitro*, используя матрицу, созданную в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Представляющую интерес ДНК из любого источника можно непосредственно преобразовать методом ПЦР в матрицу для *in vitro* синтеза мРНК с помощью соответствующих праймеров и РНК-полимеразы. Источником ДНК может быть, например, геномная ДНК, плазмидная ДНК, фаговая ДНК, кДНК, последовательность синтетической ДНК или любой другой подходящий источник ДНК. Желаемой матрицей для транскрипции *in vitro* является TFR по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления ДНК для применения в ПЦР содержит открытую рамку считывания. ДНК может быть получена из встречающейся в природе последовательности ДНК из генома организма. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота может включать в себя некоторые или все из 5' и/или 3' нетранслируемых областей (UTR). Нуклеиновая кислота может включать в себя экзоны и интроны. В одном варианте осуществления ДНК для применения в ПЦР представляет собой человеческую последовательность нуклеиновой кислоты. В другом варианте осуществления ДНК для применения в ПЦР представляет собой человеческую последовательность нуклеиновой кислоты, включая 5' и 3' UTR. ДНК может альтернативно представлять собой последовательность искусственной ДНК, которая обычно не экспрессируется у встречающихся в природе организмов. Примером последовательности искусственной ДНК является последовательность, которая содержит часть генов, которые лигируются вместе для образования открытой рамки считывания, которая кодирует гибридный белок. Части ДНК, которые лигируются вместе, могут быть получены от одного организма или от более чем одного организма.

[0258] ПЦР применяется для создания матрицы для *in vitro* транскрипции мРНК, которая используется для трансфекции. Способы проведения ПЦР хорошо известны в данной области техники. Праймеры для применения в ПЦР разработаны таким образом, чтобы они содержали области, по существу комплементарные областям ДНК, которые будут использоваться в качестве матрицы для ПЦР. Как используется в настоящем документе, «по существу комплементарный» относится к последовательностям нуклеотидов, в которых большинство или все основания в последовательности праймеров являются комплементарными, или одно или более оснований не являются комплементарными или не совпадают. По существу комплементарные последовательности способны к ренатурации или гибридизации с предполагаемой ДНК-мишенью в условиях ренатурации,

используемых для ПЦР. Праймеры могут быть разработаны таким образом, чтобы быть по существу комплементарными любой части матрицы ДНК. Например, праймеры могут быть разработаны таким образом, чтобы амплифицировать часть нуклеиновой кислоты, которая обычно транскрибируется в клетках (открытая рамка считывания), включая 5' и 3' UTR. Праймеры также могут быть разработаны таким образом, чтобы амплифицировать часть нуклеиновой кислоты, которая кодирует конкретный домен, представляющий интерес. В одном варианте осуществления праймеры разработаны таким образом, чтобы амплифицировать кодирующий участок человеческой кДНК, включая все или часть 5' и 3' UTR. Праймеры, применяемые в ПЦР, могут быть получены способами синтеза, которые хорошо известны в данной области техники. «Прямые праймеры» — это праймеры, которые содержат участок нуклеотидов, которые по существу комплементарны нуклеотидам на матрице ДНК, которые расположены выше по ходу транскрипции в последовательности ДНК, которая должна быть амплифицирована. «Расположенный выше» используется в настоящем документе для обозначения места 5' в последовательности ДНК, которая должна быть амплифицирована, по отношению к кодирующей цепи. «Обратные праймеры» — это праймеры, которые содержат участок нуклеотидов, которые по существу комплементарны матрице двухцепочечной ДНК, которые расположены ниже по ходу транскрипции в последовательности ДНК, которая должна быть амплифицирована. «Расположенный ниже» используется в настоящем документе для обозначения места 3' в последовательности ДНК, которая должна быть усилена, по отношению к кодирующей цепи.

[0259] Любая ДНК-полимераза, используемая в ПЦР, может применяться в способах, описанных в настоящем документе. Реагенты и полимераза коммерчески доступны из различных источников.

[0260] Также могут использоваться химические структуры, способные обеспечивать стабильность и/или эффективность трансляции. РНК предпочтительно имеет 5' и 3' UTR. В одном варианте осуществления 5' UTR имеет длину от одного до 3000 нуклеотидов. Длину последовательностей 5' и 3' UTR, которые будут добавлены к кодирующему участку, можно изменить различными способами, включая, помимо прочего, разработку праймеров для ПЦР, которые ренатурируются с различными участками UTR. Используя такой подход, специалист в данной области техники сможет модифицировать длину 5' и 3' UTR, необходимую для достижения оптимальной эффективности трансляции после трансфекции транскрибированной РНК.

[0261] 5' и 3' UTR могут быть природными, эндогенными 5' и 3' UTR для представляющей интерес нуклеиновой кислоты. Альтернативно, последовательности UTR, которые не

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

[0262] В одном варианте осуществления 5' UTR может содержать последовательность Козак эндогенной нуклеиновой кислоты. Альтернативно, при добавлении 5' UTR, которая не является эндогенной по отношению к представляющей интерес нуклеиновой кислоте, путем ПЦР, как было описано выше, консенсусная последовательность Козак может быть переделана путем добавления последовательности 5' UTR. Последовательность Козак может повышать эффективность трансляции некоторых транскриптов РНК, однако похоже, что она не требуется для всех РНК, чтобы обеспечить эффективную трансляцию. Необходимость последовательностей Козак для многих мРНК известна в данной области техники. В других вариантах осуществления 5' UTR может представлять собой 5' UTR РНК-вируса, чей геном РНК является стабильным в клетках. В других вариантах осуществления различные нуклеотидные аналоги могут использоваться в 3' или 5' UTR, чтобы воспрепятствовать деградации мРНК экзонуклеазами.

[0263] Чтобы обеспечить синтез РНК из матрицы ДНК без необходимости использовать клонирование генов, промотор транскрипции следует присоединить к матрице ДНК выше транскрибируемой последовательности. Когда последовательность, которая действует в качестве промотора для РНК-полимеразы, добавляют к 5'-концу прямого праймера, промотор РНК-полимеразы становится включенным в продукт ПЦР выше транскрибируемой открытой рамки считывания. В одном предпочтительном варианте осуществления промотор представляет собой промотор полимеразы T7, как описано в любом другом месте настоящего документа. К другим пригодным для применения промоторам относятся, помимо прочего, промоторы РНК-полимеразы T3 и SP6. Консенсусные нуклеотидные последовательности для промоторов T7, T3 и SP6 известны в данной области техники.

[0264] В предпочтительном варианте осуществления мРНК содержит кэп на 5'-конце и 3'-поли(А)-хвост, которые определяют связывание рибосомы, инициацию трансляции и

стабильность мРНК в клетке. На матрице кольцевой ДНК, например, плазмидной ДНК, РНК-полимераза вырабатывает длинный конкатемерный продукт, не пригодный для экспрессии в эукариотических клетках. Транскрипция плазмидной ДНК, линеаризованной на конце 3' UTR, приводит к получению мРНК нормального размера, которая не является эффективной при эукариотической трансфекции, даже если после транскрипции она будет полиаденилирована.

[0265] На матрице линейной ДНК РНК-полимераза фага T7 может расширять 3'-конец транскрипта за пределы последнего основания матрицы (Schenborn and Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003).

[0266] Традиционным способом интеграции полиА/Т-участков в матрицу ДНК является молекулярное клонирование. Однако полиА/Т-последовательность, интегрированная в плазмидную ДНК, может привести к нестабильности плазмиды, что является причиной того, почему матрицы плазмидной ДНК, полученные из бактериальных клеток, часто в значительной степени загрязнены делециями и другими абберациями. Это делает процедуры клонирования не только трудоемкими и занимающими много времени, но часто и ненадежными. Поэтому крайне желательным является способ, который позволяет конструировать матрицы ДНК с полиА/Т 3'-участком без применения клонирования.

[0267] ПолиА/Т-сегмент транскрипционной матрицы ДНК может быть получен в процессе ПЦР, используя обратный праймер, содержащий полиТ-хвост, такой как хвост 100 Т (размер может составлять 50–5000 Т), или после ПЦР с помощью любого другого способа, включая, помимо прочего, лигирование ДНК или рекомбинацию *in vitro*. Поли(А)-хвосты также обеспечивают стабильность РНК и снижают их деградацию.

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

[0268] Поли(А)-хвосты РНК могут быть дополнительно расширены после транскрипции *in vitro*, используя поли(А)-полимеразу, такую как поли(А)-полимераза *E. Coli* (E-PAP). В одном варианте осуществления увеличение длины поли(А)-хвоста со 100 нуклеотидов до от 300 до 400 нуклеотидов приводит приблизительно к двукратному повышению эффективности трансляции РНК. Кроме того, присоединение различных химических групп к 3'-концу может увеличить стабильность мРНК. Такое присоединение может содержать модифицированные/искусственные нуклеотиды, аптамеры и другие соединения. Например, аналоги АТР могут быть включены в поли(А)-хвост с помощью поли(А)-полимеразы. Аналоги АТР могут дополнительно увеличивать стабильность РНК.

[0269] 5'-кэпы также обеспечивают стабильность молекул РНК. В предпочтительном варианте осуществления РНК, полученные с помощью способов, описанных в настоящем документе, включают в себя 5'-кэп. 5'-кэп получают с помощью методик, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе (Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001), Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

[0270] РНК, полученные с помощью способов, описанных в настоящем документе, могут также содержать последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES). Последовательность IRES может представлять собой любую вирусную, хромосомную или искусственно созданную последовательность, которая инициирует кэп-независимое связывание рибосомы с мРНК и способствует инициации трансляции. Могут быть добавлены любые растворенные вещества для клеточной электропорации, которые могут содержать факторы, способствующие клеточной проницаемости и жизнеспособности, такие как сахара, пептиды, липиды, белки, антиоксиданты и поверхностно-активные вещества.

[0271] РНК могут вводить в клетки-мишени, используя любой из целого ряда различных способов, например, коммерчески доступные способы, которые включают в себя, помимо прочего, электропорацию (Amaha Nucleofector-II (Amaha Biosystems, Кельн, Германия)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Бостон, штат Массачусетс) или электропоратор Gene Pulser II (BioRad, Денвер, штат Колорадо), Multiporator (Eppendorf, Гамбург, Германия), опосредованную катионными липосомами трансфекцию с применением липофекции, инкапсуляцию полимерами, опосредованную пептидами трансфекцию или биолистические системы доставки частиц, такие как «генные пушки» (см., например, Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8): 861-70 (2001)).

8. Конструкции нуклеиновых кислот, кодирующие TFP

[0272] В настоящем изобретении также предлагаются молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие одну или более конструкций TFP, описанных в настоящем документе. В одном аспекте молекула нуклеиновой кислоты представлена в качестве транскрипта матричной РНК. В одном аспекте молекула нуклеиновой кислоты представлена в качестве конструкции ДНК.

[0273] Последовательности нуклеиновой кислоты, ориентированные на желаемые молекулы, могут быть получены с помощью рекомбинантных способов, известных в данной области техники, как, например, путем скрининга библиотек из клеток, экспрессирующих ген, путем получения гена из вектора, известного как содержащий этот ген, или путем непосредственного выделения из клеток и тканей, содержащих его,

используя стандартные методики. Альтернативно, представляющий интерес ген может быть получен синтетическим путем, а не клонированием.

[0274] В настоящем изобретении также предложены векторы, в которые встраивается ДНК по настоящему изобретению. Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, являются подходящими инструментами для достижения долговременного переноса гена, поскольку они обеспечивают долгосрочную стабильную интеграцию трансгена и его размножение в дочерних клетках. Лентивирусные векторы обладают дополнительным преимуществом перед векторами, полученными из онкоретровирусов, таких как вирусы лейкоза мышей, в том отношении, что они могут трансдуцировать неразмножающиеся клетки, такие как гепатоциты. У них также есть дополнительное преимущество в виде низкой иммуногенности.

[0275] В другом варианте осуществления вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую желаемый TFP по настоящему изобретению, представляет собой аденовирусный вектор (A5/35). В другом варианте осуществления экспрессия нуклеиновых кислот, кодирующих TFP, может быть осуществлена с помощью транспозонов, таких как «спящая красавица», «крипер», CAS9 и нуклеаза с цинковыми пальцами (см. June et al. 2009 Nature Reviews Immunol. 9.10: 704-716, включенный в настоящий документ посредством ссылки).

[0276] Экспрессирующие конструкции по настоящему изобретению также могут использоваться для иммунизации нуклеиновой кислотой и генной терапии, используя стандартные протоколы доставки генов. Способы доставки генов известны в данной области техники (см., например, патенты США №№ 5,399,346, 5,580,859, 5,589,466, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки). В другом варианте осуществления в изобретении предложен вектор для генной терапии.

[0277] Нуклеиновая кислота может быть клонирована в целый ряд типов векторов. Например, нуклеиновая кислота может быть клонирована в вектор, включая, помимо прочего, плазмиду, фагмид, производное фага, вирус животного и космиду. Векторы, представляющие особый интерес, включают в себя векторы экспрессии, векторы репликации, векторы генерации зондов и векторы секвенирования.

[0278] Более того, вектор экспрессии можно доставлять в клетку в форме вирусного вектора. Технологии вирусных векторов хорошо известны в данной области техники и описаны, например, у Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY), и в других справочниках по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые можно использовать в качестве векторов, включают в себя, помимо прочего, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы

герпеса и лентивирусы. В основном, подходящий вектор содержит сайт начала репликации, функциональный по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, подходящие участки узнавания рестрикционных эндонуклеаз и один или более селективируемых маркеров (*например*, WO 01/96584; WO 01/29058 и патент США № 6,326,193).

[0279] Для переноса генов в клетки млекопитающих был разработан ряд вирусных систем. Например, ретровирусы обеспечивают удобную платформу для систем доставки генов. Выбранный ген может быть встроен в вектор и упакован в ретровирусные частицы, используя методики, известные в данной области техники. Рекомбинантный вирус затем может быть выделен и доставлен в клетки субъекта *in vivo* или *ex vivo*. Ряд ретровирусных систем известен в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления используются аденовирусные векторы. Ряд аденовирусных векторов известен в данной области техники. В одном варианте осуществления используются лентивирусные векторы.

[0280] Дополнительные элементы промотора, *например*, энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Обычно они расположены в области 30-110 п.о. выше стартового сайта, хотя было показано, что ряд промоторов также содержат функциональные элементы ниже стартового сайта. Интервал между элементами промотора часто бывает гибким, так что функция промотора сохраняется, когда элементы инвертируются или перемещаются относительно друг друга. В промоторе тимидинкиназы (ТК) интервал между элементами промотора можно увеличить до 50 п. о., прежде чем активность начнет снижаться. В зависимости от промотора оказывается, что отдельные элементы могут функционировать либо совместно, либо независимо для активации транскрипции.

[0281] Примером промотора, способного к экспрессии трансгена TFP в Т-клетке млекопитающего, является промотор EF1a. Нативный промотор EF1a управляет экспрессией альфа-субъединицы комплекса фактора элонгации-1, который отвечает за ферментативную доставку аминокислот тРНК к рибосоме. Промотор EF1a широко используется в экспрессионных плазмидах млекопитающих и продемонстрировал эффективность при стимуляции экспрессии TFP из трансгенов, клонированных в лентивирусный вектор (см., *например*, Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)). Другой пример промотора представляет собой промоторную последовательность гена немедленного раннего ответа цитомегаловируса (CMV). Эта промоторная последовательность представляет собой сильную конститутивную промоторную последовательность, способную управлять высокими уровнями экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с ней. Однако могут также использоваться и другие последовательности конститутивного промотора, включая,

помимо прочего, ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор длинных концевых повторов (ДКП) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, немедленно ранний промотор вируса Эпштейна-Барр, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы человеческого гена, такие как, помимо прочего, промотор актина, промотор миозина, промотор фактора элонгации-1, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Более того, настоящее изобретение не должно ограничиваться применением конститутивных промоторов. Индуцибельные промоторы также рассматриваются как часть настоящего изобретения. Применение индуцируемого промотора обеспечивает молекулярный переключатель, способный включать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, когда такая экспрессия желательна, или выключать экспрессию, когда экспрессия нежелательна. Примеры индуцируемых промоторов включают в себя, помимо прочего, промотор металлотинина, промотор глюкокортикоида, промотор прогестерона и промотор, регулируемый тетрациклином.

[0282] Чтобы оценить экспрессию полипептида TFP или его частей, вектор экспрессии, вводимый в клетку, может также содержать выбираемый маркерный ген, репортерный ген или и тот, и другой, чтобы способствовать идентификации и выбору экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые необходимо подвергнуть трансфекции или инфицировать вирусными векторами. В других аспектах селективный маркер может переноситься отдельным участком ДНК и использоваться в процедуре совместной трансфекции. Как селективные маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями, чтобы обеспечить экспрессию в клетке-хозяине. Подходящие селективируемые маркеры включают в себя, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как нео и т.п.

[0283] Репортерные гены используются для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. В целом, репортерный ген представляет собой ген, который не присутствует или не экспрессируется в реципиентном организме или ткани и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется каким-либо легко определяемым свойством, *например*, ферментной активностью. Экспрессию репортерного гена анализируют в подходящее время после введения ДНК в реципиентные клетки. Подходящие репортерные гены могут включать в себя гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфеникол-ацетилтрансферазу, секретлируемую щелочную фосфатазу или ген зеленого флуоресцентного белка (*например*, Ui-Tei et al., 2000 FEBS

Letters 479: 79-82). Подходящие системы экспрессии хорошо известны и могут быть получены, используя известные методики, или приобретены на коммерческой основе. В целом, конструкция с минимальным 5' фланкирующим участком, демонстрирующая самый высокий уровень экспрессии репортерного гена, идентифицируется как промотор. Такие промоторные участки могут быть связаны с репортерным геном и использоваться для оценки способности веществ модулировать активированную промотором транскрипцию.

[0284] Способы введения и экспрессии генов в клетке известны в данной области техники. В контексте вектора экспрессии, вектор может быть легко введен в клетку-хозяина, *например*, клетку млекопитающего, клетку бактерии, дрожжевую клетку или клетку насекомого с помощью любого способа в данной области техники. Например, вектор экспрессии может быть перенесен в клетку-хозяина физическим, химическим или биологическим путем.

[0285] К физическим способам введения полинуклеотида в клетку-хозяина относятся осаждение фосфатом кальция, липофекция, бомбардировка частицами, микроинъекция, электропорация и т. п. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области техники (*см., например*, Sambrook et al., 2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY). Одним способом введения полинуклеотида в клетку-хозяина является трансфекция фосфатом кальция.

[0286] К биологическим способам введения представляющего интерес полинуклеотида в клетку-хозяина относится применение векторов ДНК и РНК. Вирусные векторы и особенно ретровирусные векторы стали наиболее широко используемым способом внедрения генов в клетки млекопитающих, *например*, клетки человека. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивируса, поксвирусов, вируса простого герпеса I типа, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т. п. (*см., например*, патенты США №№ 5,350,674 и 5,585,362).

[0287] К химическим способам введения полинуклеотида в клетку-хозяина относятся системы коллоидной дисперсии, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, гранулы, и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Примером коллоидной системы, используемой в качестве средства доставки *in vitro* и *in vivo*, является липосома (*например*, искусственная мембранная везикула). Доступны и другие современные способы направленной доставки нуклеиновых кислот, такие как доставка полинуклеотидов с целевыми наночастицами или другая подходящая система доставки субмикронного размера.

[0288] В случае, когда используется невирусная система доставки, типичное средство

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

[0289] Подходящие для применения липиды можно получить из коммерческих источников. Например, димиристилфосфатидилхолин («DMPC») можно получить от компании Sigma, Сент-Луис, штат Миссури; дицетилфосфат («DCP») можно получить от компании K & K Laboratories (Плейнвью, штат Нью-Йорк); холестерин («Choi») можно получить от компании Calbiochem-Behring; димиристилфосфатидилглицерин («DMPG») и другие липиды можно получить от компании Avanti Polar Lipids, Inc. (Бирмингем, штат Алабама). Исходные растворы липидов в хлороформе или хлороформе/метаноле можно хранить приблизительно при температуре -20°C . Хлороформ используют в качестве единственного растворителя, поскольку он легче испаряется, чем метанол. Термин «липосома» в контексте настоящего описания представляет собой общий термин, охватывающий множество одно- и многослойных липидных носителей, образованных путем образования замкнутых липидных бислоев или агрегатов. Липосомы можно охарактеризовать, как содержащие везикулярные структуры с фосфолипидной бислоевой мембраной и внутренней водной средой. Многослойные липосомы содержат несколько липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются спонтанно, когда фосфолипиды суспендируют в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются самоперестройке до образования

замкнутых структур и захватывают воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh et al., 1991, *Glycobiology* 5: 505-10). Однако также охватываются композиции, которые имеют структуру в растворе, отличную от нормальной везикулярной структуры. Например, липиды могут принимать мицеллярную структуру или существовать только в виде неоднородных агрегатов липидных молекул. Также рассматриваются комплексы липофетамин-нуклеиновая кислота.

[0290] Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина или иным образом подвергания клетки воздействию ингибитора по настоящему изобретению, с целью подтверждения наличия последовательности рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине можно проводить ряд анализов. Такие анализы включают в себя, например, «молекулярно-биологические» анализы, хорошо известные специалистам в данной области техники, такие как саузерн- и нозерн-блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; «биохимические» анализы, такие как выявление наличия или отсутствия конкретного пептида, *например*, иммунологическими способами (ИФА и вестерн-блоттинги) или путем анализов, описываемых в настоящем документе, для идентификации веществ, входящих в объем настоящего изобретения.

[0291] В настоящем изобретении дополнительно предложен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP. В одном аспекте вектор TFP может быть непосредственно трансдуцирован в клетку, *например*, T-клетку. В одном аспекте вектор представляет собой вектор клонирования или экспрессии, *например*, вектор, включающий в себя, помимо прочего, одну или более плазмид (например, плазмиды экспрессии, векторы клонирования, мини-кольца, минивекторы, двойные микрохромосомы), ретровирусную и лентивирусную векторную конструкцию. В одном аспекте вектор способен экспрессировать конструкцию TFP в T-клетках млекопитающих. В одном аспекте T-клетка млекопитающего является T-клеткой человека.

9. Источники T-клеток

[0292] Перед размножением и генетической модификацией у субъекта получают источник T-клеток. Термин «субъект» предназначен для включения в себя живых организмов, у которых может быть вызван иммунный ответ (*например*, млекопитающие). К примерам субъектов относятся люди, собаки, кошки, мыши, крысы и их трансгенные виды. T-клетки могут быть получены из ряда источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань вилочковой железы, ткань области инфекции, асциты, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В определенных аспектах настоящего изобретения можно использовать любое количество линий T-клеток, доступных в данной области техники. В

некоторых аспектах настоящего изобретения Т-клетки могут быть получены из единицы крови, собранной у субъекта с применением ряда методик, известных специалисту в данной области техники, таких как отделение Ficoll™. В одном предпочтительном аспекте клетки из циркулирующей крови индивидуума получают посредством афереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, в том числе Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие образованные ядром белые клетки крови, эритроциты и тромбоциты. В одном аспекте клетки, собранные посредством афереза, могут быть промыты для удаления фракции плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для дальнейших этапов обработки. В одном аспекте настоящего изобретения клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В альтернативном аспекте раствор для промывания не содержит кальций и может не содержать магний или может не содержать многие, если не все, двухвалентные катионы. Начальные этапы активации при отсутствии кальция могут привести к усиленной активации. Как будет понятно специалистам в данной области техники, этап промывания можно осуществить способами, известными специалистам в данной области техники, такими как с применением полуавтоматической «проточной» центрифуги (например, клеточного процессора COBE® 2991, Baxter CytoMate® или Haemonetics® Cell Saver® 5) в соответствии с инструкциями производителя. После промывания клетки могут быть повторно суспендированы в различных биосовместимых буферах, таких как, например, не содержащий Ca, не содержащий Mg PBS, PlasmaLyte® A, или другом солевом растворе с буфером или без него. Альтернативно, можно удалять нежелательные компоненты образца для афереза и непосредственно ресуспендировать клетки в культуральной среде.

[0293] В одном аспекте Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови посредством лизиса эритроцитов и деплеции моноцитов, например, посредством центрифугирования в градиенте PERCOLL™ или противоточной центрифужной элютиации. Конкретная субпопуляция Т-клеток, таких как CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и CD45RO+ Т-клетки, может быть дополнительно выделена посредством методик положительной или отрицательной селекции. Например, в одном аспекте Т-клетки выделяют посредством инкубации с гранулами, конъюгированными с антителами к CD3/CD28 (например, 3x28), такими как DYNABEADS™ M-450 CD3/CD28 Т, в течение периода времени, достаточного для позитивной селекции желаемых Т-клеток. В одном аспекте период времени составляет около 30 минут. В дополнительном аспекте период времени находится в диапазоне от 30 минут до 36 часов или более для всех целых значений в этом диапазоне. В дополнительном аспекте период времени составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 часов. В еще одном предпочтительном аспекте период времени составляет

от 10 до 24 часов. В одном аспекте время инкубации составляет 24 часа. Большее время инкубации можно использовать для выделения Т-клеток в любой ситуации, когда Т-клеток меньше по сравнению с другими типами клеток, как при выделении проникающих в опухоль лимфоцитов (TIL) из опухолевой ткани или у иммунокомпрометированных индивидов. Более того, применение большего времени инкубации может повышать эффективность захвата CD8⁺ Т-клеток. Таким образом, простым уменьшением или увеличением времени связывания Т-клеток с гранулами CD3/CD28 и/или увеличением или уменьшением соотношения гранул к Т-клеткам (как описано ниже в настоящем документе) можно предпочтительно проводить положительный или отрицательный отбор субпопуляций Т-клеток в начале культивирования или в другие моменты времени в течение процесса.

Кроме того, повышая или понижая соотношение антител к CD3 и/или к CD28 на гранулах или другой поверхности, можно предпочтительно проводить положительный или отрицательный отбор субпопуляций Т-клеток в начале культивирования или в другие желаемые моменты времени. Специалисту в данной области техники будет понятно, что в контексте настоящего изобретения также можно использовать многочисленные этапы селекции. В определенных аспектах может быть желательным проведение процедуры селекции и применение «неотобранных» клеток в процессе активации и экспансии. «Неотобранные» клетки также можно подвергать дополнительным этапам селекции.

[0294] Обогащение популяции Т-клеток посредством отрицательной селекции может быть достигнуто с комбинацией антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для отрицательно отобранных клеток. Один способ представляет собой сортировку и/или селекцию клеток посредством отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, в которых применяют смесь моноклональных антител, направленных на маркеры поверхности клетки, присутствующие на отрицательно отобранных клетках. Например, для обогащения CD4⁺ клеток посредством отрицательной селекции смесь моноклональных антител обычно включает в себя антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В определенных аспектах может быть желательным обогащение или положительная селекция регуляторных Т-клеток, которые обычно экспрессируют CD4⁺, CD25⁺, CD62Lhi, GITR⁺ и FoxP3⁺. Альтернативно, в определенных аспектах регуляторные Т-клетки деплецируют посредством гранул, конъюгированных с антителом к CD25, или другим аналогичным способом селекции.

[0295] В одном варианте осуществления можно выбрать такую популяцию Т-клеток, которая экспрессирует один или более из ИНФ- γ , ФНО-альфа, IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, ГМ-КСФ, IL-10, IL-13, гранзима В и перфорины, или другие соответствующие молекулы,

например, другие цитокины. Способы скрининга на экспрессию клеток можно определить, *например*, с помощью способов, описанных в публикации согласно РСТ №: WO2013/126712.

[0296] Для выделения желаемой популяции клеток посредством положительной или отрицательной селекции можно изменять концентрацию клеток и поверхность (*например*, частиц, таких как гранулы). В определенных аспектах может быть желательным существенное уменьшение объема, в котором гранулы и клетки смешивают друг с другом (например, увеличение концентрации клеток), для обеспечения максимального контактирования клеток и гранул. Например, в одном аспекте используют концентрацию 2 миллиарда клеток/мл. В другом аспекте используют концентрацию 1 миллиард клеток/мл. В дополнительном аспекте используют концентрацию более чем 100 миллионов клеток/мл. В дополнительном аспекте используют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В еще одном аспекте используют концентрацию клеток от 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В дополнительных аспектах могут использовать концентрацию 125 или 150 миллионов клеток/мл. Применение высоких концентраций может приводить к увеличенному выходу клеток, активации клеток и экспансии клеток. Более того, применение высоких концентраций клеток обеспечивает более эффективный захват клеток, которые могут слабо экспрессировать представляющие интерес антигены-мишени, такие как CD28-отрицательные Т-клетки, или из образцов, где содержится много опухолевых клеток (*например*, кровь больного лейкозом, опухолевая ткань и т. д.). Такие популяции клеток могут иметь терапевтическое значение, и их получение является желательным. Например, применение высокой концентрации клеток обеспечивает более эффективную селекцию CD8⁺ Т-клеток, которые обычно слабо экспрессируют CD28.

[0297] В родственном аспекте может быть желательным применение более низких концентраций клеток. Значительным разведением смеси Т-клеток и поверхности (*например*, частиц, таких как гранулы) сводят к минимуму взаимодействия между частицами и клетками. Это позволяет отбирать клетки, которые экспрессируют высокие количества желаемых антигенов, которые должны связываться с частицами. Например, CD4⁺ Т-клетки экспрессируют высокие уровни CD28, и их можно более эффективно захватывать по сравнению с CD8⁺ Т-клетками в разведенных концентрациях. В одном аспекте используемая концентрация клеток составляет 5×10^6 /мл. В других аспектах используемая концентрация может составлять от около 1×10^5 /мл до 1×10^6 /мл и любое целое значение в этом диапазоне. В других аспектах клетки можно инкубировать на ротационном шейкере в течение периодов времени различной продолжительности при различных

скоростях при температуре 2–10°C или при комнатной температуре.

[0298] Т-клетки для стимуляции также можно замораживать после этапа промывания. Не желая быть связанными теорией, этап замораживания и последующего размораживания обеспечивает более однородный продукт в результате удаления гранулоцитов и до некоторой степени моноцитов в популяции клеток. После этапа промывания, на котором удаляют плазму и тромбоциты, клетки можно суспендировать в замораживающем растворе. Несмотря на то, что многие замораживающие растворы и параметры известны в данной области техники и будут являться пригодными в этом контексте, один из способов включает в себя применение PBS, содержащего 20% DMSO и 8% сывороточного альбумина человека, или культуральной среды, содержащей 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% сывороточного альбумина человека и 7,5% DMSO, или 31,25% Plasmalyte-A, 31,25% декстрозы 5%, 0,45% NaCl, 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% сывороточного альбумина человека и 7,5% DMSO, или других подходящих для замораживания клеток сред, содержащих, например, Hespán® и PlasmaLyte® A, затем клетки замораживают до –80°C при скорости 1 в минуту и хранят в газовой фазе в резервуаре для хранения жидкого азота. Можно использовать другие способы контролируемого замораживания, а также неконтролируемого замораживания непосредственно при температуре –20°C или в жидком азоте. В определенных аспектах криоконсервированные клетки размораживают и промывают, как описано в настоящем документе, и оставляют отстаиваться в течение одного часа при комнатной температуре перед активацией способами по настоящему изобретению.

[0299] В контексте настоящего изобретения также предусмотрен сбор образцов крови или продукта афереза у субъекта в течение периода времени перед тем, когда могут потребоваться размноженные клетки, как описано в настоящем документе. В связи с этим источник клеток, подлежащих размножению, можно собирать в любой необходимый момент времени, и желаемые клетки, такие как Т-клетки, можно выделять и замораживать для дальнейшего применения в Т-клеточной терапии для любого количества заболеваний или состояний, для которых Т-клеточная терапия будет эффективной, таких как заболевания, описанные в настоящем документе. В одном аспекте образец крови или продукт афереза получают, как правило, у здорового субъекта. В определенных аспектах образец крови или продукт афереза получают, как правило, у здорового субъекта, который подвержен риску развития заболевания, но у которого еще не развилось заболевание, и представляющие интерес клетки выделяют и замораживают для дальнейшего применения. В определенных аспектах Т-клетки можно подвергать размножению, замораживать и использовать позже. В определенных аспектах образцы собирают у пациента сразу же

после диагностики конкретного заболевания, как описано в настоящем документе, но до начала какого-либо лечения. В дополнительном аспекте клетки выделяют из образца крови или продукта афереза у субъекта до начала проведения любого количества подходящих способов лечения, включая, помимо прочего, лечение средствами, такими как натализумаб, эфализумаб, противовирусные средства, химиотерапию, облучение, иммунодепрессивные средства, такие как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и такролимус (FK506), антитела или другие иммунодеструктивные средства, такие как САМРАТН, антитела к CD3, циклофосфамид, флударабин, циклоспорин, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, ромидепсин (ранее FR901228) и облучение.

[0300] В дополнительном аспекте настоящего изобретения Т-клетки получают у пациента непосредственно после лечения, в результате которого у субъекта остаются функциональные Т-клетки. В связи с этим наблюдали, что после определенных видов лечения раковых заболеваний, в частности, видов лечения с применением лекарственных средств, которые повреждают иммунную систему, вскоре после лечения в течение периода, когда пациенты обычно восстанавливаются после лечения, качество получаемых Т-клеток может являться оптимальным или улучшенным в отношении их способности к размножению *ex vivo*. Аналогичным образом, после манипуляций *ex vivo* с применением способов, описываемых в настоящем документе, эти клетки могут находиться в предпочтительном состоянии для повышенного прививания и размножения *in vivo*. Таким образом, в контексте настоящего изобретения предусмотрен сбор клеток крови, включая Т-клетки, дендритные клетки или другие клетки гемопоэтической линии, во время этой фазы восстановления. Более того, в определенных аспектах можно использовать мобилизацию (например, мобилизацию с ГМ-КСФ) и схемы симптоматического лечения для создания состояния у субъекта, при котором благоприятной является репопуляция, рециркуляция, регенерация и/или размножение конкретных типов клеток, особенно в течение определенного временного окна после терапии. Иллюстративные типы клеток включают в себя Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки и другие клетки иммунной системы.

10. Активация и размножение Т-клеток

[0301] Т-клетки можно активировать и подвергать размножению, как правило, используя способы, как описано, например, в патентах США №№ 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; и публикации заявки на патент США № 20060121005.

[0302] Как правило, Т-клетки по настоящему изобретению можно подвергать размножению путем приведения в контакт с поверхностью, содержащей прикрепленное к ней вещество,

которое стимулирует ассоциированный с комплексом CD3/TCR сигнал, и лиганд, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В частности, популяции Т-клеток могут стимулироваться, как описано в настоящем документе, например, приведением в контакт с антителом к CD3, или его антигенсвязывающим фрагментом, или антителом к CD2, иммобилизованным на поверхности, или приведением в контакт с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в сочетании с кальциевым ионофором. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток используют лиганд, который связывается со вспомогательной молекулой. Например, популяцию Т-клеток можно приводить в контакт с антителом к CD3 и антителом к CD28 в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации Т-клеток. Для стимуляции пролиферации CD4⁺ Т-клеток или CD8⁺ Т-клеток можно использовать антитело к CD3 и антитело к CD28. Можно использовать примеры антитела к CD28, включающие в себя 9.3, В-Т3, XR-CD28 (Diaclone, Besangon, Франция), как и другие способы, общеизвестные в данной области техники (Berg et al., *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, 1998; Naanen et al., *J. Exp. Med.* 190(9): 1319-1328, 1999; Garland et al., *J. Immunol. Meth.* 227(1-2):53-63, 1999).

[0303] Т-клетки, которые подвергали стимуляции в течение различных периодов времени, могут обладать различными характеристиками. Например, типичные продукты моноклеарных клеток крови или продукты моноклеарных клеток периферической крови после афереза содержат популяцию хелперных Т-клеток (ТН, CD4⁺), которая больше, чем популяция цитотоксических или супрессорных Т-клеток (ТС, CD8⁺). Размножение Т-клеток *ex vivo* посредством стимуляции рецепторов CD3 и CD28 приводит к получению популяции Т-клеток, которая до приблизительно 8–9 суток состоит преимущественно из ТН-клеток, тогда как приблизительно через 8–9 суток популяция Т-клеток содержит возрастающую популяцию ТС-клеток. Соответствующим образом, в зависимости от цели лечения предпочтительной может являться инфузия субъекту популяции Т-клеток, содержащей преимущественно ТН-клетки. Аналогично, если была выделена антиген-специфическая субпопуляция ТС-клеток, может быть полезно размножение этой субпопуляции до большего количества.

[0304] Более того, в дополнение к маркерам CD4 и CD8 во время процесса размножения клеток значительно изменяются другие фенотипические маркеры, но в значительной степени воспроизводимо. Таким образом, такая воспроизводимость обеспечивает возможность адаптации продукта активированных Т-клеток к конкретным целям.

[0305] После создания TFP против ассоциированного с опухолью антигена можно использовать различные анализы для оценки активности молекулы, такой как, помимо прочего, способность к размножению Т-клеток после стимуляции антигеном, сохранению

размножения Т-клеток в отсутствие рестимуляции, а также противораковой активности в соответствующих моделях *in vitro* и животных моделях. Анализы для оценки эффектов TFP против ассоциированного с опухолью антигена описаны более подробно далее.

[0306] Анализ вестерн-блоттинга экспрессии TFP в первичных Т-клетках может быть применен для выявления присутствия мономеров и димеров (см., *например*, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). Если описывать очень кратко, Т-клетки (смесь 1:1 CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток), экспрессирующие TFP, размножаются *in vitro* в течение более чем 10 дней с последующим лизисом и ДСН-ПААГ-электрофорезом в восстанавливающих условиях. TFP выявляют с помощью вестерн-блоттинга, используя антитело к цепи TCR. Аналогичные субпопуляции Т-клеток используют для анализа ДСН-ПААГ-электрофореза в невосстанавливающих условиях, чтобы обеспечить оценку формирования ковалентного димера.

[0307] Размножение TFP⁺ Т-клеток *in vitro* после стимуляции антигеном может быть измерено с помощью проточной цитометрии. Например, смесь CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток стимулируют с помощью альфаCD3/альфаCD28 и APC с последующей трансдукцией лентивирусными векторами, экспрессирующими ЗФБ, под контролем промоторов, подлежащих анализу. К примерам промоторов относятся промоторы гена CMV IE, EF-1 альфа, убиквитина С или фосфоглицерокиназы (ФГК). Флуоресценцию ЗФБ оценивают на 6 день культивирования в субпопуляциях CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток с помощью проточной цитометрии (см., *например*, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). Альтернативно, смесь CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток стимулируют с помощью магнитных гранул, покрытых альфаCD3/альфаCD28, на день 0 и трансдуцируют с помощью TFP на день 1, используя бицистронный лентивирусный вектор, экспрессирующий TFP, вместе с УЗФБ с помощью последовательности ухода с рибосомы 2А.

[0308] Устойчивое размножение TFP⁺ Т-клеток в отсутствие повторной стимуляции также может быть измерено (см., *например*, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). Вкратце, средний объем Т-клеток (fl) измеряют на день 8 культивирования, используя счетчик частиц Coulter Multisizer III, после стимуляции с помощью магнитных гранул, покрытых альфаCD3/альфаCD28, на день 0 и трансдукции с помощью указанного TFP на день 1.

[0309] Для измерения активности TFP-Т также можно использовать животные модели. Например, ксенотрансплантатная модель с применением человеческих TFP⁺ Т-клеток, специфических к ВСМА, для лечения рака у мышей с иммунодефицитом (см., *например*, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). Если описывать очень кратко, после установления рака мышей рандомизируют в группы лечения. Различное количество

сконструированных Т-клеток совместно инъецируют в соотношении 1:1 мышам NOD/SCZD/ $\gamma^-/-$ с раковым заболеванием. Количество копий каждого вектора в ДНК селезенки, полученное у мышей, оценивают в различные моменты времени после инъекции Т-клеток. Животных оценивают на предмет ракового заболевания с еженедельными интервалами. Значения числа раковых клеток периферической крови, положительных на ассоциированный с опухолью антиген, измеряют у мышей, которым инъецируют альфа ассоциированный с опухолью антиген-дзета TFP+ Т-клетки или ложнотрансдуцированные Т-клетки. Кривые выживаемости в группах сравнивают посредством логарифмического рангового теста. Кроме того, также можно проанализировать абсолютные значения CD4+ и CD8+ Т-клеток периферической крови через 4 недели после инъекции Т-клеток мышам NOD/SCID/ $\gamma^-/-$. Мышам инъецируют раковые клетки, а через 3 недели инъецируют Т-клетки, сконструированные с возможностью экспрессии TFP с помощью бицистронного линтивирального вектора, который кодирует TFP, связанный с УЗФБ. Т-клетки нормализуют к 45–50% введенных ЗФБ+ Т-клеток путем смешивания с ложнотрансдуцированными клетками перед инъекцией и подтверждают с помощью проточной цитометрии. Животных оценивают на предмет ракового заболевания с еженедельными интервалами. Кривые выживаемости в группах TFP+ Т-клеток сравнивают посредством логарифмического рангового теста.

[0310] Можно оценить дозозависимый ответ на лечение TFP (см., *например*, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). Например, периферическую кровь получают через 35–70 дней после установления рака у мышей, инъецированных на 21 день TFP-Т-клетками, эквивалентным количеством ложнотрансдуцированных Т-клеток или неинъецированных Т-клетками. У мышей из каждой группы случайным образом берут кровь для определения числа + раковых клеток периферической крови, а затем животных умерщвляют на 35 и 49 день. Оставшихся животных оценивают на 57 и 70 день.

[0311] Оценка пролиферации клеток и выработки цитокинов была описана ранее, *например*, у Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). Вкратце, оценка TFP-опосредованной пролиферации осуществляется на планшетах для микротитрования путем смешивания промытых Т-клеток с клетками, экспрессирующими ВСМА, или CD32 и CD137 (KT32-BBL) для получения конечного соотношения Т-клеток с клетками, экспрессирующими ВСМА, равного 2:1. Клетки, экспрессирующие ВСМА, перед применением облучают гамма-излучением. Моноклональные антитела к CD3 (клон ОКТ3) и CD28 (клон 9.3) добавляют к культурам с клетками KT32-BBL в качестве положительного контроля для стимуляции пролиферации Т-клеток, поскольку эти сигналы поддерживают длительное размножение CD8+ Т-клеток *ex vivo*. Т-клетки в культурах подсчитывают с

помощью флуоресцирующих гранул CountBright™ (Invitrogen) и проточной цитометрии, как описано у производителя. TFP+ Т-клетки идентифицируют путем экспрессии ЗФБ, используя Т-клетки, которые были сконструированы с помощью экспрессирующих TFP лентивирусных векторов, связанных с УЗФБ-2А. В случае TFP+ Т-клеток, которые не экспрессируют ЗФБ, TFP+ Т-клетки определяют с помощью биотинилированного рекомбинантного белка ВСМА и вторичного конъюгата авидин-PE. Экспрессию CD4+ и CD8+ на Т-клетках также одновременно определяют с помощью специфических моноклональных антител (BD Biosciences). Измерения цитокинов выполняют на надосадочных жидкостях, собранных через 24 часа после повторной стимуляции, используя набор для количественного определения растворимых форм цитокинов human TH1/TH2 cytokine cytometric bead array kit (BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя. Флуоресценцию оценивают с помощью проточного цитометра FACScalibur™, а данные анализируют в соответствии с инструкциями производителя.

[0312] Цитотоксичность могут оценивать с помощью стандартного анализа высвобождения ⁵¹Cr (см., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). Вкратце, клетки-мишени загружают ⁵¹Cr (в качестве NaCrO₄, New England Nuclear) при температуре 37°C в течение 2 часов с частым перемешиванием, дважды промывают в полной RPMI и высевают на планшеты для микротитрования. Эффекторныe Т-клетки смешивают с клетками-мишенями в лунках в полной среде RPMI в различных соотношениях эффекторных клеток с клетками-мишенями (Е:Т). Готовят также дополнительные лунки, содержащие только среду (спонтанное высвобождение, СВ) или 1% раствор детергента тритон-Х 100 (полное высвобождение, ПВ). Через 4 часа инкубации при 37°C из каждой лунки собирают надосадочную жидкость. Затем измеряют высвобожденный ⁵¹Cr с помощью счетчика гамма-частиц (Packard Instrument Co., Уолтем, штат Массачусетс). Каждое условие выполняют по меньшей мере в трех повторностях, а процентное содержание лизиса подсчитывают, используя следующую формулу: % лизиса = (ЭВ-СВ)/(ПВ-СВ), где ЭВ представляет среднее значение высвобожденного ⁵¹Cr для каждого экспериментального условия.

[0313] Технологии визуализации могут использоваться для оценки специфической миграции и пролиферации TFP в животных моделях опухоленосителей. Такие анализы были описаны, например, у Barrett et al., *Human Gene Therapy* 22:1575-1586 (2011). Вкратце, мышам NOD/SCID/γс-/- (NSG) в/в инъецируют раковые клетки, затем через 7 дней — Т-клетки через 4 часа после электропорации конструкциями TFP. Т-клетки стабильно трансфицируют лентивирусной конструкцией, чтобы экспрессировать люциферазу светлячка, и мышей визуализируют на предмет биолуминесценции. Альтернативно,

терапевтическую эффективность и специфичность одной инъекции TFP+ Т-клеток в раковой ксенотрансплантатной модели можно измерить следующим образом: мышам NSG инъецируют раковые клетки, трансдуцированные с возможностью стабильно экспрессировать люциферазу светлячка, с последующей одной инъекцией в хвостовую вену Т-клеток, электропорлируемых TFP ВСМА через 7 дней. Животных визуализируют в различные моменты времени после инъекции. Например, можно получить тепловые карты плотности фотонов ракового заболевания, положительного на люциферазу светлячка, у репрезентативных мышей на 5 день (за 2 дня до лечения) и на 8 день (через 24 часа после TFP+ лейкоцитов периферической крови).

[0314] Для оценки конструкций TFP против ВСМА по настоящему изобретению также могут применяться другие анализы, включая анализы, описанные в разделе «Примеры» настоящего документа, а также анализы, известные в данной области техники.

11. Терапевтическое применение

Заболевания или состояния, связанные с опухолевым антигеном

[0315] У многих пациентов, получавших лечение противораковыми средствами, нацеленными на одну мишень на опухолевой клетке, например, ВСМА, CD19, CD20, CD22, CD123, MUC16, MSLN и т. д., со временем развивается устойчивость, так как активируются механизмы уклонения от ответа, такие как альтернативные сигнальные пути и циклы обратной связи. Терапевтические средства с двойной специфичностью пытаются решить данную проблему, объединив мишени, которые часто замещают друг друга в качестве путей отступления. Терапевтические популяции Т-клеток, имеющие TCR, специфичные к более чем одному ассоциированному с опухолью антигену, являются многообещающими комбинированными терапевтическими средствами. В некоторых вариантах осуществления TFP-Т-клетки с двойной специфичностью вводятся с дополнительным противораковым средством; в некоторых вариантах осуществления противораковое средство представляет собой антитело или его фрагмент, другую TFP-Т-клетку, CAR-Т-клетку или малую молекулу. Примеры ассоциированных с опухолью антигенов включают в себя, помимо прочего, онкофетальные антигены (*например*, антигены, которые экспрессируются в тканях плода и злокачественных соматических клетках), онковирусные антигены (*например*, антигены, которые кодируются онкогенными трансформирующими вирусами), сверхэкспрессированные/накопленные антигены (*например*, антигены, которые экспрессируются как нормальными, так и опухолевыми тканями, причем уровень экспрессии значительно выше для опухоли), раково-тестикулярные антигены (*например*, антигены, которые экспрессируются только раковыми клетками и тканями органов размножения у взрослых, такими как яички и плацента), линиеспецифические антигены

(*например*, антигены, которые в основном экспрессируются одним гистотипом ракового заболевания), мутировавшие антигены (*например*, антигены, которые экспрессируются раковым заболеванием в результате генетической мутации или изменения транскрипции), посттрансляционно измененные антигены (*например*, ассоциированные с опухолью изменения гликозилирования и т. д.) и идиотипические антигены (*например*, антигены из высокополиморфных генов, где опухолевая клетка экспрессирует специфический клонотип, *например*, как в В-клеточной, Т-клеточной лимфоме/лейкозе вследствие клональных aberrаций). Примеры ассоциированных с опухолью антигенов включают в себя, помимо прочего, антигены альфа-актина-4, ARTC1, альфафетопротейна (AFP), слитого белка BCR-ABL (b3a2), B-RAF, CASP-5, CASP-8, бета-катенина, Cdc27, CDK4, CDK12, CDKN2A, CLPP, COA-1, CSNK1A1, CD79, CD79B, слитого белка deк-can, EFTUD2, фактора элонгации-2, слитого белка ETV6-AML1, FLT3-ITD, FNDC3B, FN1, GAS7, GPNMB, HAUS3, HSDL1, слитого белка LDLR-фукозилтрансферазы AS, HLA-A2d, HLA-A11d, hsp70-2, MART2, MATN, ME1, MUM-1f, MUM-2, MUM-3, neo-PAP, миозин класса I, NFYC, OGT, OS-9, p53, слитого белка pml-RARальфа, PPP1R3B, PRDX5, PTPRK, K-ras, N-ras, RBAF600, SIRT2, SNRPD1, SYT-SSX1 или слитого белка -SSX2, TGF-бетаRII, тризофосфатизомеразы, BAGE-1, D393-CD20n, циклина-A1, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-8, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GnTVf, HERV-K-MEL, KK-LC-1, KM-HN-1, LAGE-1, LY6K, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A12 m, MAGE-C1, MAGE-C2, mucink, NA88-A, NY-ESO-1 / LAGE-2, SAGE, Sp17, SSX-2, SSX-4, TAG-1, TAG-2, TRAG-3, TRP2-INT2g, XAGE-1b/GAGED2a, гена / белка, CEA, gp100 / Pmel17, маммаглобина-A, мелан-A / MART-1, NY-BR-1, OA1, PAP, PSA, RAB38 / NY-MEL-1, TRP-1 / gp75, TRP-2, тирозиназы, адипофилина, AIM-2, ALDH1A1, BCLX (L), BING-4, CALCA, CD45, CD274, CPSF, циклина DI, DKK1, ENAH (hMena), EphCAM, EphA3, EZH2, FGF5, глипикана-3, G250 / MN / CAIX, HER-2 / neu, HLA-DOB, гепсина, IDO1, IGF2B3, IL13Ральфа2, желудочно-кишечной карбоксилэстеразы, альфа-фетопротейна, калликреина 4, KIF20A, Lengsin, M-CSF, MCSP, mdm-2, Meloe, мидкина, MMP-2, MMP-7, MUC1, MUC5AC, p53, PAX5, PBF, PRAME, PSMA, RAGE-1, RGS5, RhoC, RNF43, RU2AS, сецернина 1, SOX10, STEAP1, сурвивина, теломеразы, TPBG, VEGF и WT1.

[0316] В одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы лечения заболевания, связанного с экспрессией по меньшей мере одного ассоциированного с опухолью антигена. В одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы лечения заболевания, причем часть опухоли является отрицательной на ассоциированный с опухолью антиген, а часть опухоли — положительной на ассоциированный с опухолью

антиген. Например, антитело или TFR по настоящему изобретению пригодны для лечения субъектов, которые получили лечение заболевания, связанного с повышенной экспрессией указанного опухолевого антигена, причем субъект, который получил лечение повышенных уровней ассоциированного с опухолью антигена, демонстрирует заболевание, связанное с повышенными уровнями ассоциированного с опухолью антигена.

[0317] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий антитело или TFR против ассоциированного с опухолью антигена, функционально связанные с промотором для экспрессии в Т-клетках млекопитающего. В одном аспекте в настоящем изобретении предложена рекомбинантная Т-клетка, экспрессирующая TFR ассоциированного с опухолью антигена для применения при лечении опухолей, экспрессирующих ассоциированный с опухолью антиген, причем рекомбинантная Т-клетка, экспрессирующая TFR ассоциированного с опухолью антигена, называется TFR-Т ассоциированного с опухолью антигена. В одном аспекте TFR-Т ассоциированного с опухолью антигена по настоящему изобретению способна вступать в контакт с опухолевой клеткой с по меньшей мере одним TFR ассоциированного с опухолью антигена по настоящему изобретению, экспрессирующимся на ее поверхности, таким образом, что TFR-Т нацеливается на опухолевую клетку, и рост опухоли ингибируется.

[0318] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста опухолевой клетки, экспрессирующей ассоциированный с опухолью антиген, включающему в себя контактирование опухолевой клетки с Т-клеткой TFR или антитела к ассоциированному с опухолью антигену по настоящему изобретению таким образом, что TFR-Т активируется в ответ на антиген и нацеливается на раковую клетку, при этом рост опухоли ингибируется.

[0319] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения ракового заболевания у субъекта. Способ включает в себя введение субъекту Т-клетки антитела, биспецифического антитела или TFR к ассоциированному с опухолью антигену по настоящему изобретению таким образом, что раковое заболевание лечится у субъекта. Примером ракового заболевания, подлежащего лечению TFR-Т-клеткой ассоциированного с опухолью антигена по настоящему изобретению, является рак, связанный с экспрессией ассоциированного с опухолью антигена. В одном аспекте рак представляет собой миелому. В одном аспекте рак представляет собой лимфому. В одном аспекте рак представляет собой рак толстой кишки.

[0320] В некоторых вариантах осуществления лечение антителами или TFR к ассоциированному с опухолью антигену может применяться в комбинации с одним или более дополнительными видами лечения. В некоторых случаях такие дополнительные виды

лечения включают в себя химиотерапевтический агент, например, циклофосфамид. В некоторых случаях такие дополнительные виды лечения включают в себя хирургическую резекцию или лучевую терапию.

[0321] В одном аспекте в настоящем документе описан способ клеточной терапии, при которой Т-клетки генетически модифицируют для экспрессии TFP, и TFP-экспрессирующую Т-клетку вводят нуждающемуся в этом реципиенту. Вводимая клетка способна уничтожать опухолевые клетки у реципиента. В отличие от терапии антителами, TFP-экспрессирующие Т-клетки способны к репликации *in vivo*, что приводит к длительной стойкости, что может привести к устойчивому контролю над опухолью. В различных аспектах вводимые пациенту Т-клетки или их потомство сохраняются у пациента в течение по меньшей мере четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, одиннадцати месяцев, двенадцати месяцев, тринадцати месяцев, четырнадцати месяцев, пятнадцати месяцев, шестнадцати месяцев, семнадцати месяцев, восемнадцати месяцев, девятнадцати месяцев, двадцати месяцев, двадцати одного месяца, двадцати двух месяцев, двадцати трех месяцев, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет после введения Т-клетки пациенту.

[0322] В некоторых случаях в настоящем документе описан тип клеточной терапии, при которой Т-клетки модифицируют, *например*, с помощью транскрибированной *in vitro* РНК, для временной экспрессии TFP, и TFP-экспрессирующую Т-клетку вводят нуждающемуся в этом реципиенту. Вводимая клетка способна уничтожать опухолевые клетки у реципиента. Таким образом, в различных аспектах вводимые пациенту Т-клетки сохраняются в течение менее чем одного месяца, *например*, в течение трех недель, двух недель или одной недели, после введения Т-клетки пациенту.

[0323] Без привязки к какой-либо конкретной теории противоопухолевый иммунный ответ, вызываемый TFP-экспрессирующими Т-клетками, может представлять собой активный или пассивный иммунный ответ или, альтернативно, может быть обусловлен прямым или непрямым иммунным ответом. В одном аспекте TFP-трансдуцированные Т-клетки демонстрируют специфическую секрецию провоспалительных цитокинов и сильную цитолитическую активность в ответ на человеческие раковые клетки, экспрессирующие ассоциированный с опухолью антиген, противостоят ингибированию растворимым ассоциированным с опухолью антигеном, опосредуют неспецифический цитоллиз и/или опосредуют регрессию установленной опухоли человека. Например, не содержащие антиген опухолевые клетки в пределах неоднородного поля опухоли, экспрессирующей ассоциированный с опухолью антиген, могут быть подвержены непрямому разрушению Т-клетками, перенаправленными ассоциированным с опухолью антигеном, которые ранее

оказывали противодействие смежным антигенположительным раковым клеткам.

[0324] В одном аспекте человеческие TFP-модифицированные Т-клетки по настоящему изобретению могут представлять собой вид вакцины для иммунизации *ex vivo* и/или терапии *in vivo* у млекопитающего. В одном аспекте млекопитающее является человеком.

[0325] В отношении иммунизации *ex vivo* перед введением клетки млекопитающему происходит *in vitro* по меньшей мере одно из следующего: i) размножение клеток; ii) введение в клетки нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP, или iii) криоконсервация клеток.

[0326] Процедуры *ex vivo* хорошо известны в данной области техники и более подробно описываются ниже. Вкратце, клетки выделяют у млекопитающего (*например*, у человека) и генетически модифицируют (т. е. трансдуцируют или трансфицируют *in vitro*) с помощью вектора, экспрессирующего TFP, описанный в настоящем документе. TFP-модифицированную клетку могут вводить млекопитающему-реципиенту для обеспечения терапевтической пользы. Млекопитающее-реципиент может быть человеком, а TFP-модифицированная клетка может быть аутологической по отношению к реципиенту. Альтернативно, клетки могут быть аллогенными, сингенными или ксеногенными по отношению к реципиенту.

[0327] Процедура размножения *ex vivo* гемопоэтических стволовых клеток и прогениторных клеток описана, например, в патенте США № 5,199,942, включенном в настоящий документ посредством ссылки, и может применяться к клеткам по настоящему изобретению. Другие подходящие способы известны в данной области техники, таким образом, настоящее изобретение не ограничивается каким-либо конкретным способом размножения клеток *ex vivo*. Вкратце, культивирование и размножение Т-клеток *ex vivo* включает в себя: (1) выделение CD34+ гемопоэтических стволовых клеток и прогениторных клеток у млекопитающего из отбора периферической крови или эксплантатов костного мозга и (2) размножение таких клеток *ex vivo*. Помимо клеточных факторов роста, описанных в патенте США № 5,199,942, для культивирования и размножения клеток можно использовать другие факторы, такие как flt3-L, IL-1, IL-3 и лиганд c-kit.

[0328] Помимо применения вакцины на основе клеток с точки зрения иммунизации *ex vivo*, в настоящем изобретении также предложены композиции и способы иммунизации *in vivo* с целью вызвать иммунный ответ, направленный против антигена у пациента.

[0329] В целом, клетки, активированные и размноженные так, как описано в настоящем документе, могут использоваться для лечения и предотвращения заболеваний, которые возникают у иммунокомпрометированных индивидов. В частности, TFP-

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

[0330] В одном аспекте антитела или TFP-Т-клетки по настоящему изобретению могут использоваться для лечения пролиферативного заболевания, такого как рак, или злокачественная опухоль, или предраковое состояние. В одном аспекте рак представляет собой миелому. В одном аспекте рак представляет собой лимфому. В одном аспекте рак представляет собой рак толстой кишки. В дополнение к этому заболевание, связанное с экспрессией ассоциированного с опухолью антигена, включает в себя, помимо прочего, атипические и/или неклассические раковые заболевания, злокачественные новообразования, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, экспрессирующие ассоциированные с опухолью антигены. Нераковые смежные показания, связанные с экспрессией ассоциированного с опухолью антигена, варьируются в зависимости от антигена, но они не ограничиваются, например, инфекционным заболеванием, аутоиммунным заболеванием (например, волчанкой), воспалительными заболеваниями (аллергией и астмой) и трансплантацией.

[0331] Антитела или TFP-модифицированные Т-клетки по настоящему изобретению можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или другими компонентами, такими как IL-2 или IL-12, или другими цитокинами, или популяциями клеток.

[0332] В настоящем изобретении также предложены способы ингибирования пролиферации или сокращения популяции клеток, экспрессирующих ассоциированный с опухолью антиген, при этом способы включают в себя контактирование популяции клеток, содержащей клетки, экспрессирующие ассоциированный с опухолью антиген, с TFP-Т-клеткой против ассоциированного с опухолью антигена по настоящему изобретению, которая связывается с клеткой, экспрессирующей ассоциированный с опухолью антиген. В конкретном аспекте в настоящем изобретении предложены способы ингибирования пролиферации или сокращения популяции раковых клеток, экспрессирующих

ассоциированный с опухолью антиген, при этом способы включают в себя контактирование популяции клеток, экспрессирующих ассоциированный с опухолью антиген, с антителом или TFP-T-клеткой против ассоциированного с опухолью антигена по настоящему изобретению, которые связываются с клеткой, экспрессирующей ассоциированный с опухолью антиген. В одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы ингибирования пролиферации или сокращения популяции раковых клеток, экспрессирующих ассоциированный с опухолью антиген, при этом способы включают в себя контактирование популяции раковых клеток, экспрессирующих ассоциированный с опухолью антиген, с антителом или TFP-T-клеткой против ассоциированного с опухолью антигена по настоящему изобретению, которые связываются с клеткой, экспрессирующей ассоциированный с опухолью антиген. В некоторых аспектах антитело или TFP-T-клетка против ассоциированного с опухолью антигена по настоящему изобретению сокращает численность, число, количество или процентное содержание клеток и/или раковых клеток на по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% у субъекта или в животной модели с множественной миеломой или другим раковым заболеванием, связанным с клетками, экспрессирующими ассоциированный с опухолью антиген, по отношению к отрицательному контролю. В одном аспекте субъект является человеком.

[0333] В настоящем изобретении также предложены способы предотвращения, лечения и/или сдерживания заболевания, связанного с клетками, экспрессирующими ассоциированный с опухолью антигена (*например*, рака, экспрессирующего ассоциированный с опухолью антиген), при этом способы включают в себя введение нуждающемуся субъекту антитела или TFP-T-клетки против ассоциированного с опухолью антигена по настоящему изобретению, которая связывается с клеткой, экспрессирующей ассоциированный с опухолью антиген. В одном аспекте субъект является человеком. К неограничивающим примерам нарушений, связанных с клетками, экспрессирующими ассоциированный с опухолью антиген, относятся аутоиммунные заболевания (такие как волчанка), воспалительные заболевания (такие как аллергии и астма) и раковые заболевания (такие как рак крови или атипичные раковые заболевания, экспрессирующие ассоциированный с опухолью антиген).

[0334] В настоящем изобретении также предложены способы предотвращения, лечения и/или сдерживания заболевания, связанного с клетками, экспрессирующими ассоциированный с опухолью антиген, при этом способы включают в себя введение нуждающемуся субъекту антитела или TFP-T-клетки против ассоциированного с опухолью

антигена по настоящему изобретению, которые связываются с клеткой, экспрессирующей ассоциированный с опухолью антиген. В одном аспекте субъект является человеком.

[0335] В настоящем изобретении предложены способы предотвращения рецидива ракового заболевания, связанного с клетками, экспрессирующими ассоциированный с опухолью антиген, при этом способы включают в себя введение нуждающемуся в этом субъекту антитела или TFP-T-клетки против ассоциированного с опухолью антигена по настоящему изобретению, которые связываются с клеткой, экспрессирующей ассоциированный с опухолью антиген. В одном аспекте способы включают в себя введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества антитела или TFP-T-клетки против ассоциированного с опухолью антигена, описанных в настоящем документе, которые связываются с клеткой, экспрессирующей ассоциированный с опухолью антиген, в комбинации с эффективным количеством другого лечения.

12. Виды комбинированной терапии

[0336] Антитело или TFP-экспрессирующая клетка, описанные в настоящем документе, могут использоваться в комбинации с другими известными веществами и методами лечения. Введение «в комбинации», как используется в настоящем документе, означает, что два (или более) различных средства лечения доставляют субъекту в ходе заболевания, *например*, два или более средств лечения доставляют после того, как у субъекта диагностировали нарушение, и перед тем, как нарушение было вылечено, или устранено, или лечение было прекращено по другим причинам. В некоторых вариантах осуществления доставка одного средства лечения все еще происходит, когда начинается доставка второго средства лечения, таким образом, существует перекрытие с точки зрения введения. Иногда в настоящем документе это называется как «одновременная» или «сопутствующая доставка». В других вариантах осуществления доставка одного средства лечения заканчивается до начала доставки другого средства лечения. В некоторых вариантах осуществления в любом из случаев лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, второе средство лечения является более эффективным, *например*, эквивалентный эффект наблюдается при меньшей дозе второго средства лечения, или же второе средство лечения снижает симптомы в большей степени, чем наблюдалось бы в том случае, если бы второе средство лечения вводили в отсутствие первого средства лечения, или же аналогичная ситуация наблюдается для первого средства лечения. В некоторых вариантах осуществления доставка осуществляется таким образом, что снижение симптома или другого параметра, связанного с заболеванием, является более значительным, чем наблюдалось бы в том случае, если бы одно средство лечения доставляли в отсутствие другого. Эффект двух средств лечения может быть частично

аддитивным, полностью аддитивным или большим чем аддитивный. Доставка может осуществляться таким образом, что эффект первого вводимого средства лечения все еще будет определяться во время доставки второго средства.

[0337] В некоторых вариантах осуществления «по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое вещество» включает в себя TFP-экспрессирующую клетку. Также предложены Т-клетки, которые экспрессируют множество TFP, которые связываются с одними и теми же или различными антигенами-мишенями либо с одними и теми же или различными эпитопами на одном и том же антигене-мишени. Также предлагаются популяции Т-клеток, в которых первая субпопуляция Т-клеток экспрессирует первый TFP, а вторая субпопуляция Т-клеток экспрессирует второй TFP.

[0338] TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое вещество могут вводиться одновременно в одной или в отдельных композициях либо вводиться последовательно. В случае последовательного введения TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, может вводиться первой, а дополнительное вещество может вводиться вторым, либо же порядок введения может быть противоположным.

[0339] В дополнительных аспектах TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, может использоваться в схеме лечения в комбинации с оперативным вмешательством, химиотерапией, облучением, иммунодепрессивными средствами, такими как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и такролимус, антителами или другими иммунодеструктивными средствами, такими как алемтузумаб, антитела к CD3 или другие виды терапии антителами, циклофосфамид, флударабин, циклоспорин, такролимус, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, ромидепсин, цитокины, и облучением, пептидной вакциной, такой как описанная у Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971.

[0340] В одном варианте осуществления субъекту могут вводить вещество, которое снижает или облегчает побочный эффект, связанный с введением TFP-экспрессирующей клетки. Побочные эффекты, связанные с введением TFP-экспрессирующей клетки, включают в себя, помимо прочего, синдром высвобождения цитокинов (СВЦ) и гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (ГЛГ), также называемый синдромом активации макрофагов (САМ). К симптомам СВЦ относится высокая температура, тошнота, преходящая гипотензия, гипоксия и т. п. Соответствующим образом, способы, описанные в настоящем документе, могут включать в себя введение TFP-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем документе, субъекту и дополнительное введение вещества для сдерживания повышенных уровней растворимого фактора, возникающих вследствие лечения TFP-экспрессирующей клеткой. В одном варианте осуществления растворимый

фактор, повышенный у субъекта, представляет собой один или более из ИНФ- γ , ФНО- α , IL-2 и IL-6. Таким образом, вещество, вводимое для лечения этого побочного эффекта, может представлять собой вещество, которое нейтрализует один или более из этих растворимых факторов. К таким веществам относится, помимо прочего, стероид, ингибитор ФНО- α и ингибитор IL-6. Примером ингибитора ФНО- α является этанерцепт (продается под названием ENBREL®). Примером ингибитора IL-6 является тоцилизумаб (продается под названием АСТЕМРА®).

[0341] В одном варианте осуществления субъекту могут вводить вещество, которое повышает активность TFP-экспрессирующей клетки. Например, в одном варианте осуществления вещество может быть таким, которое ингибирует ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, *например*, белок запрограммированной гибели клеток 1 (PD1), могут в некоторых вариантах осуществления снижать способность TFP-экспрессирующей клетки установить иммунный эффекторный ответ. К примерам ингибирующих молекул относится PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR бета. Ингибирование ингибирующей молекулы, *например*, путем ингибирования ДНК, РНК или уровня белка, может оптимизировать эффективность TFP-экспрессирующей клетки. В вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота, *например*, ингибирующая нуклеиновая кислота, *например*, дсРНК, *например*, миРНК или мшРНК, может использоваться для ингибирования экспрессии ингибирующей молекулы в TFP-экспрессирующей клетке. В одном варианте осуществления ингибитор представляет собой мшРНК. В одном варианте осуществления ингибирующая молекула ингибируется внутри TFP-экспрессирующей клетки. В этих вариантах осуществления молекула дсРНК, которая ингибирует экспрессию ингибирующей молекулы, соединена с нуклеиновой кислотой, которая кодирует компонент, *например*, все компоненты, TFP. В одном варианте осуществления ингибитор ингибирующего сигнала может представлять собой, *например*, антитело или фрагмент антитела, который связывается с ингибирующей молекулой. Например, вещество может представлять собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с PD1, PD-L1, PD-L2 или CTLA4 (*например*, ипилимумаб (также называемый MDX-010 и MDX-101 и представленный на рынке как YERVOY®; Bristol-Myers Squibb; тремелимумаб (моноклональное антитело IgG2, доступное от компании Pfizer, ранее известный как тицилимумаб, CP-675 206)). В одном варианте осуществления вещество представляет собой антитело или фрагмент антитела, которые связывается с Т-клеточным иммуноглобулином и муциновым доменом 3 (TIM-3). В одном варианте осуществления вещество представляет собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с

геном активации лимфоцитов 3 (LAG3).

[0342] В некоторых вариантах осуществления вещество, которое повышает активность TFP-экспрессирующей клетки, может представлять собой, *например*, гибридный белок, содержащий первый домен и второй домен, причем первый домен представляет собой ингибирующую молекулу или ее фрагмент, а второй домен представляет собой полипептид, который связан с положительным сигналом, *например*, полипептид, содержащий внутриклеточный сигнальный домен, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид, который связан с положительным сигналом, может включать в себя костимулирующий домен CD28, CD27, ICOS, *например*, внутриклеточный сигнальный домен CD28, CD27 и/или ICOS и/или домен первичной сигнализации, *например*, CD3 дзета, *например*, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления гибридный белок экспрессируется той же клеткой, которая экспрессирует TFP. В другом варианте осуществления гибридный белок экспрессируется клеткой, *например*, Т-клеткой, которая не экспрессирует TFP против ассоциированного с опухолью антигена.

13. Фармацевтические композиции

[0343] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать TFP-экспрессирующую клетку, *например*, множество TFP-экспрессирующих клеток, как описано в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер и т. п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК или глутатион; адьюванты (*например*, гидроксид алюминия) и консерванты. Композиции по настоящему изобретению в одном аспекте составлены для внутривенного введения.

[0344] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут вводиться таким способом, который соответствует заболеванию, подлежащему лечению (или предотвращению). Количество и частота введения будут определяться такими факторами, как состояние пациента, а также тип и степень тяжести заболевания пациента, хотя соответствующие дозы могут быть установлены в клинических исследованиях.

[0345] В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по существу не содержит, *например*, отсутствуют определяемые уровни загрязняющего вещества, *например*, выбранного из группы, состоящей из эндотоксина, микоплазмы, компетентного по репликации лентивируса (RCL), p24, нуклеиновой кислоты VSV-G, ВИЧ gag,

остаточных гранул, покрытых антителами к CD3/CD28, мышинных антител, смешанной сыворотки человека, бычьего сывороточного альбумина, бычьей сыворотки, компонентов культуральной среды, упаковывающей вектор клетки или плазмидных компонентов, а также бактерии и грибка. В одном варианте осуществления бактерия представляет собой по меньшей мере одну, выбранную из группы, состоящей из *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes* группы А.

[0346] Когда указывается «иммунологически эффективное количество», «противоопухолевое эффективное количество», «ингибирующее опухоль эффективное количество» или «терапевтическое количество», точное количество композиции по настоящему изобретению, подлежащее введению, может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий по возрасту, весу, размеру опухоли, степени инфекции или метастазирования, а также состояния пациента (субъекта). В целом, можно отметить, что фармацевтическая композиция, содержащая Т-клетки, описанные в настоящем документе, может вводиться в дозах от 10^4 до 10^9 клеток/кг массы тела, в некоторых случаях — от 10^5 до 10^6 клеток/кг массы тела, включая все целые значения в этих диапазонах. Композиции Т-клеток также могут вводиться несколько раз в этих дозах. Клетки могут вводиться с помощью методов инфузии, которые широко известны в области иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988).

[0347] В некоторых аспектах может быть необходимым введение активированных Т-клеток субъекту, затем повторное взятие крови впоследствии (или осуществление афереза), активация полученных Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением и повторная инфузия пациенту этих активированных и размноженных Т-клеток. Этот процесс может выполняться несколько раз каждые несколько недель. В некоторых аспектах Т-клетки могут быть активированы во взятой крови объемом от 10 куб. см до 400 куб. см. В некоторых аспектах Т-клетки активируют во взятой крови объемом 20 куб. см, 30 куб. см, 40 куб. см, 50 куб. см, 60 куб. см, 70 куб. см, 80 куб. см, 90 куб. см или 100 куб. см.

[0348] Введение субъекту композиций может осуществляться любым удобным способом, включая ингаляцию аэрозолем, инъекцию, пероральное поступление, трансфузию, имплантацию или трансплантацию. Композиции, описанные в настоящем документе, могут вводиться пациенту трансартериально, подкожно, внутрикожно, внутриопухолево, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной (в/в) инъекции или внутривентриально. В одном аспекте композиции Т-клеток по настоящему изобретению вводят пациенту путем внутрикожной или подкожной инъекции. В одном аспекте

композиции Т-клеток по настоящему изобретению вводят путем в/в инъекции. Композиции Т-клеток могут инъецировать непосредственно в опухоль, лимфатический узел или в область инфекции.

[0349] В конкретном иллюстративном аспекте субъекты могут подвергаться лейкоферезу, при этом лейкоциты собирают, обогащают или деплецируют *ex vivo*, чтобы отобрать и/или выделить представляющие интерес клетки, *например*, Т-клетки. Такие Т-клеточные изоляты могут быть размножены известными в данной области техники способами и обработаны таким образом, что может быть введена одна или более конструкций TFP по настоящему изобретению, таким образом, создавая TFP-экспрессирующую Т-клетку по настоящему изобретению. Нуждающиеся в этом субъекты могут впоследствии подвергаться стандартному лечению высокодозной химиотерапией с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В некоторых аспектах после трансплантации или одновременно с ней субъектам выполняют инфузию размноженных TFP-Т-клеток по настоящему изобретению. В дополнительном аспекте размноженные клетки вводят до операции или после нее.

[0350] Дозировка вышеприведенных требующих введения пациенту видов лечения будет варьироваться в зависимости от точной природы состояния, подлежащего лечению, и реципиента лечения. Масштабирование доз для введения человеку можно выполнять в соответствии с принятыми в данной области практиками. Доза алемтузумаба (CAMPATH®), *например*, обычно будет варьироваться в диапазоне от 1 до около 100 мг для взрослых пациентов, как правило, ее вводят ежедневно в течение периода времени от 1 до 30 дней. Предпочтительная дневная доза составляет от 1 до 10 мг в день, хотя в некоторых случаях могут использоваться большие дозы до 40 мг в день (описано в патенте США № 6,120,766).

[0351] В одном варианте осуществления TFP вводят в Т-клетки, *например*, используя транскрипцию *in vitro*, а субъекту (*например*, человеку) выполняют первоначальное введение TFP-Т-клеток по настоящему изобретению, а также одно или более последующих введений TFP-Т-клеток по настоящему изобретению, причем одно или более последующих введений выполняют менее чем через 15 дней, *например*, через 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения. В одном варианте осуществления субъекту (*например*, человеку) выполняют более одного введения TFP-Т-клеток по настоящему изобретению в неделю, *например*, выполняют 2, 3 или 4 введения TFP-Т-клеток по настоящему изобретению в неделю. В одном варианте осуществления субъекту (*например*, человеку) выполняют более одного введения TFP-Т-клеток в неделю (*например*, 2, 3 или 4 введения в неделю) (также называется в настоящем документе как цикл) с последующим

перерывом введения TFP-T-клеток на одну неделю, а затем субъекту выполняют одно или более дополнительных введений TFP-T-клеток (*например*, более одного введения TFP-T-клеток в неделю). В другом варианте осуществления субъекту (*например*, человеку) выполняют более одного цикла TFP-T-клеток, а период времени между каждым циклом составляет менее чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 дня. В одном варианте осуществления TFP-T-клетки вводят через день за 3 введения в неделю. В одном варианте осуществления TFP-T-клетки по настоящему изобретению вводят в течение по меньшей мере двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или более недель.

[0352] В одном аспекте TFP-T-клетки против ассоциированного с опухолью антигена получают с помощью лентивирусных вирусных векторов, таких как лентивирус. Полученные таким образом TFP-T-клетки будут иметь устойчивую экспрессию TFP.

[0353] В одном аспекте TFP-T-клетки временно экспрессируют векторы TFP в течение 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 дней после трансдукции. Временная экспрессия TFP может быть осуществлена путем доставки вектора TFP РНК. В одном аспекте РНК TFP трансдуцируют в T-клетку путем электропорации.

[0354] Потенциальной проблемой, которая может возникнуть у пациентов, получающих лечение с помощью T-клеток, временно экспрессирующих TFP (в частности с помощью мышинных TFP-T-клеток, несущих scFv), является анафилаксия после нескольких лечений.

[0355] Не ограничиваясь данной теорией, считается, что подобный анафилактический ответ может быть вызван развивающимся гуморальным ответом против TFP у пациента, т. е. антителами к TFP, имеющими изотип против IgE. Полагают, что клетки пациента, вырабатывающие антитела, подвергаются переключению класса с изотипа IgG (который не вызывает анафилаксию) на изотип IgE, когда существует перерыв в воздействии антигеном, составляющий от десяти до четырнадцати дней.

[0356] Если пациент подвержен высокому риску развития ответа на антитела к TFP в ходе лечения временной терапией TFP (*например*, полученные путем трансдукции РНК), перерывы в инфузии TFP-T-клеток не должны длиться более, чем от десяти до четырнадцати дней.

ПРИМЕРЫ

[0357] Далее будет подробно описано изобретение со ссылкой на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры предоставлены только в целях иллюстрации, и их не следует интерпретировать как ограничивающие, если не указано иное. Таким образом, изобретение не должно восприниматься как такое, которое ограничивается следующими примерами, оно должно восприниматься скорее как такое, которое охватывает любые и все варианты, которые станут очевидными в результате идей,

представленных в настоящем документе. Без дополнительного описания, полагают, что с применением предшествующего описания и следующих ниже иллюстративных примеров специалист в данной области техники может получать и использовать соединения по настоящему изобретению и осуществлять на практике заявленные способы. Следующие демонстрационные примеры конкретно указывают различные аспекты данного изобретения, и их не следует интерпретировать как ограничивающие каким-либо образом остальную часть описания.

[0358] Следующие примеры описывают сконструированные рецепторы Т-клеток, обладающие специфичностью к более чем одному антигену-мишени на раковой клетке; в дополнение описаны способы создания популяций Т-клеток, имеющих TCR, специфичные к более чем одному антигену в одной и той же клетке или в комбинации клеток. В одном варианте осуществления конструкции TFP получают такими, которые имеют оба связывающих домена (например, scFv, sdAb и т. д.) в тандеме в одной субъединице TCR. В другом варианте осуществления конструкции TFP получают такими, которые имеют оба связывающих домена в одном TCR, при этом по одному связывающему домену присутствует в каждой из двух субъединиц TCR, например, в двух субъединицах эpsilon, в субъединице эpsilon и субъединице gamma и т. д. В другом варианте осуществления конструкции TFP получают отдельно в отдельных лентивирусных векторах, и популяцию Т-клеток-мишеней трансдуцируют обоими вирусами. В примерах описана комбинация TFP против MSLN и TFP против MUC16, и/или TFP, обладающий специфичностью как к MSLN, так и к MUC16, и/или смешанная популяция Т-клеток, в которой Т-клетки представляют собой смесь Т-клеток, трансдуцированных TFP против MSLN, с Т-клетками, трансдуцированными TFP против MUC16. Конструкции против MSLN и против MUC16, описанные в настоящем документе, являются только иллюстративными и не должны рассматриваться как ограничивающие, как было указано выше. Конструкции с множеством комбинаций антител против опухолевых антигенов рассматриваются в способах по настоящему изобретению.

Пример 1. Конструкции TFP

[0359] Конструкции TFP против мезотелина сконструированы путем клонирования фрагмента ДНК связывающего домена против мезотелина (например, sdAb, scFv или их фрагмента), связанного с CD3 или фрагментом ДНК TCR посредством последовательности ДНК, кодирующей линкер, имеющий последовательность $G_4S)_n$, где $n = 1-4$, например, в вектор p510 ((System Biosciences (SBI)) по сайтах XbaI и EcoRI. Могут использоваться другие подходящие векторы.

[0360] Полученные конструкции TFP против мезотелина являются следующими: p510_anti-

mesothelin_TCR α (анти-мезотелин – линкер – человеческая полноразмерная α -цепь Т-клеточного рецептора), p510_anti-mesothelin_TCR α C (анти-мезотелин – линкер – человеческая α -цепь константного домена Т-клеточного рецептора), p510_anti-mesothelin_TCR β (анти-мезотелин – линкер – человеческая полноразмерная β -цепь Т-клеточного рецептора), p510_anti-mesothelin_TCR β C (анти-мезотелин – линкер – человеческая β -цепь константного домена Т-клеточного рецептора), p510_anti-mesothelin_TCR γ (анти-мезотелин – линкер – человеческая полноразмерная γ -цепь Т-клеточного рецептора), p510_anti-mesothelin_TCR γ C (анти-мезотелин – линкер – человеческая γ -цепь константного домена Т-клеточного рецептора), p510_anti-mesothelin_TCR δ (анти-мезотелин – линкер – человеческая полноразмерная δ -цепь Т-клеточного рецептора), p510_anti-mesothelin_TCR δ C (анти-мезотелин – линкер – человеческая β -цепь константного домена Т-клеточного рецептора), p510_anti-mesothelin_CD3 γ (анти-мезотелин – линкер – человеческая цепь CD3 γ), p510_anti-mesothelin_CD3 δ (анти-мезотелин – линкер – человеческая цепь Cd3 δ) и p510_anti-mesothelin_CD3 ϵ (анти-мезотелин – линкер – человеческая цепь CD3 ϵ).

[0361] В некоторых вариантах осуществления конструкцию CAR против мезотелина p510_antimesothelin_28 ζ получают путем клонирования синтезированной ДНК, кодирующей анти-мезотелин, частичного внеклеточного домена CD28, трансмембранного домена CD28, внутриклеточного домена CD28 и CD3 дзета в вектор p510 по сайтах XbaI и EcoR1. В других вариантах осуществления конструкцию CAR против мезотелина получают с применением домена 4-1BB дзета.

[0362] Конструкции TFP против MUC16 можно сконструировать путем клонирования фрагмента ДНК связывающего домена против MUC16 (например, sdAb, scFv или их фрагмента), связанного с CD3 или фрагментом ДНК TCR посредством последовательности ДНК, кодирующей линкер, имеющий последовательность (G4S) n , где $n = 1-4$, в вектор p510 ((System Biosciences® (SBI)) по сайтах XbaI и EcoR1. Также могут использоваться другие векторы, например, вектор pLRPO.

[0363] Примеры конструкций TFP против MUC16 включают в себя p510_anti-MUC16_TCR α (анти- MUC16 – линкер – человеческая полноразмерная α -цепь Т-клеточного рецептора), p510_anti-MUC16_TCR α C (анти-MUC16 – линкер – человеческая α -цепь константного домена Т-клеточного рецептора), p510_anti-MUC16_TCR β (анти-MUC16 – линкер – человеческая полноразмерная β -цепь Т-клеточного рецептора), p510_anti-MUC16_TCR β C (анти-MUC16 – линкер – человеческая β -цепь константного домена Т-клеточного рецептора), p510_anti-MUC16_TCR γ (анти-MUC16 – линкер – человеческая полноразмерная γ -цепь Т-клеточного рецептора), p510_anti-MUC16_TCR γ C

(анти-MUC16 – линкер – человеческая γ -цепь константного домена Т-клеточного рецептора), p510_anti-MUC16_TCR δ (анти-MUC16 – линкер – человеческая полноразмерная δ -цепь Т-клеточного рецептора), p510_anti-MUC16_TCR δ C (анти-MUC16 – линкер – человеческая β -цепь константного домена Т-клеточного рецептора), p510_anti-MUC16_CD3 γ (анти-MUC16 – линкер – человеческая цепь CD3 γ), p510_anti-MUC16_CD3 δ (анти-MUC16 – линкер – человеческая цепь Cd3 δ) и p510_anti-MUC16_CD3 ϵ (анти-MUC16 – линкер – человеческая цепь CD3 ϵ). Используемый в настоящем документе анти-MUC16 может представлять собой человеческий scFv, специфичный к MUC16, например, 4H11.

[0364] Пример конструкции CAR против MUC16 p510_anti-MUC16_28 ζ можно получить путем клонирования синтезированной ДНК, кодирующей анти-MUC16, частичного внеклеточного домена CD28, трансмембранного домена CD28, внутриклеточного домена CD28 и CD3 дзета в вектор p510 по сайтах XbaI и EcoRI. В других вариантах осуществления конструкцию CAR против MUC16 получают с применением домена 4-1BB дзета.

[0365] *Получение TFP из доменов TCR и связывающих доменов*

[0366] Связывающие домены MUC16 (например, однодоменное антитело, scFv или их фрагменты) могут быть рекомбинантно связаны с CD3 эпсилон или другими субъединицами TCR, используя линкерную последовательность, такую как G₄S, (G₄S)₂, (G₄S)₃ или (G₄S)₄. В случае использования scFv могут использоваться различные линкеры и конфигурации scFv. Альфа- и бета-цепи TCR, или гамма- и дельта-цепи TCR, могут использоваться для получения TFP в качестве полноразмерных полипептидов или только их константных доменов. Любая переменная последовательность альфа- и бета-цепи TCR/гамма- и дельта-цепи TCR подходит для создания TFP.

[0367] *Векторы экспрессии TFP*

[0368] Предложены векторы экспрессии, которые включают в себя: промотор (промотор с энхансером цитомегаловируса (CMV)), сигнальную последовательность для осуществления секреции, сигнал полиаденилирования и терминатор транскрипции (ген бычьего гормона роста (BGH)), элемент, обеспечивающий эписомальную репликацию и репликацию у прокариот (например, с происхождением SV40 и ColE1 или другие, известные в данной области техники), и элементы для обеспечения селекции (ген сопротивления к ампициллину и маркер зеоцина).

[0369] Предпочтительно, конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP, клонируют в лентивирусный вектор экспрессии, и экспрессию подтверждают на основании количества и качества эффекторного ответа Т-клеток, трансдуцированных TFP против MUC16, в ответ на MUC16⁺ клетки-мишени. Эффекторные ответы Т-клеток включают в себя, помимо прочего, размножение клеток, пролиферацию, удвоение, выработку

цитокинов и лизис клеток-мишеней или цитолитическую активность (т. е. дегрануляцию).

[0370] Lentiviral vectors for TFP.MUC16 gene transfer can be used for production of genomic material, packaged in pseudotyped lentiviral particles VSV-G. DNA of lentiviral vector is mixed with three packaging components VSV-G, gag/pol and rev in combination with reagent Lipofectamine® for transfection of HEK-293 cells (kidney embryo, ATCC® CRL-1573™). After 24 and 48 hours, cells are collected, filtered and concentrated by ultracentrifugation. The resulting viral preparation is stored at -80°C. The amount of transduced units can be determined by titration on Sup-T1 cells (T-cell lymphoma, ATCC® CRL-1942™). Redirected T-cells TFP.MUC16 are obtained by activation of naive T-cells, for example, with CD3 and CD28 beads for 24 hours, followed by addition of the appropriate amount of transduced units for the desired percentage of transduced T-cells. These modified T-cells are allowed to proliferate, as long as they do not die and do not decrease in size, after which they are cryopreserved for further analysis. The number and size of cells are measured with a Coulter Multisizer™ III. Before cryopreservation, the percentage of transduced cells (expressing TFP.MUC16 on the cell surface) and the relative intensity of fluorescence of such expression is determined by flow cytometry. On histograms, the relative levels of TFP expression can be studied by comparing the percentage of transduced cells with their relative fluorescence intensity.

[0371] In some variants of implementation, a number of TFP are introduced by T-cell transduction using a number of viral vectors.

[0372] *Оценка цитолитической активности, возможностей пролиферации и секреции цитокинов гуманизированных перенаправленных TFP-T-клеток*

[0373] Functional capabilities of T-cells TFP.MUC16 for production of expressed on the cell surface TFP, as well as for destruction of target cells, proliferation and secretion of cytokines can be determined with the help of analyses, known in this field of technology.

[0374] Human mononuclear cells of peripheral blood (PBMC, for example, blood of a normal donor after apheresis, whose naive T-cells can be obtained by negative selection of T-cells, CD4+ and CD8+ lymphocytes) are treated with human interleukin-2 (IL-2), then activated with CD3 and CD28 beads, for example, in 10% RPMI at 37°C, 5% CO₂ before transduction

лентивирусными векторами, кодирующими TFP. Анализы методом проточной цитометрии можно использовать для подтверждения присутствия на клеточной поверхности TFP, например, с помощью антитела к FLAG или антимышиного антитела с переменным доменом. Выработку цитокинов (*например*, ИНФ- γ) можно измерить с помощью ИФА или других анализов.

[0375] Источники субъединиц TCR

[0376] Все субъединицы комплекса человеческого Т-клеточного рецептора (TCR) содержат внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Комплекс человеческого TCR содержит полипептид CD3-эпсилон, полипептид CD3-гамма, полипептид CD3-дельта, полипептид CD3-дзета, полипептид альфа-цепи TCR и полипептид бета-цепи TCR. Каноническую полипептидную последовательность CD3-эпсилон человека можно найти под учетным номером UniProt P07766. Каноническую полипептидную последовательность CD3-гамма человека можно найти под учетным номером UniProt P09693. Каноническую полипептидную последовательность CD3-дельта человека можно найти под учетным номером UniProt P043234. Каноническую полипептидную последовательность CD3-дзета человека можно найти под учетным номером UniProt P20963. Каноническую последовательность альфа-цепи TCR человека можно найти под учетным номером UniProt Q6ISU1. Каноническую последовательность C-области бета-цепи TCR человека можно найти под учетным номером UniProt P01850, последовательность V-области бета-цепи TCR человека — под номером P04435.

[0377] Получение TFP из доменов TCR и scFv

[0378] scFv мезотелина рекомбинантно связаны с CD3-эпсилон или другими субъединицами TCR (см. 1С) посредством линкерной последовательности, такой как G₄S, (G₄S)₂, (G₄S)₃ или (G₄S)₄. Используются различные линкеры и конфигурации scFv. Альфа- и бета-цепи TCR использовались для получения TFP в качестве полноразмерных полипептидов или только их константных доменов. Любая переменная последовательность альфа- и бета-цепи TCR может использоваться для создания TFP.

[0379] Векторы экспрессии TFP

[0380] Предложены векторы экспрессии, которые включают в себя: промотор (промотор с энхансером цитомегаловируса (CMV)), сигнальную последовательность для осуществления секреции, сигнал полиаденилирования и терминатор транскрипции (ген бычьего гормона роста (BGH)), элемент, обеспечивающий эписомальную репликацию и репликацию у прокариот (*например*, с происхождением SV40 и ColE1 или другие, известные в данной области техники), и элементы для обеспечения селекции (ген сопротивления к ампициллину и маркер зеоцина).

[0381] Предпочтительно, конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP, клонируют в лентивирусный вектор экспрессии, и экспрессию подтверждают на основании количества и качества эффекторного ответа Т-клеток TFP против MSLN, в ответ на мезотелин+ клетки-мишени. Эффекторные ответы Т-клеток включают в себя, помимо прочего, размножение клеток, пролиферацию, удвоение, выработку цитокинов и лизис клеток-мишеней или цитолитическую активность (т. е. дегрануляцию).

[0382] Лентивирусные векторы переноса TFP.мезотелин используются для выработки геномного материала, упакованного в псевдотипированные лентивирусные частицы VSV-G. ДНК лентивирусного вектора переноса смешивают с тремя упаковывающими компонентами VSV-G, gag/pol и rev в комбинации с реагентом Lipofectamine® для трансфицирования их вместе в клетки HEK-293 (почки эмбриона, ATCC® CRL-1573™). Через 24 и 48 часов среду собирают, фильтруют и концентрируют ультрацентрифугированием. Полученный вирусный препарат хранят при температуре – 80°C. Количество трансдуцированных единиц определяют титрованием на клетках Sup-T1 (Т-клеточная лимфобластная лимфома, ATCC® CRL-1942™). Перенаправленные Т-клетки TFP.мезотелин получают путем активации свежих наивных Т-клеток, например, с помощью гранул против CD3 и CD28 в течение 24 часов, а затем добавления соответствующего количества трансдуцированных единиц для получения желаемого процентного содержания трансдуцированных Т-клеток. Эти модифицированные Т-клетки оставляют размножаться, пока они не отстоятся и не уменьшатся в размере, после чего их криоконсервируют для последующего анализа. Количество и размеры клеток измеряют с помощью Coulter Multisizer™ III. Перед криоконсервацией определяют процентное содержание трансдуцированных клеток (экспрессирующих TFP.мезотелин на клеточной поверхности) и относительную интенсивность флуоресценции такой экспрессии с помощью анализа методом проточной цитометрии. На гистограмме изучают относительные уровни экспрессии TFP путем сравнения процентного содержания трансдуцированных клеток с их относительной интенсивностью флуоресценции.

[0383] В некоторых вариантах осуществления вводят множество TFP путем Т-клеточной трансдукции при помощи множества вирусных векторов.

[0384] *Оценка цитолитической активности, возможностей пролиферации и секреции цитокинов перенаправленных TFP-Т-клеток*

[0385] Функциональные возможности Т-клеток TFP против MSLN по выработке экспрессируемых на клеточной поверхности TFP, а также по уничтожению опухолевых клеток-мишеней, пролиферации и секреции цитокинов определяют с помощью анализов, известных в данной области техники.

[0386] Человеческие моноклеарные клетки периферической крови (PBMC, *например*, кровь нормального донора после афереза, чьи наивные Т-клетки были получены путем отрицательной селекции Т-клеток, CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов) обрабатывают человеческим интерлейкином-2 (IL-2), затем активируют с помощью гранул против CD3 α и CD28, *например*, в 10% RPMI при температуре 37°C, 5% CO₂ перед трансдукцией лентивирусными векторами, кодирующими TFP. Анализы методом проточной цитометрии используют для подтверждения присутствия на клеточной поверхности TFP, *например*, с помощью антитела к FLAG или антимышиного антитела с вариабельным доменом. Выработка цитокинов (*например*, ИНФ- γ) измеряется с помощью ИФА или других анализов.

[0387]

Пример 2. Последовательности антител

[0388] *Получение последовательностей антител*

[0389] Каноническую полипептидную последовательность человеческого мезотелина можно найти под учетным номером UniProt Q13421 (или Q13421-1). Предлагаются полипептиды антител, которые способны специфически связываться с человеческим полипептидом мезотелина, а также его фрагментами или доменами. Антитела к мезотелину могут быть получены с помощью различных методов (см., *например*, Nicholson et al, 1997). Когда антитела к мезотелину, полученные от мыши, верблюда или других видов, используются в качестве исходного материала, выполняют их гуманизацию. *Например*, гуманизация мышинных антител к мезотелину является желаемой в клинических условиях, когда мышинные специфические остатки могут индуцировать ответ человеческого антимышиного антигена (НАМА) у субъектов, которые получают лечение гибридным белком (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), т.е. лечение Т-клетками, трансдуцированными конструкциями TFP против MSLN/MUC16. Гуманизацию осуществляют путем прививки областей CDR нечеловеческого антитела к мезотелину на соответствующие акцепторные каркасы человеческой зародышевой линии, необязательно включая другие модификации областей CDR и/или каркасных областей. Как представлено в настоящем документе, нумерация остатков антитела или фрагмента антитела осуществляется согласно Kabat (Kabat E. A. et al, 1991; Chothia et al, 1987).

Получение scFv

[0390] Человеческие или гуманизированные IgG против мезотелина используются для получения scFv-последовательностей для конструкций TFP. Получают последовательности ДНК, кодирующие человеческие или гуманизированные домены V_L и V_H, а кодоны для конструкций необязательно оптимизируют для экспрессии в клетках Homo sapiens.

Порядок, в котором домены V_L и V_H появляются в scFv, различен (т. е. ориентация V_L-V_H или V_H-V_L), а три копии субъединицы «G4S» или «G₄S» (G₄S)₃ соединяют переменные домены для создания scFv-домена. Плазмидные конструкции scFv против мезотелина или MUC16 могут иметь необязательные метки аффинности Flag, His или другие, конструкции электропорированы в НЕК293 или другие подходящие клеточные линии человека или млекопитающего и очищаются. Валидационные анализы включают в себя анализ связывания методом FACS, кинетический анализ с использованием Proteon® и окрашивание мезотелин-экспрессирующих клеток.

[0391] Примерами доменов V_L и V_H против мезотелина, CDR и нуклеотидных последовательностей, кодирующих их, могут являться описанные в патентах США №№: 9,272,002; 8,206,710; 9,023,351; 7,081,518; 8,911,732; 9,115,197 и 9,416,190; а также в публикации патента США № 20090047211. Другими примерами доменов V_L и V_H против мезотелина, CDR и нуклеотидных последовательностей, кодирующих их, соответственно, могут являться домены, CDR и последовательности следующих моноклональных антител: крысиное антитело к мезотелину 420411, крысиное антитело к мезотелину 420404, мышинное антитело к мезотелину MN-1, мышинное антитело к мезотелину MB-G10, мышинное антитело к мезотелину ABIN233753, кроличье антитело к мезотелину FQS3796(3), кроличье антитело к мезотелину TQ85, мышинное антитело к мезотелину TA307799, крысиное антитело к мезотелину 295D, крысиное антитело к мезотелину B35, мышинное антитело к мезотелину 5G157, мышинное антитело к мезотелину 129588, кроличье антитело к мезотелину 11C187, мышинное антитело к мезотелину 5B2, кроличье антитело к мезотелину SP74, кроличье антитело к мезотелину D4X7M, мышинное антитело к мезотелину C-2, мышинное антитело к мезотелину C-3, мышинное антитело к мезотелину G-1, мышинное антитело к мезотелину G-4, мышинное антитело к мезотелину K1, мышинное антитело к мезотелину B-3, мышинное антитело к мезотелину 200-301-A87, мышинное антитело к мезотелину 200-301-A88, кроличье антитело к мезотелину EPR2685(2), кроличье антитело к мезотелину EPR4509 или кроличье антитело к мезотелину PPI-2e(ИНС).

[0392] В некоторых вариантах осуществления используются однодоменные (V_{HH}) связующие антитела, такие как приведены в SEQ ID NO 52–54 (SD1, SD4 и SD6, соответственно).

[0393] Человеческие или гуманизированные IgG против MUC16 могут использоваться для получения scFv-последовательностей для конструкций TFP. Получают последовательности ДНК, кодирующие человеческие или гуманизированные домены V_L и V_H , а кодоны для конструкций необязательно оптимизируют для экспрессии в клетках Homo sapiens. Порядок, в котором домены V_L и V_H появляются в scFv, различен (т. е. ориентация V_L-V_H

или V_H-V_L), а три копии субъединицы «G4S» или «G₄S» (G₄S)₃ соединяют переменные домены для создания scFv-домена. Плазмидные конструкции scFv против MUC16 могут иметь необязательные метки аффинности Flag, His или другие, конструкции электропорированы в HEK293 или другие подходящие клеточные линии человека или млекопитающего и очищаются. Валидационные анализы включают в себя анализ связывания методом FACS, кинетический анализ с использованием Proteom и окрашивание MUC16-экспрессирующих клеток.

[0394] Примеры связывающих доменов против MUC16, включая домен V_L , домен V_H и CDR, которые можно использовать с композициями и способами, описанными в настоящем документе, можно найти в некоторых публикациях и/или коммерческих источниках. Например, определенные антитела к MUC16, включая 3A5 и 11D10, были описаны в WO 2007/001851, содержание которого включено посредством ссылки. Моноклональное антитело 3A5 связывает множество сайтов полипептида MUC16 с аффинностью 433 пМ, как определено с помощью анализа Скэтчарда OVCAR-3. Другими примерами доменов V_L и V_H против MUC16, CDR и нуклетидных последовательностей, кодирующих их, соответственно, могут быть домены, CDR и последовательности следующих моноклональных антител: GTX10029, GTX21107, MA5-124525, MA5-11579, 25450002, ABIN1584127, ABIN93655, 112889, 120204, LS-C356195, LS- B6756, TA801241, TA801279, V3494, V3648, 666902, 666904, HPA065600, AMAb91056.

[0395] Каноническая полипептидная последовательность человеческого MUC 16 соответствует учетному номеру UniProt Q8WXI7. Предложены полипептиды антител, которые способны специфически связываться с человеческим полипептидом MUC16, а также его фрагментами или доменами. Антитела к MUC16 могут быть получены с помощью различных методов (см., например, Nicholson et al, 1997). Когда мышиные антитела к MUC16 используются в качестве исходного материала, гуманизация мышиных антител к MUC16 является желаемой в клинических условиях, когда мышиные специфические остатки могут индуцировать ответ человеческого антимышиного антигена (НАМА) у субъектов, которые получают лечение гибридным белком (ТФР) Т-клеточного рецептора (TCR), т. е. лечение Т-клетками, трансдуцированными конструкциями ТФР.MUC16. Гуманизацию осуществляют путем прививки областей CDR мышиного антитела к MUC16 на соответствующие акцепторные каркасы человеческой зародышевой линии, необязательно включая другие модификации областей CDR и/или каркасных областей. Как представлено в настоящем документе, нумерация остатков антитела или фрагмента антитела осуществляется согласно Kabat (Kabat E. A. et al, 1991; Chothia et al, 1987).

[0396] Однодоменные связующие антитела

[0397] Верблюжки или другие однодоменные антитела также могут использоваться для получения конструкций TFP против MUC16. Домен V_{HH} МОЖЕТ ИСПОЛЬЗОВАТЬСЯ ДЛЯ ТОГО, ЧТОБЫ СЛИВАТЬСЯ С РАЗЛИЧНЫМИ СУБЪЕДИНИЦАМИ TCR. В некоторых вариантах осуществления используются однодоменные (например, V_{HH}) связующие антитела, такие как представлены в таблице 2 (SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 19, SEQIDNO:24, SEQIDNO:29, SEQIDNO:34, SEQIDNO:39, SEQ ID NO:43 и SEQ ID NO:47). Получение верблюжьих антител к hMUC16 подробно описано в примере 3.

[0398] Получение TFP из доменов TCR и scFv

[0399] scFv MUC16 можно рекомбинантно связать с CD3-эпсилон или другими субъединицами TCR посредством линкерной последовательности, такой как G_4S , $(G_4S)_2$, $(G_4S)_3$ или $(G_4S)_4$. Можно использовать различные линкеры и конфигурации scFv. Альфа- и бета-цепи TCR можно использовать для получения TFP в качестве полноразмерных полипептидов или только их константных доменов. Любая переменная последовательность альфа- и бета-цепи TCR может использоваться для создания TFP.

[0400] Векторы экспрессии TFP

[0401] Предложены векторы экспрессии, которые включают в себя: промотор (промотор с энхансером цитомегаловируса (CMV)), сигнальную последовательность для осуществления секреции, сигнал полиаденилирования и терминатор транскрипции (ген бычьего гормона роста (BGH)), элемент, обеспечивающий эписомальную репликацию и репликацию у прокариот (*например*, с происхождением SV40 и ColE1 или другие, известные в данной области техники), и элементы для обеспечения селекции (ген сопротивления к ампициллину и маркер зеоцина).

[0402] Предпочтительно, конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP, клонируют в лентивирусный вектор экспрессии, и экспрессию подтверждают на основании количества и качества эффекторного ответа TFP.MUC16-трансдуцированных Т-клеток («MUC16.TFP», или «Т-клетки MUC16.TFP», или «TFP.MUC16», или «Т-клетки TFP.MUC16») в ответ на MUC16+ клетки-мишени. Эффекторные ответы Т-клеток включают в себя, помимо прочего, размножение клеток, пролиферацию, удвоение, выработку цитокинов и лизис клеток-мишеней или цитолитическую активность (т. е. дегрануляцию).

[0403] Лентивирусные векторы переноса TFP.MUC16 могут использоваться для выработки геномного материала, упакованного в псевдотипированные лентивирусные частицы VSV-G. ДНК лентивирусного вектора переноса смешивают с тремя упаковывающими компонентами VSV-G, gag/pol и rev в комбинации с реагентом Lipofectamine® для

трансфицирования их вместе в клетки НЕК-293 (почки эмбриона, ATCC® CRL-1573™). Через 24 и 48 часов среду собирают, фильтруют и концентрируют ультрацентрифугированием. Полученный вирусный препарат хранят при температуре – 80°C. Количество трансдуцированных единиц можно определить титрованием на клетках Sup-T1 (Т-клеточная лимфобластная лимфома, ATCC® CRL-1942™). Перенаправленные Т-клетки TFP.MUC16 получают путем активации свежих наивных Т-клеток, например, с помощью гранул против CD3 и CD28 в течение 24 часов, а затем добавления соответствующего количества трансдуцированных единиц для получения желаемого процентного содержания трансдуцированных Т-клеток. Эти модифицированные Т-клетки оставляют размножаться, пока они не отстоятся и не уменьшатся в размере, после чего их криоконсервируют для последующего анализа. Количество и размеры клеток измеряют с помощью счетчика частиц Coulter Multisizer™ III. Перед криоконсервацией определяют процентное содержание трансдуцированных клеток (экспрессирующих TFP.MUC16 на клеточной поверхности) и относительную интенсивность флуоресценции такой экспрессии с помощью анализа методом проточной цитометрии. На гистограммах можно изучить относительные уровни экспрессии TFP путем сравнения процентного содержания трансдуцированных клеток с их относительной интенсивностью флуоресценции.

[0404] В некоторых вариантах осуществления вводят множество TFP путем Т-клеточной трансдукции при помощи множества вирусных векторов.

[0405] *Оценка цитолитической активности, возможностей пролиферации и секреции цитокинов гуманизированных перенаправленных TFP-Т-клеток*

[0406] Функциональные возможности Т-клеток TFP.MUC16 по выработке экспрессируемых на клеточной поверхности TFP, а также по уничтожению опухолевых клеток-мишеней, пролиферации и секреции цитокинов можно определить с помощью анализов, известных в данной области техники.

[0407] Человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС, *например*, кровь нормального донора после афереза, чьи наивные Т-клетки могут быть получены путем отрицательной селекции Т-клеток, CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов) обрабатывают человеческим интерлейкином-2 (IL-2), затем активируют с помощью гранул против CD3 и CD28, *например*, в 10% RPMI при температуре 37°C, 5% CO₂ перед трансдукцией лентивирусными векторами, кодирующими TFP. Анализы методом проточной цитометрии можно использовать для подтверждения присутствия на клеточной поверхности TFP, *например*, с помощью антитела к FLAG или антимышиного антитела с варибельным доменом. Выработку цитокинов (*например*, ИНФ-γ) можно измерить с помощью ИФА или других анализов.

[0408] Источники субъединиц TCR

[0409] Все субъединицы комплекса человеческого Т-клеточного рецептора (TCR) содержат внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Комплекс человеческого TCR содержит полипептид CD3-эпсилон, полипептид CD3-гамма, полипептид CD3-дельта, полипептид CD3-дзета, полипептид альфа-цепи TCR и полипептид бета-цепи TCR. Каноническую полипептидную последовательность CD3-эпсилон человека можно найти под учетным номером UniProt P07766. Каноническую полипептидную последовательность CD3-гамма человека можно найти под учетным номером UniProt P09693. Каноническую полипептидную последовательность CD3-дельта человека можно найти под учетным номером UniProt P043234. Каноническую полипептидную последовательность CD3-дзета человека можно найти под учетным номером UniProt P20963. Каноническую последовательность альфа-цепи TCR человека можно найти под учетным номером UniProt Q6ISU1. Каноническую последовательность С-области бета-цепи TCR человека можно найти под учетным номером UniProt P01850, последовательность V-области бета-цепи TCR человека — под номером P04435.

[0410] Получение TFP из доменов TCR и scFv

[0411] scFv мезотелина рекомбинантно связаны с CD3-эпсилон или другими субъединицами TCR (см. 1С) посредством линкерной последовательности, такой как G₄S, (G₄S)₂, (G₄S)₃ или (G₄S)₄. Используются различные линкеры и конфигурации scFv. Альфа- и бета-цепи TCR использовались для получения TFP в качестве полноразмерных полипептидов или только их константных доменов. Любая переменная последовательность альфа- и бета-цепи TCR может использоваться для создания TFP.

[0412] Векторы экспрессии TFP

[0413] Предложены векторы экспрессии, которые включают в себя: промотор (промотор с энхансером цитомегаловируса (CMV)), сигнальную последовательность для осуществления секреции, сигнал полиаденилирования и терминатор транскрипции (ген бычьего гормона роста (BGH)), элемент, обеспечивающий эписомальную репликацию и репликацию у прокариот (*например*, с происхождением SV40 и ColE1 или другие, известные в данной области техники), и элементы для обеспечения селекции (ген сопротивления к ампициллину и маркер зеоцина).

[0414] Предпочтительно, конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP, клонируют в лентивирусный вектор экспрессии, и экспрессию подтверждают на основании количества и качества эффекторного ответа Т-клеток TFP против MUC16, в ответ на мезотелин⁺ клетки-мишени. Эффекторные ответы Т-клеток включают в себя, помимо прочего, размножение клеток, пролиферацию, удвоение, выработку цитокинов и лизис

клеток-мишеней или цитолитическую активность (т. е. дегрануляцию).

[0415] Lentiviral vectors for TFP.mesothelin delivery are used for production of genomic material, packaged in pseudotyped lentiviral particles VSV-G. DNA of lentiviral vector is mixed with three packaging components VSV-G, gag/pol and rev in combination with reagent Lipofectamine® for transfection together in HEK-293 (kidney embryo, ATCC® CRL-1573™). After 24 and 48 hours medium is collected, filtered and concentrated by ultracentrifugation. The resulting viral preparation is stored at temperature – 80°C. The amount of transduced units is determined by titration on Sup-T1 (T-cell lymphoblastoid lymphoma, ATCC® CRL-1942™). Redirected T-cells TFP.mesothelin are obtained by activation of fresh naive T-cells, for example, with CD3 and CD28 beads for 24 hours, and then addition of the corresponding amount of transduced units for the desired percentage of transduced T-cells. These modified T-cells are allowed to proliferate, as long as they do not die and do not decrease in size, after which they are cryopreserved for further analysis. The number and size of cells are measured with Coulter Multisizer™ III. Before cryopreservation, the percentage of transduced cells (expressing TFP.mesothelin on the cell surface) and the relative intensity of fluorescence of such expression is determined by flow cytometry. On the histogram, relative levels of expression of TFP are compared by the percentage of transduced cells with their relative intensity of fluorescence.

[0416] In some variants of implementation, a number of TFP are introduced by T-cell transduction with the help of a number of viral vectors.

[0417] *Оценка цитолитической активности, возможностей пролиферации и секреции цитокинов перенаправленных TFP-T-клеток*

[0418] Functional capabilities of T-cells TFP against MSLN by production of expressed on the cell surface of TFP, as well as by destruction of tumor cells, proliferation and secretion of cytokines are determined with the help of analyses, known in this field of technology.

[0419] Human mononuclear cells of peripheral blood (PBMC, for example, blood of a normal donor after apheresis, whose naive T-cells were obtained by negative selection of T-cells, CD4+ and CD8+ lymphocytes) are treated with human interleukin-2 (IL-2), then activated with the help of CD3 and CD28 beads, for example, in 10% RPMI at temperature 37°C, 5% CO₂ before transduction

лентивирусными векторами, кодирующими TFP. Анализы методом проточной цитометрии используют для подтверждения присутствия на клеточной поверхности TFP, например, с помощью антитела к FLAG или антимиошиного антитела с вариабельным доменом. Выработка цитокинов (*например*, ИНФ- γ) измеряется с помощью ИФА или других анализов.

Пример 3. Демонстрация мультиплексных полипептидов TFP и применение мультиплексных гуманизированных перенаправленных TFP-T-клеток

[0420] Полипептиды TFP, представленные в настоящем документе, способны функционально связываться с эндогенными полипептидами субъединиц TCR для образования функциональных комплексов TCR. В данном случае используется множество TFP в лентивирусных векторах для трансдукции T-клеток с целью создания функционального мультиплексного комплекса рекомбинантного TCR. Например, предложена T-клетка, содержащая: i) первый TFP, имеющий внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен из, например, полипептида CD3-эпсилон и мезотелин-специфического scFv-фрагмента антитела, и ii) второй TFP, имеющий внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен из полипептида CD3-гамма и мезотелин-специфического фрагмента антитела. Первый TFP и второй TFP способны к взаимодействию друг с другом, а также с эндогенными полипептидами субъединицы TCR, формируя, таким образом, функциональный комплекс TCR.

[0421] Применение этих мультиплексных гуманизированных TFP-T-клеток против MSLN, против MUC16 может быть продемонстрировано на солидных опухолях.

Пример 4. Подготовка T-клеток, трансдуцированных с помощью TFP

[0422] *Получение лентивирусов*

[0423] Лентивирусы, кодирующие соответствующие конструкции, готовят следующим образом. Высевают 5×10^6 T-клеток HEK-293F на 100 мм чашку и оставляют на ночь для достижения 70–90% конфлюентности. 2,5 мкг указанных ДНК-плазмид и 20 мкл лентивирусной упаковывающей смеси Lentivirus Packaging Mix (ALSTEM, № по кат. VP100) разбавляют в 0,5 мл DMEM или среды Opti-MEM® I без сыворотки и осторожно перемешивают. В отдельной пробирке 30 мкл реагента для трансфекции NanoFect® (ALSTEM, № по кат. NF100) разводят в 0,5 мл DMEM или среды Opti-MEM® I без сыворотки и осторожно перемешивают. Затем растворы NanoFect/DMEM и ДНК/DMEM смешивают вместе и перемешивают вихревым способом в течение 10–15 секунд перед инкубацией смеси DMEM-плазида-NanoFect при комнатной температуре в течение 15 минут. Весь комплекс трансфекции из предыдущего этапа добавляют по каплям на планшет с клетками и покачивают для равномерного диспергирования комплекса трансфекции по

планшету. Затем планшет инкубируют в течение ночи при температуре 37°C в увлажненном инкубаторе при 5% CO₂. На следующий день надосадочную жидкость заменяют 10 мл свежей среды и добавляют 20 мкл ViralBoost (500x, ALSTEM, № по кат. VB100). Затем планшеты инкубируют при температуре 37°C в течение дополнительных 24 часов. Затем лентивирус, содержащий надосадочную жидкость, собирают в стерильную коническую центрифужную пробирку с крышкой объемом 50 мл и помещают на лед. После центрифугирования со скоростью 3000 об./мин. в течение 15 минут при температуре 4°C высвобожденную надосадочную жидкость фильтруют с помощью стерильного фильтра с низким связыванием белков и диаметром пор 0,45 мкм, а вирус впоследствии выделяют ультрацентрифугированием со скоростью 25 000 об./мин. (Beckmann, L8-70M) в течение 1,5 часов при температуре 4°C. Осадок удаляют и повторно суспендируют в среде DMEM, а концентрации/титры лентивируса определяют методом количественной ОТ-ПЦР, используя набор для титрования Lenti-X™ qRT-PCR Titration kit (Clontech®; номер по каталогу 631235). Любую остаточную плазмидную ДНК удаляют путем обработки DNaseI. Исходный препарат вируса сразу же используют для инфицирования либо разделяют на аликвоты и хранят при температуре –80°C для применения в будущем.

[0424] *Выделение PBMC*

[0425] Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) готовят из цельной крови или лейкоцитарной пленки. Цельную кровь собирают в вакуумные пробирки с гепарином объемом 10 мл и либо сразу же обрабатывают, либо хранят в течение ночи при температуре 4°C. Приблизительно 10 мл цельной антикоагулированной крови смешивают со стерильным фосфатно-солевым буфером (PBS) для получения общего объема 20 мл в конической центрифужной пробирке объемом 50 мл (PBS, pH 7,4, без Ca²⁺/Mg²⁺). Затем 20 мл этой смеси кровь/PBS осторожно накладывают на поверхность 15 мл Ficoll-Paque® PLUS (GE Healthcare®, 17-1440-03) перед центрифугированием при 400g в течение 30–40 минут при комнатной температуре без торможения.

[0426] Лейкоцитарную пленку приобретают у Research Blood Components (Бостон, штат Массачусетс). Пробирки LeucoSep® (Greiner bio-one) готовят путем добавления 15 мл Ficoll-Paque® (GE Health Care) и центрифугирования при 1000g в течение 1 минуты. Лейкоцитарную пленку разводят в соотношении 1:3 в PBS (pH 7,4, без Ca²⁺ или Mg²⁺). Разведенную лейкоцитарную пленку переносят в пробирку Leucoser и центрифугируют при 1000g в течение 15 минут без торможения. Слой клеток, содержащий PBMC, который наблюдается на границе разведенной плазмы/фиколлы, осторожно удаляют, чтобы минимизировать загрязнение фикоаллом. Затем остаточный фикоалл, тромбоциты и белки плазмы удаляют трехкратным промыванием PBMC с помощью 40 мл PBS путем

центрифугирования при 200g в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем клетки подсчитывают на гемоцитометре. Промытые PBMC промывают один раз в среде CAR-T (AIM V-AlbuMAX® (BSA) (Life Technologies), в 5% сыворотке АВ и 1,25 мкг/мл амфотерицина В (Gemini Bio-products, Вудленд, штат Калифорния), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина). Альтернативно, промытые PBMC переносят в изолированные флаконы и замораживают при температуре -80°C в течение 24 часов перед хранением в жидком азоте для последующего применения.

[0427] *Активация T-клеток*

[0428] PBMC, полученные из цельной крови или лейкоцитарной пленки, стимулируют магнитными гранулами, конъюгированными с антителами к человеческим CD28 и CD3, в течение 24 часов перед вирусной трансдукцией. Свежевыделенные PBMC промывают один раз в среде CAR-T (AIM V-AlbuMAX (BSA) (Life Technologies), в 5% сыворотке АВ и 1,25 мкг/мл амфотерицина В (Gemini Bio-products), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) без huIL-2 перед повторным суспендированием в конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде CAR-T с 300 МЕ/мл человеческого IL-2 (из исходного раствора 1000x; Invitrogen). Если PBMC перед этим замораживали, их размораживают и повторно суспендируют в концентрации 1×10^7 клеток/мл в 9 мл предварительно нагретой (37°C) среды cDMEM (Life Technologies) в присутствии 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, в концентрации 1×10^6 клеток/мл перед промыванием один раз в среде CAR-T, повторном суспендировании в концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде CAR-T и добавлением IL-2, как описано выше.

[0429] Перед активацией магнитные гранулы, конъюгированные с антителами к человеческим CD28 и CD3 (доступны, например, от Invitrogen, Life Technologies), трижды промывают в 1 мл стерильного 1x PBS (pH 7,4), используя магнитную подставку для выделения гранул из раствора, перед повторным суспендированием в среде CAR-T с 300 МЕ/мл человеческого IL-2 для получения конечной концентрации 4×10^7 гранул/мл. Затем PBMC и гранулы смешивают в соотношении гранул к клеткам 1:1 путем переноса 25 мкл (1×10^6 гранул) гранул в 1 мл PBMC. Затем желаемое количество аликвот дозируют в единичные лунки 12-луночного планшета для культивирования клеток с низким приклеиванием или необработанных клеток и инкубируют при температуре 37°C с 5% CO_2 в течение 24 часов перед вирусной трансдукцией.

[0430] *Трансдукция/трансфекция и размножение T-клеток*

[0431] После активации PBMC клетки инкубируют в течение 48 часов при температуре 37°C и 5% CO_2 .

Лентивирус размораживают на льду и добавляют 5×10^6 лентивируса вместе с 2 мкл

TransPlus™ (Alstem) на мл среды (конечное разведение 1:500) в каждую лунку с 1×10^6 клеток. Клетки инкубируют в течение дополнительных 24 часов перед повторным добавлением вируса. Альтернативно, лентивирус размораживают на льду и добавляют соответствующий вирус при 5 или 50 MOI в присутствии 5 мкг/мл полибрена (Sigma). Клетки подвергают центрифужной инокуляции при 100g в течение 100 минут при комнатной температуре. Затем клетки выращивают в непрерывном присутствии 300 МЕ/мл человеческого IL-2 в течение 6–14 дней (общее время инкубации зависит от конечного количества требуемых CAR-T-клеток). Концентрации клеток анализируют каждые 2–3 дня, добавляя в этот момент среду для поддержания клеточной суспензии в концентрации 1×10^6 клеток/мл.

[0432] В некоторых случаях активированные РВМС электропорируют с помощью транскрибированной *in vitro* (IVT) РНК. В одном варианте осуществления человеческие РВМС стимулируют с помощью Dynabeads® (Thermo Fisher Scientific®) в соотношении 1 к 1 в течение 3 дней в присутствии 300 МЕ/мл рекомбинантного человеческого IL-2 (R&D Systems) (могут использоваться другие стимулирующие реагенты, такие как реагент TransAct® T Cell Reagent от Milyeni Biotec). Перед электропорацией гранулы удаляют. Клетки промывают и повторно суспендируют в среде OPTI-MEM (Thermo Fisher Scientific) в концентрации $2,5 \times 10^7$ клеток/мл. 200 мкл клеточной суспензии (5×10^6 клеток) переносят в кюветы для электропорации со щелью 2 мм Electroporation Cuvettes Plus™ (Harvard Apparatus® BTX) и предварительно охлаждают на льду. 10 мкг IVT мРНК TFP добавляют в клеточную суспензию. Затем смесь мРНК/клеток электропорируют при 200 В в течение 20 миллисекунд, используя ECM® 830 Electro Square Wave Porator (Harvard Apparatus BTX). Сразу же после электропорации клетки переносят в свежую клеточную культуральную среду (среда AIM V AlbuMAX® (BSA), не содержащая сыворотку, + 5% человеческая сыворотка АВ + 300 МЕ/мл IL-2) и инкубируют при температуре 37°C.

[0433] *Верификация экспрессии TFP методом окрашивания клеток*

[0434] После лентивирусной трансдукции или электропорации мРНК экспрессию TFP против мезотелина или MUC16 подтверждают методом проточной цитометрии, используя антимышиное Fab-антитело для выявления мышинового анти-мезотелина или анти-MUC16. Т-клетки трижды промывают в 3 мл буфера для окрашивания (PBS, 4% BSA) и повторно суспендируют в PBS в концентрации 1×10^6 клеток на лунку. Для исключения мертвых клеток клетки инкубируют с красителем для мертвых клеток LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain (Invitrogen) в течение 30 минут на льду. Клетки дважды промывают в PBS и повторно суспендируют в 50 мкл буфера для окрашивания. Для блокирования Fc-рецепторов 1 мкл разведенного 1:100 нормального козьего IgG (BD Bioscience) добавляют

в каждую пробирку и инкубируют на льду в течение 10 минут. 1,0 мл буфера FACS добавляют в каждую пробирку, хорошо перемешивают, и клетки осаждают центрифугированием при 300g в течение 5 минут. Поверхностную экспрессию scFv TFP определяют с помощью меченного R-фикоэритрином человеческого MSLN IgG1 Fc Zenon® или изотипического контроля человеческого IgG1. 1 мкг антител добавляют в соответствующие образцы и инкубируют в течение 30 минут на льду. Затем клетки дважды промывают и окрашивают в отношении поверхностных маркеров, используя APC к CD3 (клон, UCHT1), Pacific blue против CD4 (клон RPA-T4), APCcy7 против CD8 (клон SK1) от BD® bioscience. Проточную цитометрию выполняют, используя LSRFortessa™ X20 (BD Biosciences), данные получают с помощью программного обеспечения FACSDiva® и анализируют с помощью FlowJo® (Treestar, Inc. Ашленд, штат Орегон).

Пример 5. Анализ цитотоксичности методом проточной цитометрии

[0435] Клетки-мишени, которые являются положительными или отрицательными к мезотелину или MUC16, метят флуоресцентным красителем карбоксифлуоресцеина диацетат-сукцинимидильным сложным эфиром (CFSE). Эти клетки-мишени смешивают с эффекторными Т-клетками, которые либо не трансдуцировали, либо трансдуцировали с помощью контрольных конструкций CAR-T, либо трансдуцировали с помощью TFP. По истечении указанного времени инкубации процентное содержание мертвых и живых меченных CFSE клеток-мишеней и клеток-мишеней отрицательного контроля определяют для каждой культуры эффекторных клеток/клеток-мишеней методом проточной цитометрии. Процент выживаемости клеток-мишеней в каждой положительной к Т-клеткам культуре клеток-мишеней рассчитывается по отношению к лункам, содержащим только клетки-мишени.

[0436] Цитотоксическая активность эффекторных Т-клеток измеряется путем сравнения количества выживших клеток-мишеней без эффекторных Т-клеток или с ними после совместной инкубации эффекторных клеток и клеток-мишеней методом проточной цитометрии. В экспериментах с TFP против мезотелина.MUC16 или CAR-T-клетками клетки-мишени представляют собой мезотелин- или MUC16-положительные клетки, тогда как клетки, используемые в качестве отрицательного контроля, являются мезотелин- или MUC16-отрицательными клетками.

[0437] Клетки-мишени промывают один раз и повторно суспендируют в PBS при концентрации 1×10^6 клеток/мл. Флуоресцентный краситель карбоксифлуоресцеина диацетат-сукцинимидильный сложный эфир (CFSE) (Thermo Fisher Scientific®) добавляют в клеточную суспензию в концентрации 0,03 мкМ и клетки инкубируют в течение 20 минут при комнатной температуре. Реакцию мечения останавливают путем добавления в

клеточную суспензию полной клеточной культуральной среды (RPMI®-1640 + 10% HI-FBS) в 5-кратном объеме от реакционного объема и клетки инкубируют в течение дополнительных двух минут при комнатной температуре. Клетки осаждают центрифугированием и повторно суспендируют в цитотоксичной среде (RPMI-1640 без фенолового красного (Invitrogen®) плюс 5% сыворотка АВ (Gemini Bio-products) в концентрации 2×10^5 клеток/мл. Пятьдесят микролитров суспензии меченных CFSE клеток-мишеней (эквивалент 10 000 клеток) добавляют в каждую лунку 96-луночного планшета с U-образным дном (Coming® Life Sciences).

[0438] Эффекторные Т-клетки, трансдуцированные конструкциями TFP, вместе с нетрансдуцированными Т-клетками в качестве отрицательных контролей промывают и суспендируют в концентрации 2×10^6 клеток/мл или 1×10^6 клеток/мл в цитотоксичной среде. 50 мкл суспензии эффекторных Т-клеток (эквивалент 100 000 или 50 000 клеток) добавляют к помещенным на планшете клеткам-мишеням для достижения соотношения эффекторных клеток к клеткам-мишеням равного 10 к 1 или 5 к 1, соответственно, при общем объеме 100 мкл. Культуры затем смешивают, центрифугируют и инкубируют в течение четырех часов при температуре 37°C и при 5% CO₂. Сразу же после инкубации 7AAD (7-аминоактиномицин D) (BioLegend®) добавляют к культивированным клеткам, как рекомендует производитель, и выполняют проточную цитометрию с помощью BD LSRFortessa® X-20 (BD® Biosciences). Анализ данных проточной цитометрии выполняют с использованием программного обеспечения FlowJo® (TreeStar, Inc.).

[0439] Процент выживаемости клеток-мишеней рассчитывают путем деления количества живых клеток-мишеней (CFSE+7-AAD-) в образце с эффекторными Т-клетками и клетками-мишенями на количество живых (CFSE+7-AAD-) клеток в образце исключительно с клетками-мишенями. Цитотоксичность эффекторных клеток рассчитывают как процент уничтожения клеток-мишеней = 100% – процент выживаемости клеток.

[0440] Т-клетки, трансдуцированные конструкцией анти-MSLN.MUC16 28ζ CAR или конструкцией анти-MSLN анти-MUC16 BBζ CAR, могут демонстрировать цитотоксичность в отношении мезотелин- или MUC16-экспрессирующих клеток при сравнении с Т-клетками, которые являются либо нетрансдуцированными, либо трансдуцированными с помощью контроля неспецифического к мезотелину или MUC16 CAR. Однако Т-клетки, трансдуцированные CD3ε против мезотелина и CD3ε против MUC16, могут индуцировать более эффективную цитотоксичность в отношении мишеней, чем контроль неспецифического к мезотелину CAR. TFP CD3γ против мезотелина и CD3γ против MUC16 также могут опосредовать устойчивую цитотоксичность, которая будет

больше, чем цитотоксичность, наблюдаемая для CAR против мезотелина и против MUC16 в соотношениях эффекторных клеток к клеткам-мишеням, равным от 5 до 10:1. Аналогичные результаты могут быть получены для TFP, сконструированных с альтернативной шарнирной областью. Опять таки, цитотоксичность в отношении мезотелин- или MUC16-экспрессирующих клеток-мишеней может быть больше для Т-клеток, трансдуцированных TFP CD3ε против мезотелина и CD3ε против MUC16 или CD3γ против мезотелина и CD3γ против MUC16, чем для Т-клеток, трансдуцированных CAR против мезотелина и MUC16.

[0441] Т-клетки, электропорлируемые мРНК, кодирующими TFP, специфические к мезотелину и MUC16, могут также демонстрировать устойчивую цитотоксичность в отношении мезотелин-экспрессирующих клеток. Поскольку не наблюдается значительного уничтожения мезотелин-отрицательных клеток контрольными конструкциями или конструкциями TFP против мезотелина и MUC16, мезотелин- или MUC16-специфическое уничтожение мезотелин- или MUC16-экспрессирующих клеток может наблюдаться для Т-клеток, трансдуцированных TFP CD3ε против мезотелина и против MUC16 или TFP CD3γ против мезотелина и против MUC16.

Пример 6. Определение цитотоксичности с помощью анализа цитотоксичности в режиме реального времени

[0442] TFP могут также демонстрировать превосходящую цитотоксичность по сравнению с CAR в формате анализа цитотоксичности в режиме реального времени (RTCA). Анализ RTCA измеряет электрический импеданс монослоя адгезивных клеток-мишеней в каждой лунке в специализированном 96-луночном планшете в режиме реального времени и представляет конечную регистрируемую величину как значение, называемое клеточным индексом. Изменения клеточного индекса указывают на нарушение монослоя клеток-мишеней в результате уничтожения клеток-мишеней совместно инкубируемыми Т-клеточными эффекторами. Таким образом, цитотоксичность эффекторных Т-клеток можно оценить как изменение клеточного индекса в лунках как с клетками-мишенями, так и с эффекторными Т-клетками по сравнению с клеточным индексом в лунках исключительно с клетками-мишенями.

[0443] Адгезивные клетки-мишени культивируют в DMEM, 10% FBS, 1% антибиотик-антигрибковом растворе (Life Technologies). Для подготовки RTCA 50 мкл, например, среды DMEM добавляют в соответствующие лунки Е-планшета (ACEA Biosciences®, Inc, № по каталогу: JL-10-156010-1A). Затем планшет помещают в прибор RTCA MP (ACEA Biosciences, Inc.) в соответствующее положение планшета и задают график анализа в программном обеспечении RTCA 2.0, как описано в инструкции производителя. Измерения

на исходном уровне выполняют каждые 15 минут общим количеством 100 измерений. Затем 1×10^4 клеток-мишеней в объеме 100 мкл добавляют в каждую лунку для анализа и дают клеткам осесть в течение 15 минут. Планшет возвращают в считыватель и продолжают выполнять считывания.

[0444] На следующий день эффекторные Т-клетки промывают и повторно суспендируют в цитотоксичной среде (RPMI1640 без фенолового красного (Invitrogen®) плюс 5% сыворотка АВ (Gemini Bio-products; 100-318)). Затем планшет вынимают из прибора, а эффекторные Т-клетки, суспендированные в цитотоксичной среде (RPMI®-1640 без фенолового красного + 5% сыворотка АВ), добавляют в каждую лунку в количестве 100 000 клеток или 50 000 клеток для достижения соотношения эффекторных клеток к клеткам-мишеням равного 10 к 1 или 5 к 1, соответственно. Затем планшет помещают обратно в прибор. Измерение выполняют каждые 2 минуты общим количеством 100 измерений, а затем каждые 15 минут общим количеством 1000 измерений.

[0445] В анализе RTCA уничтожение TFP-трандуцированных клеток может наблюдаться Т-клетками, трандуцированными CAR-трандуцированными Т-клетками 28ζ против мезотелина и 28ζ против MUC16 или CAR-трандуцированными конструкциями BBζ против мезотелина и BBζ против MUC16, как показано зависимым от времени снижением клеточного индекса после добавления эффекторных клеток по сравнению с отдельно клетками или клетками, совместно инкубированными с Т-клетками, трандуцированными контрольной конструкцией CAR. Однако уничтожение клеток-мишеней TFP-экспрессирующими Т-клетками может быть более сильным и более быстрым, чем наблюдаемое для CAR. Например, через 4 часа после добавления Т-клеток, трандуцированных TFP, уничтожение мезотелин- или MUC16-экспрессирующих клеток-мишеней может быть по существу закончено. Незначительное уничтожение или его отсутствие может наблюдаться для Т-клеток, трандуцированных рядом конструкций TFP, содержащих другие конструкции CD3 и TCR. Аналогичные результаты могут быть получены для TFP, сконструированных с альтернативной шарнирной областью. Цитотоксичность в отношении мезотелин-трандуцированных клеток-мишеней может быть больше для TFP-трандуцированных Т-клеток, чем для CAR-трандуцированных Т-клеток.

[0446] Цитотоксическая активность TFP-трандуцированных Т-клеток может зависеть от дозы относительно количества вируса (MOI), используемого для трансдукции. Повышенное уничтожение мезотелин-положительных клеток может наблюдаться при повышении MOI лентивируса TFP, дополнительно усиливая взаимоотношение между трансдукцией TFP и цитотоксической активностью.

Пример 7. Анализ цитотоксичности на основе люциферазы в клетках с высокой или низкой плотностью мишени

[0447] Анализ цитотоксичности на основе люциферазы оценивает цитотоксичность TFP-T-клеток путем косвенного измерения ферментной активности люциферазы в остаточных живых клетках-мишенях после совместного культивирования.

[0448] Клеточная линия опухолевых клеток человека, K562, используется в качестве линии клеток-мишеней для совместного культивирования. Клетки K562, не экспрессирующие мишени («DN»), экспрессирующие MSLN («MSLN+»), MUC16 («MUC16+») или как MSLN, так и MUC16 («DP»), были получены путем трансдукции лентивирусом, кодирующим человеческий эктодомен MSLN, человеческий эктодомен MUC16, или последовательно двумя вирусами. Клетки-мишени, стабильно экспрессирующие желаемые антигены-мишени, были выбраны путем применения антибиотиков, соответствующих гену сопротивления, кодируемому лентивирусом. Клетки-мишени были дополнительно модифицированы для сверхэкспрессии люциферазы светлячка путем трансдукции люциферазой светлячка, кодирующей лентивирус, с последующим выбором антибиотика для получения стабильной клеточной линии.

[0449] В типичном анализе цитотоксичности клетки-мишени высевают в количестве 5000 клеток на лунку на 96-луночный планшет. TFP-T-клетки или контрольные клетки добавляли к клеткам-мишеням в диапазоне соотношений эффекторных клеток к клеткам-мишеням. Затем смесь клеток культивировали в течение 24 или 48 часов при температуре 37°C с 5 % CO₂ перед измерением ферментной активности люциферазы в живых клетках-мишенях с помощью системы Bright-Glo® Luciferase Assay System (Promega®, номер по каталогу E2610). Клетки центрифугировали в осадок и повторно суспендировали в среде, содержащей субстрат люциферазы. Затем рассчитывали процент уничтожения опухолевых клеток в соответствии со следующей формулой: % цитотоксичности = 100% x [1 – OSE (опухолевые клетки + T-клетки) / OSE (опухолевые клетки)].

Пример 8. Активация, измеренная с помощью повышенной регуляции CD69 или CD25 на T-клетках

[0450] Активацию T-клеток, экспрессирующих конструкции CAR и TFP, выполняют с применением MSLN+ или MUC16+ и MSLN- или MUC16- клеток. Как было описано выше, активированные PBMC трансдуцируют с помощью 50 MOI LV в течение двух дней подряд и размножают. На 8 день после трансдукции совместные культуры PBMC помещают с клетками-мишенями в соотношении 1:1 E к T (0,2 x 10⁶ каждого типа клеток) в цитотоксичной среде (RPMI1640 без фенолового красного (Invitrogen®) плюс 5% сыворотка АВ (Gemini Bio-products; 100-318). Клетки, сверхэкспрессирующие ВСМА,

можно использовать в качестве отрицательных контролей. Через 24 часа после начала совместного культивирования клетки собирают, трижды промывают в PBS и окрашивают с помощью Live/Dead Aqua в течение 30 минут на льду. Для блокирования Fc-рецепторов добавляют человеческий Fc-блок (BD) и инкубируют в течение 10 минут при комнатной температуре. Клетки впоследствии окрашивают с помощью APC против CD3 (клон, UCHT1), APCcy7 против CD8 (клон SK1), Alexa Fluor® 700 против CD69 (клон FN50) от BD® Biosciences и PE против CD25 (клон BC96, eBioscience®). Клетки дважды промывают и анализируют с помощью BD LSRII-Fortessa®. Данные анализируют, как описано выше, используя программное обеспечение для анализа FlowJo® (Tree star, Inc).

[0451] Аналогичный эксперимент можно провести с применением MSLN- или MUC16-клеток и MSLN+ или MUC16+ клеток в нетрансдуцированных Т-клетках либо Т-клетках, трансдуцированных положительными контрольными связующими антителами.

[0452] Активацию Т-клеток можно оценивать аналогичным образом путем анализа выработки гранзима В. Т-клетки культивируют и размножают, как описано выше, а внутриклеточное окрашивание гранзима В выполняют в соответствии с инструкциями к набору производителя (Gemini Bio-products; 100-318). Клетки собирают, трижды промывают в PBS и блокируют с помощью человеческого Fc-блока в течение 10 минут. Клетки окрашивают в отношении поверхностных антигенов с помощью APC против CD3 (клон UCHT1) и APCcy7 против CD8 (клон SK1) в течение 30 минут при температуре 4°C. Затем клетки фиксируют с помощью раствора для фиксации/пермеабилзации (набор BD Cytotfix/Cytoperm® Fixation/Permeabilization kit, № по кат. 554714) в течение 20 минут при температуре 4°C с последующим промыванием в буфере BD Perm/Wash®. Клетки впоследствии окрашивают с помощью Alexafluor700® против гранзима В (клон GB11), дважды промывают в буфере BD Perm/Wash и повторно суспендируют в буфере FACS. Данные получают с помощью BD LSRII-Fortessa® и анализируют с использованием FlowJo® (Tree star Inc.).

Пример 9. Сравнительное количественное определение секреции цитокинов с помощью ИФА

[0453] Другим измерением активации и пролиферации эффекторных Т-клеток, связанных с распознаванием клеток, несущих распознаваемый антиген, является выработка эффекторных цитокинов, таких как интерлейкин-2 (IL-2) и интерферон-гамма (ИНФ-γ).

[0454] гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) и фактор некроза опухоли альфа (ФНО-α).

[0455] Мишень-специфическую выработку цитокинов, включая IL-2, ИНФ-γ, ГМ-КСФ и ФНО-α, моноспецифическими TFP-Т-клетками и двойными специфическими TFP-Т-

клетками измеряли в надосадочных жидкостях, собранных через 48 часов после совместного культивирования Т-клеток с различными клетками-мишенями на основе K562, используя анализы U-PLEX® Biomarker Group I (hu) Assays (Meso Scale Diagnostics®, LLC, номер по каталогу: K15067L-4).

[0456] По отношению к нетрансдуцированным или контрольным CAR-трансдуцированным Т-клеткам Т-клетки, трансдуцированные с помощью TFR, продуцируют более высокие уровни IL-2 и ИНФ- γ при совместном культивировании с клетками, которые эндогенно экспрессируют мезотелин или MUC16, либо мезотелин- или MUC16-трансдуцированными клетками. Напротив, совместное культивирование с мезотелин- или MUC16-отрицательными клетками или нетрансдуцированными клетками может привести к незначительному высвобождению или отсутствию высвобождения цитокинов из TFR-трансдуцированных Т-клеток. В соответствии с предыдущими данными цитотоксичности TFR, сконструированные с альтернативной шарнирной областью, могут давать аналогичные результаты при совместном культивировании с несущими мезотелин или MUC16 клетками-мишенями.

Пример 10. Получение и идентификация нанотел, специфичных к человеческому пептиду MUC16

Материалы и способы

Трансформация, реклонирование и экспрессия V_{HH} с применением человеческого пептида MUC16

NF SPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTOLQNFTLDRS S VLVDGYSPNRNEPLTGNSDLP
(SEO ID NO 92)

[0457] Трансформация несупрессорных штаммов (например, WK6) рекомбинантным pMECS GG

[0458] Ген нанотела, клонированный в вектор pMECS GG, содержит сигнальную последовательность PelB на N-конце, а также метку HA и метку His₆ на C-конце (лидер PelB – нанотело – HA – His₆). Лидерная последовательность PelB направляет нанотело в периплазматическое пространство *E.coli*, а метки HA и His₆ можно использовать для очистки и обнаружения нанотела (например, в ИФА, вестерн-блоттинге и т. д.).

[0459] В векторе pMECS GG за меткой His₆ следует янтарный стоп-кодон (TAG), за которым следует ген III фага M13. В супрессорных штаммах *E.coli* (например, TG1) янтарный стоп-кодон считывается как глутамин, поэтому нанотело экспрессируется как гибридный белок с белком III фага, что допускает отображение нанотела на оболочке фага для пэннинга. В несупрессорных штаммах *E.coli* (например, WK6) янтарный стоп-кодон считывается как стоп-кодон, поэтому полученное нанотело не сливается с белком III.

[0460] Для экспрессии и очистки нанотел, клонированных в вектор pMECS GG, получают векторы pMECS GG, содержащие ген представляющего интерес нанотела, и используют их для трансформации несупрессорного штамма (например, WK6) с помощью этой плазмиды. Нанотело полученного клона секвенируют с применением праймера MP057 (5'-TTATGCTTCCGGCTCGTATG-3' (SEQ ID NO:99)) для подтверждения идентичности клона. Повторный анализ антигенсвязывающей способности выполняют с помощью ИФА или любого другого соответствующего анализа. Несупрессорный штамм (например, WK6), содержащий рекомбинантный вектор pMECS GG с геном нанотела, можно использовать для экспрессии и очистки нанотела. *Реклонирование генов нанотел из вектора pMECS GG в вектор pHEN6c* Последовательности праймеров:

[0461] – Праймер A6E (5' GAT GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGR GGA GG 3') (SEQ ID NO: 94).

[0462] – Праймер PMCF (5' CTA GTG CGG CCG CTG AGG AGA CGG TGA CCT GGG T 3') (SEQ ID NO:95).

[0463] – Универсальный обратный праймер (5' TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C 3') (SEQ ID NO: 96).

[0464] – Универсальный прямой праймер (5 CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC 3') (SEQ ID NO: 97).

[0465] Ген нанотела амплифицируют с помощью ПЦР, используя содержащий *E. coli* рекомбинантный вектор pMECS GG, несущий ген нанотела, в качестве матрицы, а также праймеры A6E и PMCF (около 30 циклов ПЦР, каждый цикл состоит из 30 секунд при температуре 94°C, 30 секунд при температуре 55°C и 45 секунд при температуре 72°C, с последующим 10-минутным продлением при температуре 72°C в конце ПЦР). Амплифицируют фрагмент размером около 400 пар оснований. Продукт ПЦР затем очищают (например, с помощью набора для ПЦР-очистки QiaQuick® от Qiagen®) и расщепляют в течение ночи с помощью PstI.

[0466] Продукт ПЦР очищают и расщепляют с помощью BstEII в течение ночи (или с помощью Eco91I от Fermentas Life Sciences®). Продукт ПЦР очищают, как описано выше, и вектор pHEN6c расщепляют с помощью PstI в течение 3 часов; расщепленный вектор очищают, как описано выше, а затем расщепляют с помощью BstEII в течение от 2 до 3 часов. Расщепленный вектор прогоняют на 1% агарозном геле, полосу вектора вырезают из геля и очищают (например, с помощью набора для экстракции из геля QIAQuick от Qiagen). Продукт ПЦР и вектор лигируют. Электрокомпетентные клетки WK6 трансформируют в реакции лигирования. Трансформанты выбирают с использованием планшетов с LB/агаром/ампициллином (100 мкг/мл)/глюкозой (1–2%).

Экспрессия и очистка нанотел:

[0467] Свежетрансформированную колонию WK6 используют для инокуляции 10–20 мл LB + ампициллина (100 мкг/мл) + глюкозы (1%) и инкубируют при температуре 37°C в течение ночи при встряхивании со скоростью 200–250 об./мин. 1 мл этой предварительной культуры добавляют к 330 мл среды TB, дополненной 100 мкг/мл ампициллина, 2 mM MgCl₂ и 0,1% глюкозой, и выращивают при температуре 37°C при встряхивании (200–250 об./мин.) до достижения ОП₆₀₀, равной 0,6–0,9. Экспрессию нанотел индуцируют добавлением IPTG до конечной концентрации 1 mM и культуру инкубируют при температуре 28°C при встряхивании в течение ночи (около 16–18 часов; ОП₆₀₀ после индукции в течение ночи в идеале должна составлять от 25 до 30).

[0468] Культуру центрифугируют в течение 8 минут со скоростью 8000 об./мин., а осадок повторно суспендируют из 1 литра культуры в 12 мл TES (Sigma-Aldrich®) и встряхивают в течение 1 часа на льду. На каждые использованные 12 мл TES добавляют 18 мл TES/4 и дополнительно инкубируют на льду в течение еще одного часа (при встряхивании), а затем центрифугируют в течение 30 мин. со скоростью 8000 об./мин. при температуре 4°C. Надосадочная жидкость содержит белки, экстрагированные из периплазматического пространства.

Очистка с помощью IMAC

[0469] Выбранный His уравнивают с помощью PBS: на периплазматический экстракт, полученный из 1 литра культуры, добавляют 1 мл смолы (около 2 мл на раствор выбранного His) в пробирку типа Falcon объемом 50 мл, добавляют PBS до конечного объема 50 мл и смешивают, а затем центрифугируют со скоростью 2000 об./мин. в течение 2 мин. и сливают надосадочную жидкость. Смолу дважды промывают в PBS, а затем добавляют периплазматический экстракт и инкубируют в течение от 30 минут до 1 часа при комнатной температуре с аккуратным встряхиванием (более длительная инкубация может привести к неспецифическому связыванию).

[0470] Образец загружают на колонку PD-10 с фильтром на дне (GE healthcare, № по кат. 17-0435-01) и промывают в 50–100 мл PBS (50–100 мл PBS на 1 мл используемой смолы). Элюирование выполняют 3 раза, каждый раз с использованием 1 мл PBS/0,5 M имидазола на 1 мл используемой смолы, и объединенный элюент диализуют в течение ночи при 4°C в присутствии PBS (граничное значение 3500 Дальтон) для удаления имидазола.

[0471] В данной точке количество белка можно оценить путем измерения ОП₂₈₀ элюированного образца. Коэффициент экстинкции каждого клона можно определить с помощью инструмента ProtParam при анализе первичной структуры на протеомическом сервере ExPASy. Дополнительная очистка нанотел достигается различными способами.

Например, образец могут концентрировать (Vivaspin® граничное значение MM 5000, Vivascience®) центрифугированием со скоростью 2000 об./мин. при температуре 4°C до получения соответствующего объема для загрузки в колонку Superdex® 75 16/60 (макс. 4 мл). Концентрированный образец затем загружают в колонку Superdex 75 16/60, уравновешенную с помощью PBS. Пиковые фракции объединяют, а образец измеряют при ОП₂₈₀ для количественной оценки. Аликвоты хранят при температуре -20°C в концентрации около 1 мг/мл.

Иммунизация

[0472] Ламе подкожно вводили в дни 0, 7, 14, 21, 28 и 35 человеческий пептид MUC16 (hM UC16), конъюгированный с KLH (NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSS VLVDGYSPNRNEPLTGNSDLP-C-KLH) (SEQ ID NO:93), и/или человеческий пептид MUC16, биотинилированный на C-конце (NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLP-C-биотин), и/или человеческий пептид MUC16, биотинилированный на N-конце (биотин- NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRS SVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLP. Перед введением биотинилированные пептиды смешивали с нейтральным авидином. В качестве адъюванта использовали адъювант GERBU P (GERBU Biotechnik GmbH. В день 40 у ламы собирали около 100 мл антикоагулированной крови для получения лимфоцитов.

Создание библиотеки VHH

[0473] Библиотеку VHH создавали из лимфоцитов ламы для скрининга на предмет присутствия антигенспецифических нанотел. С этой целью общую РНК из лимфоцитов периферической крови использовали в качестве матрицы для синтеза первой цепи кДНК с помощью праймера олиго(dT). Используя эту кДНК, кодирующие VHH последовательности амплифицировали с помощью ПЦР, расщепляли с помощью SAPI и клонировали в сайты SAPI фагмидного вектора pMECS-GG. Полученную таким образом библиотеку VHH назвали Core 93GG. Библиотека состояла из около 10⁸ независимых трансформантов, при этом около 87% трансформантов несли вектор с правильным размером вставки.

Выделение нанотел, специфических к человеческому пептиду MUC16

[0474] Библиотеку Core 93GG сортировали методом пэннинга на пептиде hMUC16 NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRS SVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLP (SEQ ID NO:92), биотинилированном на C- или N-конце (био-hMUC16), в течение 4 раундов. Био-hMUC16 пептид оставляли взаимодействовать с покрытыми стрептавидином планшетами, после чего на планшет добавляли фаги из библиотеки. Обогащение антигенспецифических фагов оценивали после каждого раунда пэннинга путем сравнения

количества фагмидных частиц, элюированных из покрытых антигеном лунок, с количеством фагмидных частиц, элюированных из лунок с отрицательным контролем (покрытых стрептавидином и заблокированных, но не содержащих пептид). Эти эксперименты позволили предположить, что популяция фагов была обогащена антигенспецифическими фагами приблизительно в 2 раза после 2-го раунда. После 1-го, 3-го и 4-го раундов обогащения не наблюдалось. В целом, 380 колоний (190 из раунда 3, 190 из раунда 4) были случайным образом выбраны и проанализированы с помощью ИФА на предмет присутствия антигенспецифических нанотел в их периплазматических экстрактах (ИФА с применением неочищенных периплазматических экстрактов, включая растворимые нанотела). Пептиды, которые использовались для скрининга ИФА, были такими же, как те, которые использовались для пэннинга, с применением заблокированных, покрытых стрептавидином лунок без пептида в качестве отрицательного контроля. В ходе анализа 34 колонии из этих 380 колоний были определены как положительные. Исходя из данных секвенирования положительных колоний, распознали 6 разных полноразмерных нанотел, принадлежащих к 2 разным группам CDR3 (линии В-клеток) (см. файл Excel). Нанотела, принадлежащие к одной и той же группе CDR3 (одна и та же линия В-клеток), являются очень похожими, а их аминокислотные последовательности позволяют предположить, что они происходят из клонально связанных В-клеток, возникших в результате соматической гипермутации, или из одной и той же В-клетки, но диверсифицированной вследствие ошибки ОТ и/или ПЦР при создании библиотеки. Нанотела, принадлежащие к одной и той же группе CDR3, распознают один и тот же эпитоп, однако их другие характеристики (например, аффинность, активность, стабильность, выход экспрессии и т. д.) могут отличаться. Клоны, полученные из таких пэннингов, несут в своем названии следующий код: MU.

Анализ методом проточной цитометрии нанотел, специфических к пептиду hMUC16

Нанотела и клетки

[0475] Периплазматические экстракты были получены для каждого нанотела к пептиду hMUC16 таким же образом, как это было сделано при первоначальном скрининге ИФА, описанном выше. Клетки из каждой клеточной линии (SKOV3 Muc16 Luc, OVCAR 3 Muc16 Luc, Expi-293 и Jurkat) размораживали, промывали и считали. Периплазматический экстракт из каждого клона нанотела инкубировали вместе с около 2×10^5 клеток. После промывания клетки инкубировали со смесью мышинового антитела против метки HA и антимышиного PE. После еще одного промывания к каждому образцу добавляли To-pro® (Thermo Fisher Scientific®) в качестве красителя живых/мертвых клеток и клетки анализировали на проточном цитометре. В качестве положительного контроля Mab

человеческое антитело к Muc16-4h11 (+ анти-человеческий IgG-PE + To-pro) использовали на клетках SKOV3 Muc16 Luc и OVCAR 3 Muc16 Luc. В качестве отрицательных контролей для каждой клеточной линии мы использовали: образец с нерелевантным нанотелом (BCP10 — бактериальное, специфичное к β -лактамазе), образец со всеми Mab обнаружения, образец только с вторичным антимышиным Mab PE и образец только с клетками (с To-pro и без него).

Пример 11. Обнаружение специфического к MSLN и MUC16 TFP на основе проточной цитометрии в человеческой линии Т-клеток Jurkat

[0476] Экспрессию TFP с двойной специфичностью к MSLN и MUC16 оценивали сначала в человеческой линии Т-клеток Jurkat, используя проточную цитометрию. Препараты лентивируса, кодирующего специфический к MSLN TFP, специфический к MUC16 TFP или TFP с двойной специфичностью (MSLN TFP и MUC16 TFP в одном лентивирусном векторе, связанном последовательностью T2A) использовали для трансдукции клеток Jurkat.

[0477] Через 48 часов после лентивирусной трансдукции трансдуцированные клетки Jurkat и нетрансдуцированные (NT) контрольные клетки собирали и анализировали на предмет поверхностной экспрессии специфических к MSLN и MUC16 TFP. Специфические к MSLN TFP обнаруживали с помощью Fc MSLN, человеческого белка мезотелина/MSLN (296-580) с меткой Fc (AcroBiosystems, номер по каталогу: MSN-H526x). Белок метили с помощью набора для мечения Zenon™ Allophycocyanin Human IgG Labelling Kit (ThermoFisher Scientific, номер по каталогу: Z25451) и использовали для окрашивания в концентрации 1 мкг/образец.

[0478] Специфические к MUC16 TFP обнаруживали с помощью пептида aMUC16-биотин (UniProtKB: Q8WXI7, aa 14319-14438, синтезированного в New England Peptide) с последующим применением стрептавидина-PE (BD Bioscience, номер по каталогу: 554061). Пептид MUC16 использовали в концентрации 40 пикомоль на образец. Все клетки Jurkat (NT, MSLN TFP, MUC16 TFP, TFP с двойной специфичностью) сначала одновременно окрашивали меченым Fc_MSLN и MUC16-биотином, а затем окрашивали стрептавидином-PE.

[0479] Экспрессию специфического к MSLN TFP, но не MUC16 TFP, определяли на клетках Jurkat, трансдуцированных лентивирусом, кодирующим MSLN TFP (Фиг. 3B). В дополнение MUC16 TFP, но не MSLN TFP, определяли на клетках Jurkat, трансдуцированных лентивирусом, кодирующим MUC16 TFP (Фиг. 3C). Для клеток Jurkat, трансдуцированных лентивирусом, кодирующим TFP с двойной специфичностью, обнаруживали как MSLN TFP, так и MUC16 TFP на поверхности одной и той же популяции трансдуцированных клеток Jurkat (Фиг. 3D). Для клеток Jurkat NT не было обнаружено ни

MSLN TFP, ни MUC16 TFP (Фиг. 3А).

Пример 13. Мишень-специфическая выработка цитокинов клетками Jurkat с двойными специфическими TFP

[0480] Мишень-специфическую выработку цитокинов клетками Jurkat с моноспецифическими TFP и клетками Jurkat с двойными специфическими TFP измеряли в надосадочных жидкостях, собранных через 24 часа после совместного культивирования клеток Jurkat с различными клетками-мишенями на основе K562, не экспрессирующими мишень («DN»), экспрессирующими MSLN («MSLN+»), MUC16 («MUC16+») или как MSLN, так и MUC16 («DP»). Уровень человеческого IL-2 в надосадочных жидкостях анализировали с использованием технологии Meso Scale Discovery (MesoScale Diagnostic, LLC) с анализами U-PLEX Biomarker Group I (hu) Assays (номер по каталогу: K15067L-4).

[0481] Клетки Jurkat NT не вырабатывали обнаруживаемых уровней IL-2 при совместном культивировании с любыми опухолевыми клетками-мишенями, независимо от целевой экспрессии (Фиг. 4). Клетки Jurkat с моноспецифическими TFP вырабатывали IL-2 только при совместном культивировании с клетками-мишенями, экспрессирующими соответствующие мишени (т. е. клетки Jurkat с MSLN TFP, совместно культивируемые с MSLN-экспрессирующими или сверхэкспрессирующими клетками K562, и клетки Jurkat с MUC16 TFP, совместно культивируемые с MUC16-экспрессирующими или сверхэкспрессирующими клетками K562). Клетки Jurkat с MSLN TFP вырабатывали IL-2 при совместном культивировании с MSLN+ клетками-мишенями или клетками-мишенями DP, но не с клетками-мишенями DN или MUC16+ клетками-мишенями. Клетки Jurkat с MUC16 TFP вырабатывали IL-2 при совместном культивировании с MUC16+ клетками-мишенями или клетками-мишенями DP, но не с клетками-мишенями DN или MSLN+ клетками-мишенями. Клетки Jurkat с двойными специфическими TFP вырабатывали IL-2 в ответ на клетки-мишени, экспрессирующие любую из мишеней, только MSLN (MSLN+), только MUC16 (MUC16+) или обе мишени (DP), демонстрируя более широкую реактивность, чем оба вида клеток Jurkat с моноспецифическими TFP (Фиг. 4). Отсутствие выработки IL-2 при совместном культивировании с клетками-мишенями, не экспрессирующими мишень (DN), подтвердило специфичность двойного специфического TFP.

Пример 14. Обнаружение TFP с двойной специфичностью к MSLN и MUC16 на основе проточной цитометрии в первичных Т-клетках человека

[0482] Т-клетки NT, MSLN TFP, MUC16 TFP и с двойным специфическим TFP были получены из первичных человеческих Т-клеток здорового донора путем трансдукции лентивирусом, кодирующим моноспецифические или двойные специфические TFP. Т-

клетки очищали из PBMC здорового донора и активировали в день 0 с помощью MACS GMP T Cell TransAct® (Miltenyi® Biotech, номер по каталогу: 130-019-011) в присутствии человеческого IL-7, наивысшая степень чистоты (Miltenyi Biotech, номер по каталогу: 130-095-364), и человеческого IL-15, наивысшая степень чистоты (Miltenyi Biotech, номер по каталогу: 130-095-766). В день 1 активированные Т-клетки трансдуцировали лентивирусом и клетки размножали в течение 10 дней путем дополнения свежей средой каждые 2 дня.

[0483] В день 10 Т-клетки собирали и окрашивали с помощью проточной цитометрии с применением Fc MSLN и пептида MUC16-биотин, как описано выше, для определения поверхностной экспрессии моносpezifических или двойных специфических TFP. Кроличье антиверблюжье антитело VHH MonoRab® [iFluor488] (GenScript®, номер по каталогу: A01862) использовали в дополнение к лигандам для обнаружения TFP.

[0484] Аналогично результатам, полученным для анализов с применением клеток Jurkat, экспрессию специфических к MSLN TFP (Фиг. 5C), но не MUC16 TFP (Фиг. 5D), определяли для Т-клеток MSLN TFP; в дополнение MUC16 TFP (Фиг. 5F), но не MSLN TFP (Фиг. 5E), определяли для Т-клеток MUC16 TFP. Для Т-клеток TFP с двойной специфичностью на поверхности трансдуцированных клеток были обнаружены как MSLN TFP, так и MUC16 TFP (фиг. 5G и 5H). Для Т-клеток NT не было обнаружено ни MSLN TFP, ни MUC16 TFP (фиг. 5A и 5B).

Пример 15. Мишень-специфическое уничтожение опухолевых клеток Т-клетками с двойными специфическими TFP

[0485] Мишень-специфическое уничтожение опухолевых клеток Т-клетками с моносpezifическими или двойными специфическими TFP оценивали с использованием анализа цитотоксичности *in vitro*, используя первичные Т-клетки человека, полученные в соответствии с примером 14. Линии опухолевых клеток, не экспрессирующих мишень (DN), экспрессирующих MSLN (MSLN+), MUC16 (MUC16+) или как MSLN, так и MUC16 (DP) (как описано в примере 13), стабильно трансдуцировали для экспрессии люциферазы светлячка в качестве репортера. Через 48 часов совместного культивирования с NT- или TFP-Т-клетками активность люциферазы совместно культивируемых клеток определяли с помощью системы для анализа люциферазы Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega®, номер по каталогу E2610) в качестве маркера для жизнеспособных опухолевых клеток. Затем рассчитывали процент уничтожения опухолевых клеток в соответствии со следующей формулой: % цитотоксичности = $100\% \times [1 - \text{ОСЕ (опухолевые клетки + Т-клетки)} / \text{ОСЕ (опухолевые клетки)}]$.

[0486] Как и ожидалось, NT-Т-клетки не продемонстрировали обнаруживаемого уничтожения в отношении каких-либо клеток-мишеней (Фиг. 6). Т-клетки с

моноспецифическим TFP уничтожали только клетки-мишени, экспрессирующие соответствующие мишени. Т-клетки с MSLN TFP в значительной степени уничтожали MSLN+ клетки-мишени или клетки-мишени DP, но не клетки-мишени DN или MUC16+ клетки-мишени. Т-клетки с MUC16 TFP полностью уничтожали MUC16+ клетки-мишени или клетки-мишени DP, но не клетки-мишени DN или MSLN+ клетки-мишени. Т-клетки с двойными специфическими TFP в значительной степени уничтожали клетки-мишени, экспрессирующие любую из мишеней, только MSLN (MSLN+), только MUC16 (MUC16+) или обе мишени (DP), демонстрируя более широкий диапазон реактивности, чем оба вида Т-клеток с моноспецифическими TFP (Фиг. 6). Отсутствие уничтожения в отношении клеток-мишеней, не экспрессирующих мишень (DN), подтвердило специфичность Т-клеток с двойным специфичным TFP.

Пример 17. Мишень-специфическая выработка цитокинов Т-клетками с двойными специфическими TFP

[0487] Первичные Т-клетки человека были получены и трансдуцированы с помощью способов, описанных в предыдущих примерах. Мишень-специфическую выработку цитокинов, включая ИНФ- γ , ГМ-КСФ и ФНО- α , моноспецифическими TFP-Т-клетками и двойными специфическими TFP-Т-клетками измеряли в надосадочных жидкостях, собранных через 48 часов после совместного культивирования Т-клеток с различными клетками-мишенями на основе K562, используя анализы U-PLEX® Biomarker Group I (hu) Assays (Meso Scale Diagnostics®, LLC, номер по каталогу: K15067L-4).

[0488] Все TFP-Т-клетки вырабатывали значительные количества ИНФ- γ при совместном культивировании с опухолевыми клетками, экспрессирующими соответствующие мишени (Фиг. 7А). В соответствии с отсутствием уничтожения в отношении опухолевых клеток с экспрессией несоответствующих мишеней и их специфичностью выработка цитокинов не наблюдалась для Т-клеток с MSLN TFP, культивируемых с MUC16+ клетками-мишенями, или для Т-клеток с MUC16 TFP, культивируемых с MSLN+ клетками-мишенями. Было обнаружено, что Т-клетки с двойными специфическими TFP, напротив, обладают более широкой реактивностью, чем любой из видов Т-клеток с моноспецифическими TFP, со значительной выработкой ИНФ- γ , наблюдаемой после совместного культивирования с MSLN+, MUC16+ или DP клетками-мишенями (Фиг. 7А).

[0489] Заметная выработка ГМ-КСФ (Фиг. 7В) и ФНО- α (Фиг. 7С) наблюдалась для Т-клеток с моноспецифическим TFP и Т-клеток с двойным специфическим TFP с аналогичным паттерном реактивности в отношении опухолевых клеток. Т-клетки MSLN TFP и MUC16 TFP вырабатывали цитокины только при совместном культивировании с опухолевыми клетками, соответствующими мишени, но не с клетками, не

соответствующими мишени. Т-клетки с двойным специфическим TFP отвечали на клетки-мишени, экспрессирующие одну или обе мишени.

Пример 18. Клинические исследования

[0490] Пациенты с неоперабельным раком яичника с рецидивирующим или рефрактерным заболеванием будут включены в клинические исследования Т-клеток, экспрессирующих MSLN-MUC16-TFP. В первоначальном исследовании будет изучаться профиль безопасности Т-клеток, экспрессирующих MSLN-MUC16-TFP, и будут изучаться клеточные кинетические и фармакодинамические результаты. Эти результаты повлияют на выбор дозировок для дополнительных исследований, которые затем будут вводиться большей когорте пациентов с неоперабельным раком яичника для определения профиля эффективности Т-клеток, экспрессирующих MSLN-MUC16-TFP.

Пример 19. Воздействие CD107a методом проточной цитометрии

[0491] Дополнительным анализом активации Т-клеток является поверхностная экспрессия CD107a, лизосомального мембранного белка (LAMP-1), который расположен в мембране цитоплазматических цитолитических гранул в клетках, находящихся в состоянии покоя. Дегрануляция эффекторных Т-клеток, что является предпосылкой для цитолитической активности, приводит к мобилизации CD107a к клеточной поверхности после индуцированного активацией экзоцитоза гранул. Таким образом, воздействие CD107a обеспечивает дополнительное измерение активации Т-клеток, помимо выработки цитокинов, что тесно коррелирует с цитотоксичностью.

[0492] Клетки-мишени и эффекторные клетки отдельно промывают и повторно суспендируют в цитотоксичной среде (RPMI + 5% человеческая сыворотка АВ + 1% противогрибковый раствор с антибиотиком). Анализ выполняют путем объединения 2×10^5 эффекторных клеток с 2×10^5 клеток-мишеней в 100 мкл конечного объема в 96-луночных планшетах с U-образным дном (Corning) в присутствии 0,5 мкл/лунку меченного PE/Cy7 антитела к человеческому CD107a (LAMP-1) (клон H4A3, BD® Biosciences). Затем культуры инкубируют в течение одного часа при температуре 37°C и 5% CO₂. Сразу же после этой инкубации 10 мкл разведения 1:10 ингибитора секреции монензина (1000x раствор, BD GolgiStop™) осторожно добавляют в каждую лунку, не взболтав клетки. Затем планшеты инкубируют в течение дополнительных 2,5 часов при температуре 37°C и 5% CO₂. После этой инкубации клетки окрашивают с помощью антитела к человеческому CD3 APC (клон UCST1, BD Biosciences), антитела к человеческому CD8 PerCP/Cy5.5 (клон SK1, BD Biosciences) и антитела к человеческому CD4 Pacific Blue (клон RPA-T4, BD Biosciences), а затем инкубируют в течение 30 минут при температуре 37°C и 5% CO₂. Затем клетки промывают 2 раза в буфере FACS (и повторно суспендируют в 100 мкл буфера FACS

и 100 мкл фиксирующего буфера IC перед выполнением анализа.

[0493] Воздействие CD107a на поверхность Т-клеток определяют методом проточной цитометрии. Проточную цитометрию выполняют с помощью LSRFortessa[®] X20 (BD Biosciences), а анализ данных проточной цитометрии осуществляют с помощью программного обеспечения FlowJo[®] (Treestar, Inc. Ашленд, штат Орегон). Процентное содержание CD8⁺ эффекторных клеток в пределах гейта CD3, которые являются CD107-положительными, определяют для каждой культуры эффекторных клеток/клеток-мишеней.

[0494] В соответствии с предыдущими данными цитотоксичности и данными для цитокинов совместное культивирование клеток-мишеней, экспрессирующих ассоциированный с опухолью антиген, с эффекторными Т-клетками, трансдуцированными с помощью CAR 28 ζ против ассоциированного с опухолью антигена, может индуцировать повышение поверхностной экспрессии CD107a по отношению к эффекторам, инкубированным с клетками-мишенями, отрицательными на ассоциированный с опухолью антиген. Для сравнения при тех же условиях TFP-экспрессирующие эффекторы ДЛ CD3 ϵ против ассоциированного с опухолью антигена или ДЛ CD3 γ против ассоциированного с опухолью антигена могут демонстрировать от 5- до 7-кратной индукции экспрессии CD107a. TFP против ассоциированного с опухолью антигена, сконструированные с альтернативной шарнирной областью, могут давать аналогичные результаты при совместном культивировании с несущими ассоциированный с опухолью антиген клетками-мишенями.

Пример 20. Исследования эффективности *in vivo* на мышах

[0495] Чтобы оценить способность эффекторных Т-клеток, трансдуцированных с помощью TFP против ассоциированного с опухолью антигена, достигать противоопухолевых ответов *in vivo*, эффекторные Т-клетки, трансдуцированные CAR 28 ζ против ассоциированного с опухолью антигена, TFP CD3 ϵ против ассоциированного с опухолью антигена или TFP CD3 γ против ассоциированного с опухолью антигена, адоптивно переносят мышам NOD/SCID/IL-2R $\gamma^{-/-}$ (NSG-JAX), которых ранее инокулировали линиями раковых клеток человека, положительных на ассоциированный с опухолью антиген.

[0496] Самок мышей NOD/SCID/IL-2R $\gamma^{-/-}$ (NSG-JAX), возраст которых перед началом исследования составляет по меньшей мере 6 недель, получают у The Jackson Laboratory (исходный номер 005557) и акклиматизируют в течение 3 дней перед использованием в исследовании. Линии клеток человека, экспрессирующих ассоциированный с опухолью антиген, для инокулирования выдерживают в культуре в log-фазе, прежде чем они будут собраны и подсчитаны с помощью трипанового синего для определения количества жизнеспособных клеток. В день испытания с опухолью клетки центрифугируют при 300g в

течение 5 минут и повторно суспендируют в предварительно нагретом стерильном PBS при концентрации клеток $0,5-1 \times 10^6$ клеток/100 мкл. Для адоптивного переноса готовят Т-клетки, нетрансдуцированные либо трансдуцированные конструкциями CAR 28 ζ против ассоциированного с опухолью антигена, TFP CD3 ϵ против ассоциированного с опухолью антигена или TFP против CD3 γ . В день 0 исследования 10 животным на экспериментальную группу внутривенно вводят $0,5-1 \times 10^6$ клеток, экспрессирующих ассоциированный с опухолью антиген. Через 3 дня каждому животному внутривенно переносят 5×10^6 популяций эффекторных Т-клеток в 100 мкл стерильного PBS. Подробные клинические наблюдения на животных ежедневно регистрируются до момента эвтаназии. Массу тела измеряют у всех животных еженедельно до момента смерти или эвтаназии. Эвтаназию всех животных проводят через 35 дней после адоптивного переноса исследуемого и контрольного препаратов. Всех животных, у которых наблюдается агония в ходе исследования, умерщвляют по усмотрению руководителя исследования после консультации с ветеринаром.

[0497] По сравнению с нетрансдуцированными Т-клетками адоптивный перенос Т-клеток, трансдуцированных CAR 28 ζ против ассоциированного с опухолью антигена, TFP CD3 ϵ против ассоциированного с опухолью антигена или TFP CD3 γ против ассоциированного с опухолью антигена, может повысить выживаемость мышей, несущих линию мезотелин-экспрессирующих опухолевых клеток, и может указывать на то, что Т-клетки, трансдуцированные конструкциями CAR и TFP против ассоциированного с опухолью антигена, способны опосредовать уничтожение клеток-мишеней, соответствующим образом повышая выживаемость в этих мышинных моделях. В совокупности эти данные могут указывать на то, что TFP являются альтернативной платформой для создания химерных рецепторов, которые демонстрируют лучшее антиген-специфическое уничтожение по сравнению с CAR первого поколения как *in vitro*, так и *in vivo*.

Таблица 2 — Примеры последовательностей

SEQ ID NO.	Наименование	Последовательность
1.	Линкер (G ₄ S) ₃	GGGGS GGGGS GGGGS LE
2.	Линкер (G ₄ S) ₄	GGGSGGGGS GGGGS GGGGS LE
3.	CD3-ε человека	MQSGTHWRV LGLCLLSVGVWGQD GNEEMGGITQTPY KVSISGT TVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHL SLKEFS ELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEM DVMSV ATIVIVDICITGGLLLL VYYWSKNRKAKAKPVTRGAGA GGRQR GQNKERPPVPNPDYEP IRKGQRDLYSGLNQRR I
4.	CD3-γ человека	MEQGKGLAVLILAILLQGT LAQSIKGNHLVKVYDYQE DGSVLL TCDAEAKNITWFKDGMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDP RGM YQ CKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVS IFVLAV GVYFIAGQDGV RQSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDRED DQYSHL QGNQLRRN
5.	CD3-δ человека	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELED R VFVNCNTS ITWVEG TVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKEST VQVHYR MCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHET GRLSG AADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK S
6.	CD3-ζ человека	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGIL FIYGV I

		LTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDK RRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKG ERRRGKGHGDLQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
7.	α -цепь TCR человека	MAGTWLLLLLALGCPALPTGVGGTPFPSLAPPIMLLVD GKQQM VWCLVLDVAPPGLDSPIWFSAGNGSALDAFTYGSPAT DGTW TNLAHLSLPSEELASWEPLVCHTGPGAEGHSRSTQPMH LSGEAS TARTCPQEPLRGTPGGALWLGVLRLLLFKLLFDLLTLC SCLCD P AGLP SPATTTRLRALGSHRLHP ATETGGREATS SPRPQPRDRR WGDTPPGRKPGSPVWGEYS YLS S YPTCP AQ AWCSRS ALRAP S S S LGAFFAGDLPPPLQAGA
8.	C-область α -цепи TCR человека	PNIQNPDPAVYQLRD SKS SDKS VCLFTDFD S QTNVSEQ SKD SD VYI TDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSII PEDTFF PSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLVIGFRILLKVA GFNLL MTLRLWSS
9.	V-область α -цепи TCR человека CTL-L17	MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPS LSVQEG RISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIKDK NEDGRF TVFLNKSAKHLHLHIVPSQPGDSAVYFCAAKGAGTASK LTFGTG TRLQVTL
10	C-область β -цепи TCR человека	EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPD HVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVS ATFWQ NPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA WGRAD CGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVL

		MAMVK RKDF
11	V-область β-цепи TCR человека CTL-L17	MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQNPRHNITKRGQN VTFRC DPISEHNRLYWYRQTLGQGPEFLTYFQNEAQLEKSRL SDRFSA ERPKGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSLAGLNQPQHFG DGTRL SIL
12	V-область β-цепи TCR человека YT35	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEV TLRCK PISGHNSLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPE DRFSAK MPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSFSTCSANYGYTF GSGTRL TVV
13	Последова- тельность нуклеиновой кислоты, кодирующая однодоменное связующее антитело 1 к MUC16 (SD1)	caggtgcagctgcaggagtctggggaggattggtgcaggctggggctctctgaga ctctctctgtg cagcctctggacgcaccgtcagtagcttgtcatgggctggtccccaagctccaggg aaggagcg tgaactgtagcagccattagccggtatagtctatatacatactatgcagactccgtgaag ggccgattc accatctccgagacaacgccaagaacgcggtatatctgcaaatgaacagcctgaaac ctgaggac acggccggttattactgtgcatcaagttggaatatacttctaatgactatgactcctgggg ccagggga cccaggtcaccgtctctca
14	однодоменное связующее антитело R3MU4 к MUC16	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTVSSLFMGWF RQAPG KERELVA AISRYSLYTYYADSVKGRFTISADNAKNAVY LQMNS LKPEDTAVYYCASKLEYTSNDYDSWGQGTQVTVSS
15	R3MU4CDR1	GRTVSSLF
16	R3MU4 CDR2	ISRYSLYT
17	R3MU4 CDR3	ASKLEYTSNDYDS

18	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая однодоменное антитело R3MU29 к MUC16	caggtgcagctgcaggagtctggggaggattggtgcaggctggggactctctgaga ctctcctgtg cagcctctggacgcgccgtcagtagcttgttcatgggctggtccgccagctccaggg aaggagcg tgaactttagcagccattagccggtatagtctatatacatactatgcagactccgtgaag ggccgattc accatctccgcagacaacgccaagaacgcggtatatctgcaaatgaacagcctaaaac ctgaggaca cggccgtttattactgtgcatcaaagttggaatatacttctaatactatgactcctggggc caggggac ccaggtcaccgtctcctca
19	Однодоменное антитело R3MU29 к MUC16	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRAVSSLFMGWF RRAPG KERELVA AISRYSLYTYYADSVKGRFTISADNAKNAVY LQMNS LKPEDTAVYYCASKLEYTSNDYDSWGQGTQVTVSS
20	R3MU29 CDR1	GRAYS SLF
21	R3MU29 CDR2	ISRYSLYT
22	R3MU29 CDR3	ASKLEYTSNDYDS
23	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая однодоменное антитело R3MU63 к MUC16	caggtgcagctgcaggagtctggggaggattggtgcaggctggggactctctgaga ctctcctgtg cagcctctggacgcaccgtcagtagcttgttcatggggtggtccgccagctccaggg aaggagcg tgaactttagcagccattagccggtatagtctatatacatactatgcagactccgtgaag ggccgattc accatctccgcagacaacgccaagaacgcggtatatctgcaaatgaacagcctgaaac ctgaggac acggccgtttattactgtgcatcaaagttggaatatacttctaatactatgactcctgggg ccagggga cccaggtcaccgtctcctca
24	Однодоменное антитело R3MU63 к MUC16	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRVSSLFMGWF RRAPG KERELVA AISRYSLYTYYADSVKGRFTISADNAKNAVY LQMNS

		LKPEDTAVYYCASKLEYTSNDYDSWGQGTQVTVSS
25	R3MU63 CDR1	GRTVSSLF
26	R3MU63 CDR2	ISRYSLYT
27	R3MU63 CDR3	ASKLEYTSNDYDS
28	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая однодоменное антитело R3MU119 к MUC16	caggtgcagctgcaggagtctggggaggcttggtgcagcctggggattctatgagactctctgtgc agccgaggggactcttggatggttatgtagtaggttggtccgccaggccccagggaaggagcgc caggggtctcaagtattagtgccgatggcagtatgcgatacgttgctgactccgtgaaggggcgatt caccatctcccagacaacgccaagaacacggtgtatctgcaaatgatcgacctgaaacctgaggac acaggcgttattactgtgcagcagaccaccactgggactactggggtcaggggaccaggtca ccgtctctca
29	Однодоменное антитело R3MU119 к MUC16	Q VQLQESGGGLVQPGD SMRLSC AAEGD SLDGYVVGWFRQAPG KERQGVSSISGDGSMRYVADSVKGRFTISRDNAKNTVY LQIMID LKPEDTGVYYCAADPPTWDYWGQGTQ VTVS S
30	R3MU119 CDR1	GDSL DGYV
31	R3MU119 CDR2	ISGDGSMR
32	R3MU119 CDR3	AADPPTWDY
33	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая однодоменное антитело R3MU150 к	caggtgcagctgcaggagtctggggaggcttggtgcagcctggggggtctctgaga ctctctgtg cagcctctggacgcaccgtcagtagcttggctcatgggctggtccgccagctccagggaaggagcgc tgaactttagcagccattagccggtatagctatatacatactatgcagactccgtgaaggccgattc accatctccgagacaacgccaagaacgcggtatatctgcaaatgaacagcctgaaac

	MUC16	ctgaggac acggccgtttattactgtgcatcaaagttggaatatacttctaatactatgactcctgggg ccagggga cccaggtcaccgtctcctca
34	Однодоменное антитело R3MU150 к MUC16	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTVSSLFMGWF RRAPGK ERELVAAISRYSLYTYYADSVKGRFTISADNAKNAVYL QMNSL KPEDTAVYYCASKLEYTSNDYDSWGQGTQVTVSS
35	R3MU150 CDR1	GRTVSSLF
36	R3MU150 CDR2	ISRYSLYT
37	R3MU150 CDR3	ASKLEYTSNDYDS
38	Последова- тельность нуклеиновой кислоты, кодирующая однодоменное антитело R3MU147 к MUC16	caggtgcagctgcaggagtctgggggaggattggtgcaggctggggagtctctgaga ctctcctgtg cagcctctggacgcaccgtcagtagcttgttcatgggctggtccgccagctccaggg aaggagcg tgaactttagcagccattagccggtatagtctatatacatactatgcagactccgtgaag ggccgattc accatctccgagacaacgccaagaacgcggtatatctgcaaatgaacagcctgaaac ctgaggac acggccgtttattactgtgcatcaaagttggaatatacttctaatactatgactcctgggg ccagggga cccaggtcaccgtctcctca
39	Однодоменное антитело R3MU147 к MUC16	QVQLQESGGGLVQAGESLRLSCAASGRTVSSLFMGWF RRAPG KERELVAAISRYSLYTYYADSVKGRFTISADNAKNAVY LQMNS LKPEDTAVYYCASKLEYTSNDYDSWGQGTQVTVSS
40	R3MU147 CDR1	GRTVSSLF
41	R3MU147 CDR2	ISRYSLYT

42	R3MU147 CDR3	ASKLEYTSNDYDS
43	R3MU29h15 (на 98,9% человека)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAVSSLFMGWV RQAPG KGLEWVSAISRYSLYTYYYADSVKGRFTISRDNANTLY LQMNS LRPEDITAVYYCASKLEYTSNDYDSWGQGTLVTVSS
44	R3MU29h14 (на 97,8% человека)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAVSSLFMGWF RQAPGK GLEWVSAISRYSLYTYYYADSVKGRFTISRDNANTLYL OMNSL RPEDITAVYYCASKLEYTSNDYDSWGQGTLVTVSS
45	R3MU29h13 (на 96,7% человека)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAVSSLFMGWF RQAPG KGLELVSASRYSLYTYYYADSVKGRFTISRDNANTLYL QMNS LRPEDITAVYYCASKLEYTSNDYDSWGQGTLVTVSS
46	R3MU4h13 (на 98,9% человека)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTVSSLFMGWV RQAPG KGLEWVSAISRYSLYTYYYADSVKGRFTISRDNANTLY LQMNS LRPEDITAVYYCASKLEYTSNDYDSWGQGTLVTVSS
47	R3MU4h12 (на 97,8% человека)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTVSSLFMGWFR QAPGK GLEWVSAISRYSLYTYYYADSVKGRFTISRDNANTLYL OMNSL RPEDITAVYYCASKLEYTSNDYDSWGQGTLVTVSS
48	R3MU4h11 (на 96,7% человека)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTVSSLFMGWFR QAPGK GLELVSASRYSLYTYYYADSVKGRFTISRDNANTLYLQ MNSLR PEDITAVYYCASKLEYTSNDYDSWGQGTLVTVSS
49	ДНК-последова- тельность MSLN	acgcgtgtagcttatgcaatactctttagcttgaacatggaacgatgagtagcaac atgcctac

	<p>aaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattggtggaaagtaaggtggtacgatcgtgc cttattagg aaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgcattgcaga gatattgtat ttaagtgcctagctcgatacaataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctgg gagctctctg gctaactagggaaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtctcaagtagt gtgtgccc gtctgttgtgtgactctgtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgaggaaaatc tctagcagt ggcgcccgaacagggacctgaaagcgaaagggaaaccagagctctctcgacgcagg actcggctt gctgaagcgcgcacggcaagaggcgagggcgggcgactggtgagtacgccaaaaa tttgactag cggaggctagaaggagagatgggtgcgagagcgtcagttattaagcgggggagaa ttagatcgc gatgggaaaaattcggtaaggccagggggaaagaaaaatataaattaaaacatata gtatgggc aagcaggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggct gtagaaa atactgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatata atacagta gcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaaagctttaga caagataga ggaagagcaaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccactgatcttcagac ctggagga ggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaatataaagtagtaaaaattgaa ccattagga gtagcaccaccaaggcaagagaagagtgggtgcagagagaaaaaagagcagtgg gaataggag ctttgtccttgggtcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcctcaatgacgc tgacggta caggccagacaattattgtctggtatagtgacgcagcagaacaatttctgagggtatt gaggcgca acagcatctgttgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctgg</p>
--	---

	<p>ctgtggaa agatacctaaaggatcaacagctcctggggatttgggggtgctctggaaaaactcatttgc accactgct gtgccttggatgctagttggagtaataaatctctggaacagattggaatcacacgacct ggatggagt gggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaa accagcaa gaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgggaattggttta acataaca attggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtaggttaagaatag ttttgctgt actttctatagtgaatagagttaggcaggatattcaccattatcgtttcagaccacctcc caaccccg aggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaagggtggagagagagacaga gacagatcc attcgattagtgaacggatctcgacggtatcggtaactttaaaagaaaaggggggattg gggggtac agtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaactaaagaattac aaaacaaa ttacaaaattcaaaatttatcgatactagtattatgccagtcacatgaccttatgggacttc ctacttggc agtacatctacgtattatgctatcattaccatggtgatgcggtttggcagtcacatcaatg ggcgtgga tagcggttgactcacggggattccaagtctccacccattgacgtcaatggga gtttgtttggcaccaaaatcaacgggactttcaaaatgctgtaacaactccgccatt gacgcaat gggcggtaggcgtgtacggtgggaggtttatataagcagagctcgtttagtgaaccgtc agatcgct ggagacgccatccacgctgtttgacctccatagaagattctagagccgccaccatgctt ctctgggtg acaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattcctctgatccagacattcagc aggtccag ctccagcagtctggccctgaactcgaaaaacctggcgctagcgtgaaaattcctgtaa gcctccgg ctactctttactggctacacaatgaattgggtgaaacagtctcacggcaaatccctcgaa</p>
--	--

	<p> tggatcggga ctcatcacacctacaatggcgctcttctctacaaccagaaattccggggcaaggcaac actcactgt ggacaaatcatcctctaccgcctacatggatctgctctccctcacatctgaggactccgct gtctactttt gtgcccgaggaggatacgcggacgaggattcgattactggggacagggacaactg tgaccgtgt </p>
	<p> ctagtggcggcgaggaggagtgaggcgaggatcttctggcgggggatccgatattg aactcacac agtctcccgtatcatgtctgcttctcccggcgagaaagtgactatgacttgctctgcttcc tcttctgtgt cctacatgcactggtagcagcagaaatctggcacatcccctaaacgggtggatctacgata ctagcaaa ctggcatccggcgtgcctggcgattctctggctctggctctggcaactcttactctctca caatctcatc tgtcaggctgaggacgatccacatactactgtcagcagtggtctaaaccccactca cattcggcg ctggcactaaactggaaataaaagcggccgcaggtggcggcggttctggtggcggcg gttctggtg gcggcggttctctcaggatggtaatgaagaaatgggtggtattacacagacaccatat aaagtctcc atctctggaaccacagtaattgacatgccctcagtatcctggatctgaaatactatggc aacacaatg ataaaaacataggcggatgaggatgataaaaacataggcagtgatgaggatcacct gtcactgaa ggaatttcagaattggagcaaagtgggtattatgtctgctacccagaggaagcaaac agaagatgc gaactttatctctacctgaggcgaagagtgtgtgagaactgcatggagatggatgtgat gtcgggtggc cacaattgcatagtgacatctgcatcactgggggcttctgctgctggttactactgg agcaagaat agaaaggccaaggccaagcctgtgacacgaggagcgggtgctggcggcaggcaaa ggggacaa aacaaggagaggccaccacctgtccaacccagactatgagccatccggaaggc cagcggga </p>

	<p>cctgtattctggcctgaatcagagacgcatctgataagaattcgatccgcgccgcgaa ggatctgcg atcgctccggtgcccgtcagtgggcagagcgacatcgcccacgtccccgagaagtt gggggga ggggtcggcaattgaacgggtgcctagagaagggtggcgcggggtaaactgggaaagt gatgtcgtg tactggctccgccttttcccagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgcc gtgaacgtt cttttcgcaacgggttgcgccagaacacagctgaagcttcgaggggctcgcattct ccttcacgc gcccgcgccctacctgaggccgccatccacgccggttgagtcgcttctgccgctc ccgcctgtg gtgcctcctgaactgcgtccgctctaggttaagttaaagctcaggtcgagaccgggc ctttgtccgg cgctcccttgagcctacctagactcagccggtctccacgcttgcctgacctgctg ctcaactcta cgtcttgttctgtttctgttctgcgccgttacagatccaagctgtgaccggcgcctacgct agatgacc gagtacaagcccacgggtgcgctcgcaccgcgacgacgtcccaggggcgtacg caccctcgc cgccgcgttcgccactacccgccacgcgccacaccgtcgatccggaccgccacat cgagcggg tcaccgagctgcaagaactcttctcacgcgctcgggctcgacatcggcaaggtgtg ggtcgcgga cgacggcgcgcggtggcgtctggaccacgccggagagcgtcgaagcgggggcg gtgtcgc gagatcggccgcgatggccgagttgagcgggtcccggctggccgcgcagcaaca gatggaagg cctctggcgcgcaccggcccaaggagcccgcgtggtcctggccaccgtcggcgt ctcgcgccga ccaccagggaagggtctgggcagcgcctcgtgctccccggagtggaggcggccg agcgcgcc ggggtgccgccttctggagacctccgcccccgcaacctccccttctacgagcggc tcggctca ccgtcaccgccgacgtcaggtgcccgaaggaccgcgcacctggtgcatgaccgc</p>
--	---

	<p>aagcccggg gcctgagtcgacaatcaacctctggattacaaaatttgtaaagattgactggtattcttaa ctatgttgct cctttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgctcccgtatggc ttcattttct cctcctgtataaatcctgggtgctgtctctttatgaggagttgtggcccgtgtcaggcaac gtggcgtg gtgtgcactgtgttgctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcag ctcctttccg ggactttcgctttccccctcctattgccacggcggaaactcatgccgcctgccttgccc gctgctgga caggggctcggctgtgggcactgacaattccgtggtgtgtcggggaaatcatcgtcct ttccttgct gctcgctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtccctcggcc ctcaatcca gggaccttcttcccggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgcctt cgccctcag acgagtcggatctccctttggccgcctccccgcctggtaccttaagaccaatgactta caaggcag ctgtagatcttagccacttttaaaagaaaaggggggactggaagggttaattcactccc aacgaaaat aagatctgctttttgctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctct ctggctaa ctaggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtcttcaagtagtgtgtg cccgtctgtt gtgtgactctgtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtgaaaatctctagc agtagtagtt catgtcatcttattattcagatttataacttgcaaagaaatgaatatcagagagtgagagg aactgtttat tgcagcttataatggttacaataaagcaatagcatcacaatttcacaataaagcattttt ttcactgca ttctagttgtggtttgtecaaacatcaatgtatcttatcatgtctggctettagctatcccgc ccctaactcc gcccagttccgccattctccgcccctggctgactaattttttttatgagaggccg aggccgcct</p>
--	---

	<p> cggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggcctagacttttgag agacggcc caaattcgaatcatggcatagctgttctctgtgtgaaattgtatccgctcacaattccac acaacatac gagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaataagtgagctaaactcacatta attgcgttg </p>
	<p> cgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggc caacgcgc ggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttctcgctcactgactcgtcgc ctcggctcgt tcggctcggcgagcggatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaat caggggat aacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaa ggccgcgt tgctggcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaa gtcagagg tggcgaacccgacaggactataaagataccaggcgtttcccctggaagctccctcgt gcgctctcc tgttccgacctgccgcttaccggatacctgtccgctttctccctcgggaagcgtggc gctttctcata gctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgca cgaacccc ccgttcagcccaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaa gacacgact tatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtagggcg tgctacaga gttcttgaagtggggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgct ctgctgaag ccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaccaccgctgg agcgggtgg ttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatccttga tctttctac ggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattac aaaaaggat cttcacctagatccttttaataaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaa </p>

	<p>acttggctctg acagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatcca tagttgcct gactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgct gcaatgata ccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaa gggccga gcgcagaagtggctctgcaactttatccgcctccatccagctattaattgttgcgggaa gctagagta agtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgcattgctacaggcatcgtggtgtc acgctcgtc gtttggatggcttcattcagctccgggtccaacgatcaaggcgagttacatgatcccc atggttgca aaaaagcggtagctccttcggctccgatcgttgcagaagtaagttggccgagtggt atcactcat ggttatggcagcactgcataattctctfactgcatgccatccgtaagatgctttctgtgac tggtgagta ctcaaccaagtattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttcccggcgtc aatacggg ataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgtcatcattggaaaacgttcttcggg gcgaaaac tctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcagatgaaccactcgtgcaccaactg atcttcagc atctttactttaccagcgttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaa aaagggaa taaggcgacacggaaatgtgaatactcatacttctcttttcaatattattgaagcatta tcagggtta ttgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataaacaataggggtccgc gcacatttc cccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaa taggcgtat cacgaggcccttcgtctcgcgcgttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgca gctcccgg agacggtcacagcttctgtgaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcg cgtcagcg</p>
--	--

		<p>ggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgag agtgcacca tatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgccatt cgccattca ggctgcgcaactgttgggaaggcgatcgggtcgggcctcttcgctattaccgagctg gcgaaag ggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggtttccagtcacgacgt tgtaaacg acggccagtgccaagctg</p>
50	<p>Аминокислотная последова- тельность MSLN: последова- тельность мезотелина человека (учетный номер UniProt Q13421)</p>	<p>MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLGA ETGQE AAPLDGVLANPPNISSLSPRQLLGFPCEVSGLSTERV ELAV AQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLLFLNP DAFSGP QACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLPAALACWGV RGSLLS EADVRLGGLACDLPGRFVAESAEVLLPRLVSCPGLD QDQQE AARAALQGGGPPYGPPSTWSVSTMDALRGLLPVLGQPI IRSIPQG IVA AWRQRSSRDPSWRQPRTILRPRFRREVEKTACPSG KKAREI DESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQL DVLKH KLDEL YPQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSL ETLKAL LEVNKGHEMSPQVATLIDRFVKGRGQLDKDTLDTLTA YPGYL CSLSPEELS S VPPS SIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQN MNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATF MKLRTD AVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQR QDDLD TLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGGPVL</p>

		TVLALL LASTLA
51	ДНК p510_anti- MSLN_SS1_CD3ε	acgcgtgtagtcttatgcaataactctttagtcttgaacatggtaacgatgagttagcaac atgccttac aaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattggggaagtaagggtgtacgatcgtgc cttattagg aaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgattgcaga gatattgtat ttaagtgcctagctcgatacaataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctgg gagctctctg gtaactagggaaaccactgcttaagcctcaataaagcttgcttgagtgtcaagtagt gtgtgccc gtctgtgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatc tctagcagt ggcgcccgaacagggacctgaaagcgaaagggaaccagagctctctcgacgcagg actcggctt gctgaagcgcgcacggcaagaggcgagggcgcgactggtgagtacgccaaaa tttgactag cggaggctagaaggagagagatgggtgagagcgtcagtattaagcgggggagaa ttagatcgc gatgggaaaaattcggtaaggccaggggaaagaaaaatataaattaaaacatata gtatgggc aagcaggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggct gtagaaa atactgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatata atacagta gcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttaga caagataga ggaagagcaaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccactgatcttcagac ctggagga ggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaatataaagtagtaaaattgaa ccattagga gtagcaccaccaaggcaagagaagagtgggtgcagagagaaaaaagagcagtg gaataggag

	<p>ctttgtccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgagcctcaatgacgc tgacggta caggccagacaattattgtctggtatagtgcagcagcagaacaattgctgaggctatt gaggcgca acagcatctgftgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctgg ctgtggaa agatacctaaaggatcaacagctcctggggatttgggggtgctctggaaaactcatttgc accactgct gtgccttggaatgctagtggagtaataaatctctggaacagattggaatcacacgacct ggatggagt gggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgagaatcgaaa accagcaa gaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgggaattggtta acataaaa attggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttgtaggttaagaatag ttttgctgt actttctatagtgaatagagttaggcaggatattcaccattatcgtttcagaccacctcc caaccccg aggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacaga gacagatcc attcgattagtgaacggatctcgacggtatcggtaactttaaaagaaaaggggggattg gggggtac agtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaactaaagaattac aaaacaaaa ttacaaaattcaaaattttatcgatactagtattatgccagtacatgaccttatgggacttcc tacttggc agtacatctacgtattatgcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatg ggcgtgga tagcggtttgactcacggggatttccaagtctccacccattgacgtcaatgggagtttgtt ttggcacc aaaatcaacgggactttcaaaatgtcgtacaactccgccccattgacgcaaatgggc ggtaggcgt gtacggtgggaggtttatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgctggaga cgccatcc acgctgtttgacctccatagaagattctagagccgccaccatgcttctcctggtgacaag</p>
--	--

	<p>ccttctgctc tgtgagttaccacaccagcattcctcctgatcccagacattcagcaggtccagctccag cagtctggc cctgaactcgaaaaacctggcgctagcgtgaaaatttctgtaaagcctccggctactctt ttactggct acacaatgaattgggtgaaacagtctcacggcaatccctcgaatggatcggactcatc acaccctac aatggcgcctcttctacaaccagaaattccggggcaaggcaacactcactgtggacaa atcatcctc taccgcctacatggatctgctctccctcacatctgaggactccgctgtctactttgtgcc gaggagga tacgacggacgaggattcgattactggggacagggacaactgtgaccgtgtctagt gcggcgga gggagtggaggcggaggatcttctggcgggggatccgatattgaactcacacagtctc ccgctatcat gtctgcttctcccggcgagaaagtgactatgacttgctctgcttctctctgtgtcctacat gcaactgga ccagcagaaatctggcacatcccctaaacgggtggatctacgatactagcaaacctggcat ccggcgtg cctgggcgattctctggctctggctctggcaactcttactctctcacaatctcatctgtcga ggctgagga cgatgccacatactactgtcagcagtggtctaaacaccactcacattcggcgtggcac taactgg aaataaaagcggccgcaggtggcggcggttctggtggcggcggttctggtggcggcg gttctctcg aggatggtaatgaagaaatgggtggtattacacagacaccatataaagtctccatctctg gaaccaca gtaatattgacatgccctcagtatcctggatctgaaatactatggcaacacaatgataaaa acataggcg gtgatgaggatgataaaaacataggcagtgatgaggatcacctgtcactgaaggaat cagaattgg agcaaagtgggtattatgtctgctaccccagaggaagcaaacagaagatcggaacttt atctctacct gagggcaagagtgtgtgagaactgcatggagatggatgtgatgctgggtggccacaatt gtcatagtg</p>
--	---

	<p>gacatctgcatcactgggggcttgctgctgctggttactactggagcaagaatagaaag gccaaggc caagcctgtgacacgaggagcgggtgctggcggcaggcaaaaggggacaaaacaag gagaggcc accacctgttcccaaccagactatgagccatccggaaaggccagcgggacctgtatt ctggcctg aatcagagacgcatctgataagaattcgatccgcgccgcgaaggatctgcatcgtc cgggtgcc gtcagtgggcagagcgcacatcggccacagtccccgagaagtggggggaggggtc ggcaattga acgggtgcctagagaagggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgctgtactgg ctccgccttt tcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcg caacgggtt tgccgccagaacacagctgaagcttcgaggggctcgcacatctctcttcacgcgccgc cgccctacc tgaggccgcatccacgccggtgagtcgcgttctgccgcctccgcctgtggtgcctc ctgaactgc gtccgcctctaggttaagtttaaagctcaggtcgagaccgggctttgtccggcgctcc cttgagcct acctagactcagccggctctccacgctttgctgaccctgcttcaactctacgtctttg ttcgtttct gttctgcgccgttacagatccaagcttgaccggcgcctacgctagatgaccgagtaca agcccacg gtgcgcctcgccaccgcgacgacgtccccagggccgtacgcaccctcgccgccgc gttcgccga ctacccgccacgcgccacaccgtcgatccggaccgccacatcgagcgggtcaccga gctgcaag aactctctcaccgcgctcgggctcgacatcggcaaggtgtgggtcgcggacgacgg cgccgcg gtggcggcttgaccacgccggagagcgtcgaagcggggcggtgttcgccgagat cggccccg gcatggccgagttgagcggttccggctggccgcgcagcaacagatggaaggcctcc tggcgccg caccggcccaaggagcccgcgtggttctggccaccgtcggcgtctcggccgaccac</p>
--	--

	<p> cagggcaa gggtctgggcagcgccgtcgtgctccccggagtgaggcggccgagcgcgccggg gtgccccgc ttctggagacctccgcgccccgaacctccccctctacgagcggctcggcttcaccgt caccgccg acgtcgaggtgcccgaaggaccgcgcacctggtgcatgaccgcaagcccggcgct gagtcgac aatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggattcttaactatgttgctcctt tacgctatg tggatacgtgcttaatgcctttgtatcatgctattgctcccgtatggcttcattttcctc cttgataaa tcctgggtgctgtctctttatgaggagttgtggcccgtgtcaggcaacgtggcgtggtgt gcactgtgtt tgctgacgcaacccccactgggtggggcattgccaccacctgtcagctccttcggga cttcgcttc ccccctcctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttcccgcgtgctggacagg ggctcggc tgtgggcactgacaattccgtggtgtgtcggggaaatcatcgtccttccttggtgctc gcctgtgtt gccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtccctcggccctcaatccagcg gacctcctt cccgcggcctgctccggctctgcggcctctccgcgtcttcgcttcgacctcagacg agtcggatc tcccttgggccgctccccgcctggtaccttaagaccaatgacttacaaggcagctgt agatcttagc cacttttaaaagaaaagggggactggaagggtaattcactccaacgaaaataaga tctgcttttg ctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagg gaaccact gcttaagcctcaataaagctgccttgagtgttcaagtagtgtgtcccgtctgtgtgtg actctggta actagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagtcatgt catcttattat tcagtattataactgcaaagaaatgaatatcagagagtgagaggaactgtttattgcag cttataatg </p>
--	--

	<p>gttacaataaagcaatagcatcacaatttcacaataaagcattttttcactgcattcta gttggtggtt gtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggctctagctatcccgccctaactccgcc cagtccgc ccattctccgccccatggctgactaattttttattatgcagaggccgaggccgctcgg cctctgagc tattccagaagtagtgaggaggctttttggaggcctagacttttcagagacggcccaa attcgtaatc atggtcatagctgttctgtgtgaaattgtatccgctcacaattccacacaacatacag ccggaagc ataaagtgtaaagcctggggtgcctaataagtgagtaactcacattaattgcgttcgct cactgcc gcttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggg gagaggc ggtttgcgtattgggcgctctccgctcctcgtcactgactcgtcgcgtcggtcgttcg gctgcggc gagcggatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataac gcaggaaa gaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcttgc ggcgtttt ccataggctccgccccctgacgagcatcacaataatcagcgtcaagtacagaggtgg cgaaccc gacaggactataaagataccaggcgtttcccctggaagctccctcgtcgcctctcctgt tccgacct gccgcttaccggatacctgtcgcctttctccctcgggaagcgtggcgttttcatagc tcacgctgt aggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccc gttcagccc gaccgctgcgccttatccgtaactatcgtcttgagccaacccggtaagacacgactta tcgccactg gcagcagccactggtaacaggattagcagagcagggtatgtaggcgggtctacagagt tcttgaagt ggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagc cagttacctt</p>
--	--

	<p>cggaaaaagagttgtagctcttgatccggcaaaacaaccaccgctgtagcggtggtt ttttgittgc aagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatccttgatctttctacg gggtctgac gctcagtggaacgaaaactcacgtaagggttttggtcatgagattatcaaaaaggatct tcacctaga tcctttaaattaaaaatgaagttttaaataatctaaagtatatatgagtaaaactgggtctga cagttacca atgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcggtcatccatagttgcctg actccccgt cgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgatac cgcgagac ccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaaggccgag cgcagaagt ggtcctgcaactttatccgctccatccagcttattaattgtgcccgggaagctagagtaa gtagttcgcc agttaatagttgcgcaacggtgtgaccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgt ttggtatgg cttattcagctccggtcccaacgatcaaggcagttacatgatccccatggtgtgcaa aaaagcgg ttagctccttcggtcctccgatcggtgtcagaagtaagttggccgagtggtatcactcatg ggtatggca gcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtac tcaaccaag tcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttggccggcgtcaatacgggat aataccgcg ccacatagcagaactttaaagtgtcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactct caaggatc ttaccgctgttgagatccagttcgatgtaaccactcgtgcacccaactgatcttcagcat ctttactttc accagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaaggggaata agggcgac acggaaatgttgaatactcactcttcttttcaatattattgaagcatttatcagggttatt gtctcatgag cggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaataaggggttcgcgcacattccc</p>
--	---

		<p>cgaaaagtg</p> <p>ccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcac</p> <p>gaggccct</p> <p>ttcgtctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccgaga</p> <p>cggtcaca</p> <p>gcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggt</p> <p>gttggcgg</p> <p>gtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcacatat</p> <p>gcggtgtg</p> <p>aaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgccattgccattcag</p> <p>gctgcgcaa</p> <p>ctgttgggaagggcgatcgggtcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaagg</p> <p>ggatgtgct</p> <p>gcaaggcgattaagttgggtaaccgagggtttccagtcacgacgttgtaaaccgac</p> <p>ggccagtg ccaagctg</p>
52	Аминокислота p510_anti- MSLN_SS1_CD3ε	<p>MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQQVQLQQSGPELEKPG</p> <p>ASVKIS CKASGYSFTGYTMNWVKQ</p> <p>SHGKSLEWIGLITP YNGAS S YNQKF</p> <p>RGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYD</p> <p>GRGFD</p> <p>YWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSSGGGSDIELTQSPAIM</p> <p>SASPGE</p> <p>KVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLA</p> <p>SGVPGR</p> <p>FSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSKHPLTFG</p> <p>AGTKLEI</p> <p>KAAAGGGGSGGGGSGGGGSLEDGNEEMGGITQTPYKV</p> <p>SISGTT</p> <p>VILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGEDDKNIGSDEDHLS</p> <p>LKEFSE</p>

		LEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD VMSVA TIVIVDICITGLLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAG GRQRG QNKERPPPVPNPDIYPIRKQRDLYSGLNQRRRI*
53	Аминокислота легкой цепи против MSLN (МНС1445LC.1)	DWMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLH WYLQK PGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKITRVE AEDLG VFFC SQSTHVPFTFGSGTKLEIK
54	ДНК легкой цепи против MSLN (МНС1445LC.1)	gatggtgatgacccaaactccactctccctgctcagctctggagatcaagcctcca tctcttcag atctagtcagagcctgtacacagtaatggaacacctattacattggtacctgcagaag ccaggcca gtctcaaagctcctgatctacaagttccaaccgattttctggggtcccagacaggttc agtggcagt ggatcagggactgattcacactcaagatcaccagagtggaggctgaggatctgggag ttttttctgct ctcaaagtacacatgttcattcacgttcgggctcggggacaaagttggaataaaa
55	Аминокислота тяжелой цепи против MSLN (МНС1445HC.1)	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFFDYEMHWV KQTPV HGLEWIG AIDPEIDGT AYNQKFKGK AILT ADKS S STAYMELRSL TSEDSA VYYCTDY YGSSYWF DVWGTGTTVTVSS
56	ДНК тяжелой цепи против MSLN (МНС1445HC.1)	caggtcaactgcagcagctctggggctgagctggtgaggcctgggcttcagtgacgc tgtctgca aggcttcgggctacacatttttgactatgaaatgcactgggtgaagcagacacctgtgc atggcctgg aatggattggagctattgatcctgaaattgatggtactgcctacaatcagaagttcaaggg caaggcca tactgactgcagacaaatcctccagcacagcctacatggagctccgcagcctgacatct gaggactct gccgtctattactgtacagattactacggtagtagctactgggtacttcgatgtctggggcac agggacca cggtcaccgtctcctc
57	Аминокислота легкой цепи против MSLN	DVMMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYL HWFLQK PGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE

	(MHC1446LC.1)	AEDLG VYFCSQTTHVPLTFGAGTKLELK
58	ДНК легкой цепи против MSLN (MHC1446LC.1)	gatgttatgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagcttggagatcaagcctcca tctcttgag atctagtcagagcctgtacacagtaatggaacacctattfacattgggtcctgcagaag ccaggcca gtctccaaagctcctgatctacaaagttccaaccgattttctgggggtcccagacagggtc agtggcagt ggatcagggacagatttcactcaagatcagcagagtgaggctgaggatctgggag tttattctg ctctcaaacacacatgttcgctcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaa
59	Аминокислота тяжелой цепи против MSLN (MHC1446HC.3)	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEMHWV KQTPV HGLEWIG AIDPEIAGT AYNQKFKGK AILTADKS S STAYMELRSL TSED S AVYYC SRYGGNYLYYFD YWGQGTTLTVS S
60	ДНК тяжелой цепи против MSLN (MHC1446HC.3)	caggttcaactgcagcagctctggggctgagctggtgaggcctggggcttcagtgcgc tgtcctgca aggcttcgggctacacttttactgactatgaaatgcactgggtgaagcagacacctgtcc atggcctgg aatggattggagctattgatcctgaaattgctggtactgcctacaatcagaagttcaaggg caaggcca tactgactgcagacaaatcctccagcacagcctacatggagctccgcagcctgacatct gaggactct gccgtctattactgttcaagatacggtggttaactacctttactactttgactactggggcca aggcacca ctctcacagtctctca
61	Аминокислота легкой цепи против MSLN (MHC1447LC.5)	DVLM TQIPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVYSNGNTYLE WYLQKP GQSPKLLIYK VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGV YYCFQGSHPFTFGSGTKLEIK
62	ДНК легкой цепи против MSLN (MHC1447LC.5)	gatgtttgatgacccaaattccactctccctgcctgtcagcttggagatcaagcctccat ctcttgag atctagtcagaacattgtatagtaatggaacacctatttagagtggacctgcagaaa ccaggcca gtctccaaagctcctgatctacaaagttccaaccgattttctgggggtcccagacagggtc

		<p>agtggcagt</p> <p>ggatcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtgaggctgaggatctgggag</p> <p>tttattactg</p> <p>ctttcaaggttcacatgttcattcacgttcggctcggggacaaagttggaataaaa</p>
63	<p>Аминокислота</p> <p>тяжелой цепи</p> <p>против MSLN</p> <p>(MHC1447HC.5)</p>	<p>QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEMHWV</p> <p>KQTPV</p> <p>HGLEWIG AIDPEIGGSAYNQKFKGRAILTADKSSSTAYM</p> <p>ELRSLT</p> <p>SEDSAVYYCTGYDGYFWFAYWGQGLVTVSS</p>
64	<p>ДНК тяжелой цепи</p> <p>против MSLN</p> <p>(MHC1447HC.5)</p>	<p>caggttcaactgcagcagtcggggctgagctggtgaggcctggggcttcagtgcgc</p> <p>tgctctgca</p> <p>aggcttcgggctacacatttactgactatgaatgcactgggtgaagcagacacctgtgc</p> <p>atggcctg</p> <p>gaatggattggagctattgatcctgaattggtggttctgcctacaatcagaagtcaagg</p> <p>gcagggcc</p> <p>atattgactgcagacaaatcctccagcacagcctacatggagctccgcagcctgacatct</p> <p>gaggactc</p> <p>tgccgtctattattgtacgggctatgatggttacttttggttgcttactggggccaagggac</p> <p>tctggtcac tgctcttca</p>
65	<p>Аминокислота</p> <p>легкой цепи</p> <p>против MSLN</p> <p>(MHC1448LC</p>	<p>ENVLTQSPA IMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQ</p> <p>KSSTSPK</p> <p>LWIYDTSK LASGVPGRFSGSGSGNSYSLTISSMEAEDVA</p> <p>TYYCF</p> <p>QSGGYPLTFGSGTKLEIK</p>
	.4)	
66	<p>ДНК легкой цепи</p> <p>против MSLN</p> <p>(MHC1448LC</p> <p>.4)</p>	<p>gaaaatgttctcaccagctcagcaatcatgtccgcatctccaggggaaaaggtcacc</p> <p>atgacctg</p> <p>cagtgctagctcaagtgaagtacatgcactggtaccagcagaagtcaagcacctccc</p> <p>ccaactct</p> <p>ggattatgacacatccaaactggcttctggagtcccaggtcgcttcagtggcagtggtt</p> <p>ctggaaact</p> <p>cttactctcagatcagcagcatggaggctgaagatgttgcacttattactgtttcag</p> <p>gggagtgg gtaccactcacgttcggctcggggacaaagttggaataaaa</p>
67	<p>Аминокислота</p> <p>тяжелой цепи</p>	<p>QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEMHWV</p> <p>KQTPV</p>

	против MSLN (MHC1448HC.3)	HGLEWIGGIDPETGGTAYNQKFKGKAILTADKSSSTAY MELRSL TSEDSAVYYCTSYYGSRVFWGTGTTVTVSS
68	ДНК тяжелой цепи против MSLN (MHC1448HC.3)	caggttcaactgcagcagctctggggctgagctggtgaggcctggggcttcagtgacgc tgtcctgca aggcttcgggctacacatttactgactatgaaatgcactgggtgaaacagacacctgtgc atggcctg gaatggattggaggtattgatcctgaaactggtggtactgcctacaatcagaagttcaag ggtaaggcc atactgactgcagacaaatcctccagcacagcctacatggagctccgcagcctgacatc tgaggactc tgccgtctattactgtacaagtactatggtagtagagtcttctggggcacaggaccacg gtcaccgctc tctca
69	Аминокислота легкой цепи против MSLN (MHC1449LC.3)	QIVLSQ SP AILS AFPGEKVTMTCRAS S SVSYMHWYQQKPGS SPK PWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAA TYYCQQ WS SNPPTLTFGAGTKLELK
70	ДНК легкой цепи против MSLN (MHC1449LC .3)	caaattgttctctcccagtctccagcaatcctgtctgcattccaggggagaaggctcactat gacttgca gggccagctcaagtgaagttacatgcactggtaccagcagaagccaggatcctcccc caaaccctg gatttatgccacatccaacctggcttctggagtccctgctcgttcagtggcagtgggtct gggacctct tactctctacaatcagcagtggtgaggctgaagatgctgccacttattactgccagcagt ggagtagt aaccaccacgctcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaa
71	Аминокислота тяжелой цепи против MSLN (MHC1449HC.3)	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYGISWVK QRTGQ GLEWIGEIYPRSGNTYYNESFKGKVTLTADKSSGTAYM ELRSLT SEDSAVYFCARWGSYGSPPFYGM DYWGQGTSVTVSS
72	ДНК тяжелой цепи против MSLN (MHC1449HC.3)	caggttcagctgcagcagctctggagctgagctggcgaggcctggggcttcagtgaagc tgtcctgca aggcttctggctacaccttcacaagctatggtataagctgggtgaaacagaggactgga caggcctt gagtggattggagagatttatcctagaagtggtaatacttactacaatgagagcttcaagg

		gcaaggct aactgaccgcagacaaatcttccggcacagcgtacatggagctccgcagcctgacat ctgaggact ctgcggtctatttctgtgcaagatggggctcctacggtagtccccctttactatggtatg gactactgg ggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctca
73	Аминокислота легкой цепи против MSLN (МНС1450LC.3)	DVLMTQTPLSLPVSLGNQASISCRSSQSIVHSSGSTYLE WYLQKP GQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGV YYCFQGSHPYTFGGGKLEIK
74	ДНК легкой цепи против MSLN (МНС1450LC.3)	gatgtttgatgacccaaactccactctccctgctgtcagcttggaaatcaagcctccat ctcttcag atctagttagcagcattgtacatagtagtggagcaccatttagaatggtacctgcagaaa ccaggcca gtctccaaagctcctgatctacaaagttccaaccgattttctggggtcccagacaggttc agtggcagt ggatcagggacagatttcactcaagatcagcagagtgaggctgaggatctgggag tttattactg cttcaaggctcacatgtccatacacgttcggagggggaccaagctggaataaaa
75	Аминокислота тяжелой цепи против MSLN (МНС1450H С.5)	QVQLQQSGAELARPGTSVKVSCKASGYTFTSYGISWVK QRIGQ GLEWIGEIHPRSGNSYYNEKIRGKATLTADKSSSTAYME LRSLIS EDSAVYFCARLITTVVANYYAMD YWGQGTS VTVS S
76	ДНК тяжелой цепи против MSLN (МНС1450HC.5)	caggttcagctgcagcagcttgagctgagctggcgaggcctgggacttcagtgagg tgtcctgca aggcttctggctataccttcacaagttaggtataagctgggtgaagcagagaattggac aggccttg agtggattggagattcatcctagaagtggtaatagttactataatgagaagatcaggg gcaaggcc aactgactgcagacaaatcctccagcacagcgtacatggagctccgcagcctgatatc tgaggact ctgcggtctatttctgtgcaaggctgattactacggtagtgctaattactatgctatggact actggggtc aaggaacctcagtcaccgtctcctca

77	Аминокислота легкой цепи против MSLN (MHC1451LC.1)	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNRSRTRKNY LAWYQ QKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISS VQAED LAVYYCKQSYNLVTFGAGTKLELK
78	ДНК легкой цепи против MSLN (MHC1451LC.1)	gacattgtgatgtcacagtctccatcctccctggctgtgtcagcaggagagaaggctcact atgagctgc aaatccagtcagagtctgctcaacagtagaaccgaaagaactactggcttggtacca gcagaaacc agggcagtctcctaaactgctgatctactgggcatccactagggaatctggggctcctga tcgcttcac aggcagtggatctgggacagattcactctccatcagcagtgtgcaggctgaagacc tggcagttt attactgcaacaatcttataatctggtcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaa a
79	Аминокислота тяжелой цепи против MSLN (MHC1451HC.2)	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFFDYEMHWV KQTPV HGLEWIG AIDPEIDGT AYNQKFKGK AILTADKS S STAYMELRSL TSEDSAVYYCTDYYGSSYWFVWGTGTTVTVSS
80	ДНК тяжелой цепи против MSLN (MHC1451HC.2)	caggttcaactgcagcagtctggggctgagctggtgaggcctggggcttcagtgacgc tgtcctgca aggcttcgggctacacatttttgactatgaaatgcactgggtgaagcagacacctgtgc atggcctgg aatggattggagctattgatcctgaaattgatggtactgcctacaatcagaagtcaaggg caaggcca tactgactgcagacaaatcctccagcacagcctacatggagctccgcagcctgacatct gaggactct gccgtctattactgtacagattactacggtagtagctactgggtacttcgatgtctggggcac agggacca cggtcaccgtctcctc
81	Аминокислота легкой цепи против MSLN (MHC1452LC.1)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISCSASSSVSYMYWYQQKP GSSPKP WIYRTSNLASGVPARFSGSGGTSYSLTISSMEAEDAAT YYCQQ YHSYPLTFGAGTKLELK
82	ДНК легкой цепи	caaattgttctcaccagctctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaaggctacc

	против MSLN (MHC1452LC 1)	atcctgca gtgccagctcaagtgtaagttacatgtactggtaccagcagaagccaggatcctcccc aaaccctgg atctatcgacatccaacctggcttctggagtcctgctcgttcagtgccagtggtctg ggacctctt actctctcacaatcagcagcatggaggctgaagatgctgccacttattactgccagcagt atcatagtta cccactcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaa
83	Аминокислота легкой цепи против MSLN (MHC1452LC.6)	QIVLTQSPAIMSASPGERVMTMCSASSSVSSSYLYWYQQ KSGSSP KLWIYSISNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTINSMEAEDA ATYYCQ QWSSNPQLTFGAGTKLELK
84	ДНК легкой цепи против MSLN (MHC1452LC.6)	caaattgttctcaccagctctccagcaatcatgtctgcatctctctggggaacgggtcacca tgacctgc agtgccagctcaagtgtaagttccagctactgtactggtaccagcagaagtcaggatcc tccccaaa ctctggatttatagcatatccaacctggcttctggagtcaccagctcgttcagtgccagtg ggctctggga cctctactctctcacaatcaacagcatggaggctgaagatgctgccacttattactgcca gcagtgga gtagtaaccacagctcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaa
85	Аминокислота тяжелой цепи против MSLN (MHC1452H C.2)	QVQLKQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVK QRPQG GLEWIGKIGPGSGSTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYM QLSSLT SEDS AVYFC ARTGYVVGYYAMD YWGQGT S VTVS S
86	ДНК тяжелой цепи против MSLN (MHC1452HC.2)	caggtccagctgaagcagctctggagctgagctggtgaagcctgggcttcagtgaga taccctgca aggcttctggctacacctcactgactactatataaactgggtgaagcagaggcctggac agggcctt gagtggattgaaagattggtcctggaagtggtagtactactacaatgagaagttcaag ggcaaggc cacactgactgcagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacat ctgaggac

		tctgcagtctatttctgtgcaagaactggttactacgttggttactatgctatggactactgg ggcaagg aacctcagtcaccgtctcctca
87	Аминокислота тяжелой цепи против MSLN (MHC1452HC.4)	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTIYGISWVK QRTGQ GLEWIGEIYPRSDNTYYNEKFKGKATLT ADKS S ST AYMELRSLT SEDSAVYFCARWYSFYAMDYWGQGTSVTVSS
88	ДНК тяжелой цепи против MSLN (MHC1452HC.4)	caggttcagctgcagcagctctggagctgagctggcgaggcctggggcttcagtgaagg tgtcctgca aggcttctggctacaccttcacaatctatggtataagctgggtgaaacagagaactggac agggcctt gagtggattggagagattatcctagaagtataataactactacaatgagaagttcaagg gcaaggcc aactgactgcagacaaatcctccagcacagcgtacatggagctccgcagcctgacat ctgaggact ctgcgtctatttctgtgcaagatggtactcgttctatgctatggactactggggcaagga acctcagtc accgtctcctca
89	Однодоменное связующее антитело 1 против MSLN (SD1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGDWSANFMYW YRQAPG KQRELVARISGRGVVDYVESVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLR AEDTAVYYCAVASYWGQGLVTVSS
90	Однодоменное связующее антитело 4 против MSLN (SD4)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTSSINTMYWYR QAPGK ERELVAFISSGGSTNVRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ NSLRAE DT AVYYCNTYIP YGGTLHDFWGQGLVT VS S
91	Однодоменное связующее антитело 6 против MSLN (SD6)	QVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSTFSIRAMRWY RQAPGT ERDLVAVIYGSSTYYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQ NSLRAE DT AVYYCNADTIGTARDYWGQGLVTVS S
92	Иммунизационны й пептид MUC16	NF SPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRS S VLVDGYS PNRNEPLTGNSDLP
93	Модифицированн ый иммунизационный	NF SPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRS S VLVDGYS PNRNEPLTGNSDLP

	пептид MUC16	
94	Праймер A6E	GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG
95	Праймер PMCF	CTAGTGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGACCTGGGT
96	Универсальный обратный праймер	TCACACAGGAAACAGCTATGAC
97	Универсальный прямой праймер	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
98	Участок расщепления РНК-полимеразой	AAUAAA
99	Праймер MP057	TTATGCTTCCGGCTCGTATG

Примечания

[0498] Несмотря на то что в настоящем документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что данные варианты осуществления приведены исключительно с целью иллюстрации. Множество вариаций, изменений и замен будут очевидны специалистам в данной области техники без отхода от объема и сущности настоящего изобретения. Следует понимать, что различные альтернативные варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, могут применяться при практической реализации настоящего изобретения. Предполагается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем изобретения, и что способы и структуры в рамках этой формулы изобретения и их эквиваленты охвачены ею.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая

(I) первую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую первый гибридный белок (TFP - англ.: T cell receptor fusion protein) Т-клеточного рецептора (TCR - англ.: T cell receptor), содержащий

(a) субъединицу TCR, содержащую

(i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR,

(ii) трансмембранный домен, и

(iii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена, полученного только из субъединицы TCR, выбранной из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, гамма-цепи CD3, дельта-цепи CD3 и эpsilon-цепи CD3; и

(b) домен мышиного, человеческого или гуманизированного антитела, содержащий связывающий домен против MUC16,

причем субъединица TCR и связывающий домен против MUC16 функционально связаны, и при этом первый TFP функционально взаимодействует с TCR или внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке; и

(II) вторую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую второй TFP, содержащий

(a) субъединицу TCR, содержащую

(i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR,

(ii) трансмембранный домен, и

(iii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена, полученного только из субъединицы TCR, выбранной из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, гамма-цепи CD3, дельта-цепи CD3 и эpsilon-цепи CD3; и

(b) домен мышиного, человеческого или гуманизированного антитела, содержащий связывающий домен против мезотелина (MSLN - англ.: mesothelin),

причем субъединица TCR и связывающий домен против MSLN функционально связаны, и при этом второй TFP функционально взаимодействует с TCR или внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке.

2. Композиция, содержащая

(I) первую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую первый гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий

(a) субъединицу TCR, содержащую

- (i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR,
 - (ii) трансмембранный домен, и
 - (iii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена, полученного только из субъединицы TCR, выбранной из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, гамма-цепи CD3, дельта-цепи CD3 и эpsilon-цепи CD3; и
- (b) первый домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий связывающий домен против MUC16, и второй домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий связывающий домен против MSLN; причем субъединица TCR, первый домен антитела и второй домен антитела функционально связаны, и при этом первый TFP функционально взаимодействует с TCR или внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке.

3. Композиция, содержащая молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую:

- (a) первый гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR, первый домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который представляет собой связывающий домен против MUC16; и
 - (b) второй гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR, второй домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий второй антигенсвязывающий домен, который представляет собой связывающий домен против MSLN,
- причем субъединица TCR первого TFP и первый домен антитела функционально связаны, и субъединица TCR второго TFP и второй домен антитела функционально связаны.

4. Композиция, содержащая молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую:

- (a) первый гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR, первый домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который представляет собой связывающий домен против MUC16, и второй домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий второй антигенсвязывающий домен, который представляет собой связывающий домен против MSLN; и причем субъединица TCR первого TFP, первый домен антитела и второй домен антитела функционально связаны.

5. Композиция по любому из пп. 1–4, в которой внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальные домены субъединицы TCR первого TFP получены только из

субъединицы TCR, выбранной из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи CD3, дельта-цепи CD3 и эpsilon-цепи CD3.

6. Композиция по любому из пп. 1–5, в которой внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из субъединицы TCR, выбранной из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR и эpsilon-цепи TCR.

7. Композиция по п. 5 или п. 6, в которой внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR первого TFP получены только из альфа-цепи TCR.

8. Композиция по п. 5 или п. 6, в которой внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR первого TFP получены только из бета-цепи TCR.

9. Композиция по п. 5 или п. 6, в которой внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR первого TFP получены только из гамма-цепи CD3.

10. Композиция по п. 5 или п. 6, в которой внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR первого TFP получены только из дельта-цепи CD3.

11. Композиция по п. 5 или п. 6, в которой внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR первого TFP получены только из эpsilon-цепи CD3.

12. Композиция по любому из пп. 5–11, в которой внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из альфа-цепи TCR.

13. Композиция по любому из пп. 5–11, в которой внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из бета-цепи TCR.

14. Композиция по любому из пп. 5–11, в которой внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из гамма-цепи CD3.

15. Композиция по любому из пп. 5–11, в которой внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из дельта-цепи CD3.

16. Композиция по любому из пп. 5–11, в которой внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из

эпсилон-цепи CD3.

17. Композиция по любому из пп. 5–11, в которой внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из гамма-цепи TCR.

18. Композиция по любому из пп. 5–11, в которой внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены субъединицы TCR второго TFP получены только из дельта-цепи TCR.

19. Композиция по любому из пп. 3–16, в которой первый TFP, второй TFP или и тот, и другой внедряются в TCR или функционально взаимодействуют с TCR при экспрессии в T-клетке.

20. Композиция по любому из пп. 3–19, в которой первый TFP, второй TFP или и тот, и другой внедряются в TCR или функционально взаимодействуют с TCR при экспрессии в T-клетке.

21. Композиция по любому из пп. 1–20, в которой кодируемый первый антигенсвязывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR первого TFP посредством первой линкерной последовательности, кодируемый второй антигенсвязывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR второго TFP посредством второй линкерной последовательности, или и первый антигенсвязывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR первого TFP посредством первой линкерной последовательности, и кодируемый второй антигенсвязывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR второго TFP посредством второй линкерной последовательности.

22. Композиция по п. 21, в которой первая линкерная последовательность и вторая линкерная последовательность содержат $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 4.

23. Композиция по любому из пп. 1–22, в которой субъединица TCR первого TFP, субъединица TCR второго TFP или и та, и другая содержат внеклеточный домен TCR.

24. Композиция по любому из пп. 1–23, в которой субъединица TCR первого TFP, субъединица TCR второго TFP или и та, и другая содержат трансмембранный домен TCR.

25. Композиция по любому из пп. 1–24, в которой субъединица TCR первого TFP, субъединица TCR второго TFP или и та, и другая содержат внутриклеточный домен TCR.

26. Композиция по любому из пп. 1–25, в которой субъединица TCR первого TFP, субъединица TCR второго TFP или и та, и другая содержат (i) внеклеточный домен TCR, (ii) трансмембранный домен TCR и (iii) внутриклеточный домен TCR, причем по меньшей мере два из (i), (ii) и (iii) относятся к одной субъединице TCR.

27. Композиция по любому из пп. 1–26, в которой субъединица TCR первого TFP,

субъединица TCR второго TFP или и та, и другая содержат внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен, выбранный из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, или аминокислотную последовательность, имеющую в дополнение по меньшей мере одну модификацию.

28. Композиция по любому из пп. 1–27, в которой субъединица TCR первого TFP, субъединица TCR второго TFP или и та, и другая содержат внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен, выбранный из функционального сигнального домена 4-1BB и/или функционального сигнального домена CD3 дзета, или аминокислотную последовательность, имеющую в дополнение по меньшей мере одну модификацию.

29. Композиция по любому из пп. 1–28, в которой первый домен человеческого или гуманизированного антитела, второй домен человеческого или гуманизированного антитела, или и тот, и другой содержат фрагмент антитела.

30. Композиция по любому из пп. 1–29, в которой первый домен человеческого или гуманизированного антитела, второй домен человеческого или гуманизированного антитела, или и тот, и другой содержат scFv или домен V_H.

31. Композиция по любому из пп. 1–30, кодирующая (i) CDR1 легкой цепи (LC), CDR2 LC и CDR3 LC аминокислотной последовательности связывающего домена легкой цепи с 70–100% идентичности последовательности с последовательностью легкой цепи из таблицы 2 и/или (ii) CDR1 тяжелой цепи (HC), CDR2 HC и CDR3 HC последовательности тяжелой цепи из таблицы 2.

32. Композиция по любому из пп. 1–31, кодирующая переменный участок легкой цепи, причем переменный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи из таблицы 2, или последовательность с 95–99% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного участка легкой цепи из таблицы 2.

33. Композиция по любому из пп. 1–32, кодирующая переменный участок тяжелой цепи, причем переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций аминокислотной последовательности переменного участка тяжелой цепи из таблицы 2, или последовательность с 95–99% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного участка тяжелой цепи из таблицы 2.

34. Композиция по любому из пп. 1–33, в которой кодируемый первый TFP, кодируемый второй TFP или и тот, и другой включают в себя внеклеточный домен субъединицы TCR,

которая содержит внеклеточный домен, или его часть, из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

35. Композиция по любому из пп. 1–34, в которой кодируемый первый TFP и кодируемый второй TFP включают в себя трансмембранный домен, который включает трансмембранный домен из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

36. Композиция по любому из пп. 1–35, в которой кодируемый первый TFP и кодируемый второй TFP включают в себя трансмембранный домен, который включает трансмембранный домен из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, дзета-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

37. Композиция по любому из пп. 1–36, дополнительно содержащая последовательность, кодирующую костимулирующий домен.

38. Композиция по п. 37, в которой костимулирующий домен является функциональным сигнальным доменом, полученным из белка, выбранного из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137), а также их аминокислотных последовательностей, имеющих в дополнение по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

39. Композиция по любому из пп. 1–38, дополнительно содержащая последовательность, кодирующую внутриклеточный сигнальный домен.

40. Композиция по любому из пп. 1–39, дополнительно содержащая лидерную последовательность.

41. Композиция по любому из пп. 1–40, дополнительно содержащая участок расщепления протеазой.

42. Композиция по любому из пп. 1–41, в которой по меньшей мере одна, но не более 20 модификаций включают модификацию аминокислоты, которая опосредует клеточную сигнализацию, или модификацию аминокислоты, которая фосфорилируется в ответ на

связывание лиганда с первым TFP, со вторым TFP или и с тем, и с другим.

43. Композиция по любому из пп. 1–42, в которой молекула выделенной нуклеиновой кислоты представляет собой мРНК.

44. Композиция по любому из пп. 1–43, в которой первый TFP, второй TFP или и тот, и другой включают в себя иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM - англ.: immunoreceptor tyrosine-based activation motif) субъединицы TCR, которая содержит ITAM, или его часть, из белка, выбранного из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эpsilon, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, дзета-цепи TCR, цепи Fc-epsilon-рецептора 1, цепи Fc-epsilon-рецептора 2, цепи Fc-гамма-рецептора 1, цепи Fc-гамма-рецептора 2a, цепи Fc-гамма-рецептора 2b1, цепи Fc-гамма-рецептора 2b2, цепи Fc-гамма-рецептора 3a, цепи Fc-гамма-рецептора 3b, цепи Fc-бета-рецептора 1, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих в дополнение по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

45. Композиция по п. 44, в которой ITAM замещает ITAM CD3 гамма, CD3 дельта или CD3 эpsilon.

46. Композиция по п. 44, в которой ITAM выбран из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эpsilon, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта, и замещает другой ITAM, выбранный из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эpsilon, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта.

47. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–46, дополнительно содержащая лидерную последовательность.

48. Композиция, содержащая полипептидную молекулу, кодируемую молекулой нуклеиновой кислоты из композиций по любому из пп. 1–47.

49. Композиция по п. 48, в которой полипептид содержит первый полипептид, кодируемый первой молекулой нуклеиновой кислоты, и второй полипептид, кодируемый второй молекулой нуклеиновой кислоты.

50. Композиция, содержащая молекулу рекомбинантного TFP, кодируемую молекулой нуклеиновой кислоты из композиций по любому из пп. 1–47.

51. Композиция, содержащая вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептидную молекулу или молекулу рекомбинантного TFP по любому из пп. 48–50.

52. Композиция по п. 51, в которой вектор содержит а) первый вектор, содержащий первую

молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый TFP; и b) второй вектор, содержащий вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй TFP.

53. Композиция по п. 51 или п. 52, в которой вектор выбран из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, вектора на основе вируса саркомы Рауса (VCR) или ретровирусного вектора.

54. Композиция по любому из пп. 51–53, дополнительно содержащая промотор.

55. Композиция по любому из пп. 51–54, в которой вектор представляет собой транскрибированный *in vitro* вектор.

56. Композиция по любому из пп. 51–55, в которой молекула нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно кодирует поли(A)-хвост.

57. Композиция по любому из пп. 51–56, в которой молекула нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно кодирует 3'UTR.

58. Композиция по любому из пп. 51–57, в которой молекула нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно кодирует участок расщепления протеазой.

59. Композиция, содержащая клетку, содержащую композицию по любому из пп. 1–58.

60. Композиция по п. 59, в которой клетка представляет собой человеческую Т-клетку.

61. Композиция по п. 60, в которой Т-клетка представляет собой CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетку.

62. Композиция по любому из пп. 59–61, дополнительно содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанной со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена.

63. Композиция по п. 62, в которой ингибирующая молекула содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть PD1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и домен первичной сигнализации.

64. Вектор, содержащий последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–63.

65. Вектор, содержащий первую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 1 или п. 2.

66. Вектор, содержащий вторую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 1 или п. 2.

67. Клетка, содержащая композицию по любому из пп. 1–63 или вектор по любому из пп. 64–66.

68. Клетка, содержащая вектор по п. 65.

69. Клетка, содержащая вектор по п. 66.
70. Клетка любому из пп. 67–69, в которой клетка представляет собой Т-клетку человека.
71. Клетка по п. 70, в которой Т-клетка представляет собой CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетку.
72. Клетка по любому из пп. 67–71, дополнительно содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанной со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена.
73. Клетка по п. 72, в которой ингибирующая молекула содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть PD1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и домен первичной сигнализации.
74. Человеческая CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетка, содержащая по меньшей мере две молекулы TFP, содержащие связывающий домен против MUC16, связывающий домен против MSLN, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR в человеческой CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетке, около нее и/или на ее поверхности.
75. Белковый комплекс, содержащий:
- i) первую молекулу TFP, содержащую связывающий домен против MUC16, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR;
 - ii) вторую молекулу TFP, содержащую связывающий домен против MSLN, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; и
 - iii) по меньшей мере одну эндогенную субъединицу TCR или эндогенный комплекс TCR.
76. Белковый комплекс, содержащий:
- i) молекулу TFP, содержащую связывающий домен против MUC16, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; и
 - ii) по меньшей мере одну эндогенную субъединицу TCR или эндогенный комплекс TCR.
77. Белковый комплекс, содержащий:
- i) молекулу TFP, содержащую связывающий домен против MSLN, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; и
 - ii) по меньшей мере одну эндогенную субъединицу TCR или эндогенный комплекс TCR.
78. Белковый комплекс по любому из пп. 75–77, в котором TCR содержит внеклеточный домен, или его часть, из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-

цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта.

79. Белковый комплекс по любому из пп. 76–78, в котором связывающий домен против MUC16, связывающий домен против MSLN или и тот, и другой соединены с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности.

80. Белковый комплекс по п. 79, в котором линкерная область содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 1 до 4.

81. Человеческая CD8+ или CD4+ Т-клетка, содержащая по меньшей мере два различных белка TFP на белковый комплекс по любому из пп. 75–79.

82. Человеческая CD8+ или CD4+ Т-клетка, содержащая по меньшей мере две различные молекулы TFP, кодируемые выделенной молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–63.

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

84. Популяция человеческих CD8+ или CD4+ Т-клеток, причем Т-клетки популяции отдельно или в совокупности содержат по меньшей мере две молекулы TFP, кодируемые молекулой рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–63.

85. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество композиции по любому из пп. 1–63, вектор по любому из пп. 64–66, клетку по любому из пп. 67–69 или белковый комплекс по любому из пп. 75–80 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

86. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество клетки по п. 68, клетки по п. 69 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

87. Способ лечения млекопитающего с заболеванием, связанным с экспрессией MSLN или MUC16, включающий в себя введение млекопитающему эффективного количества композиции по любому из пп. 1–63.

88. Способ по п. 87, в котором заболевание, связанное с экспрессией MUC16 или MSLN, выбрано из группы, состоящей из пролиферативного заболевания, рака, злокачественной опухоли, миелодисплазии, миелодиспластического синдрома, предлейкоза,

неассоциированного с раком признака, связанного с экспрессией MUC16, неассоциированного с раком признака, связанного с экспрессией MSLN, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака кожи, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака почки, рака печени, рака головного мозга, лимфомы, лейкоза, рака легкого, рака пищевода, рака желудка и неоперабельного рака яичника с рецидивирующим или рефрактерным заболеванием.

89. Способ по п. 87, в котором заболевание представляет собой рак крови, выбранный из группы, состоящей из В-клеточного острого лимфоидного лейкоза (В-ОЛЛ), Т-клеточного острого лимфоидного лейкоза (Т-ОЛЛ), острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ); хронического миелолейкоза (ХМЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, бластного образования из плазмоцитоидных дендритных клеток, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, мелкоклеточной фолликулярной лимфомы, крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественных лимфопролиферативных состояний, MALT-лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, лимфомы из клеток маргинальной зоны, множественной миеломы, миелодисплазии, миелодиспластического синдрома, неходжкинской лимфомы, плазмабластической лимфомы, новообразования из плазмоцитоидных дендритных клеток, макроглобулинемии Вальденстрема, предлейкоза, заболевания, связанного с экспрессией MUC16 или MSLN, и их комбинаций.

90. Способ по п. 87, в котором клетки, экспрессирующие первую молекулу TFP и вторую молекулу TFP, вводятся в комбинации с веществом, которое повышает эффективность клетки, экспрессирующей первую молекулу TFP и вторую молекулу TFP.

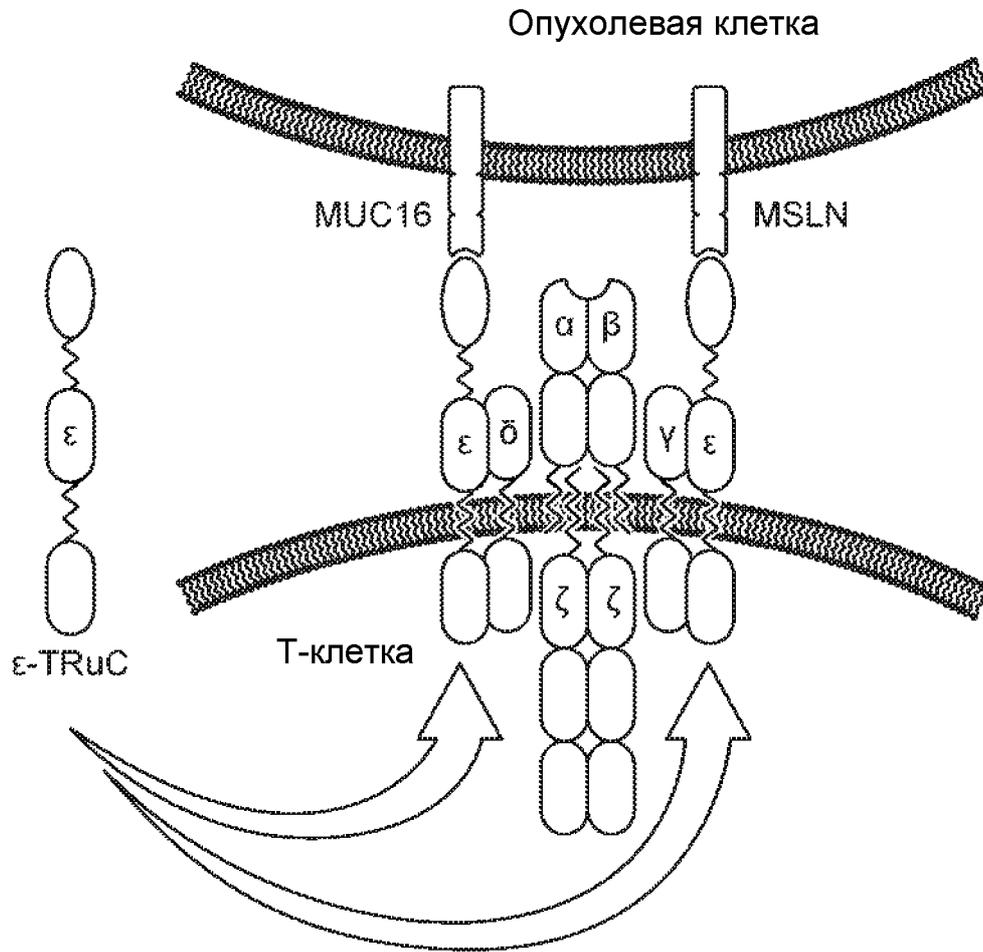
91. Способ по любому из пп. 87–90, в котором у млекопитающего высвобождается меньше цитокинов по сравнению с млекопитающим, которому вводят эффективное количество Т-клеток, экспрессирующих:

- (a) химерный антигенный рецептор (CAR) против MSLN;
- (b) CAR против MUC16;
- (c) CAR против MSLN и CAR против MUC16 или
- (d) их комбинацию.

92. Способ по любому из пп. 87–91, в котором клетки, экспрессирующие первую молекулу TFP и вторую молекулу TFP, вводятся в комбинации с веществом, которое облегчает один или более побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей первую молекулу TFP и вторую молекулу TFP.

93. Способ по любому из пп. 87–92, в котором клетки, экспрессирующие первую молекулу

TFP и вторую молекулу TFP, вводятся в комбинации с веществом, которое лечит заболевание, связанное с MSLN или MUC16.



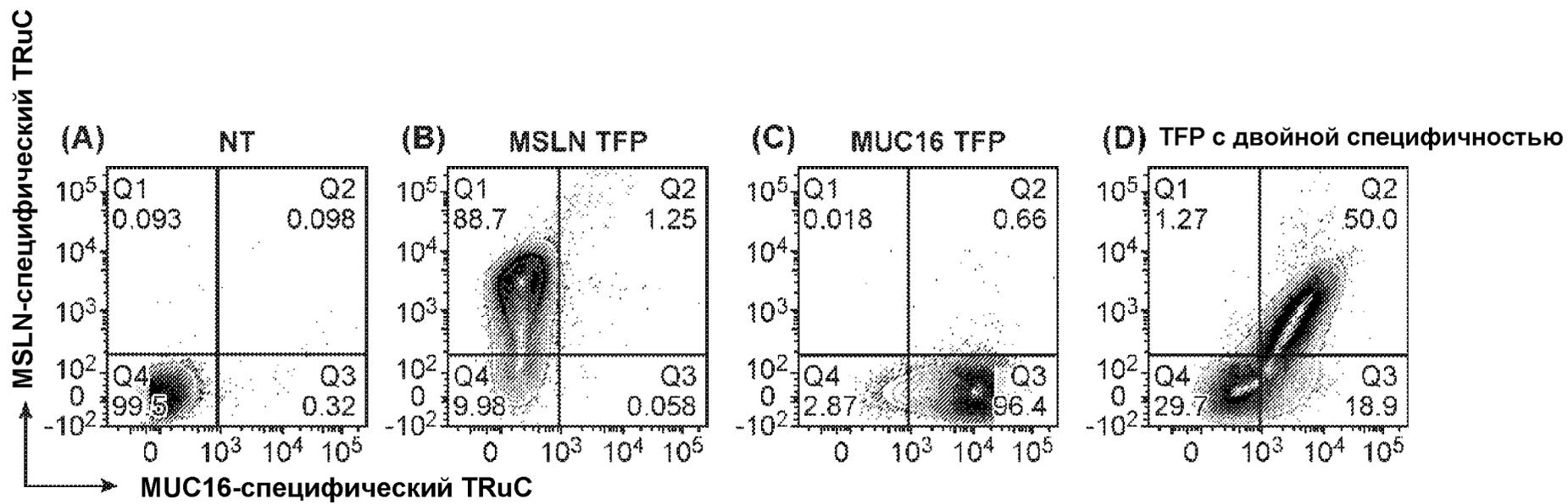
ФИГ. 1

Эктодоменный пептид MUC16

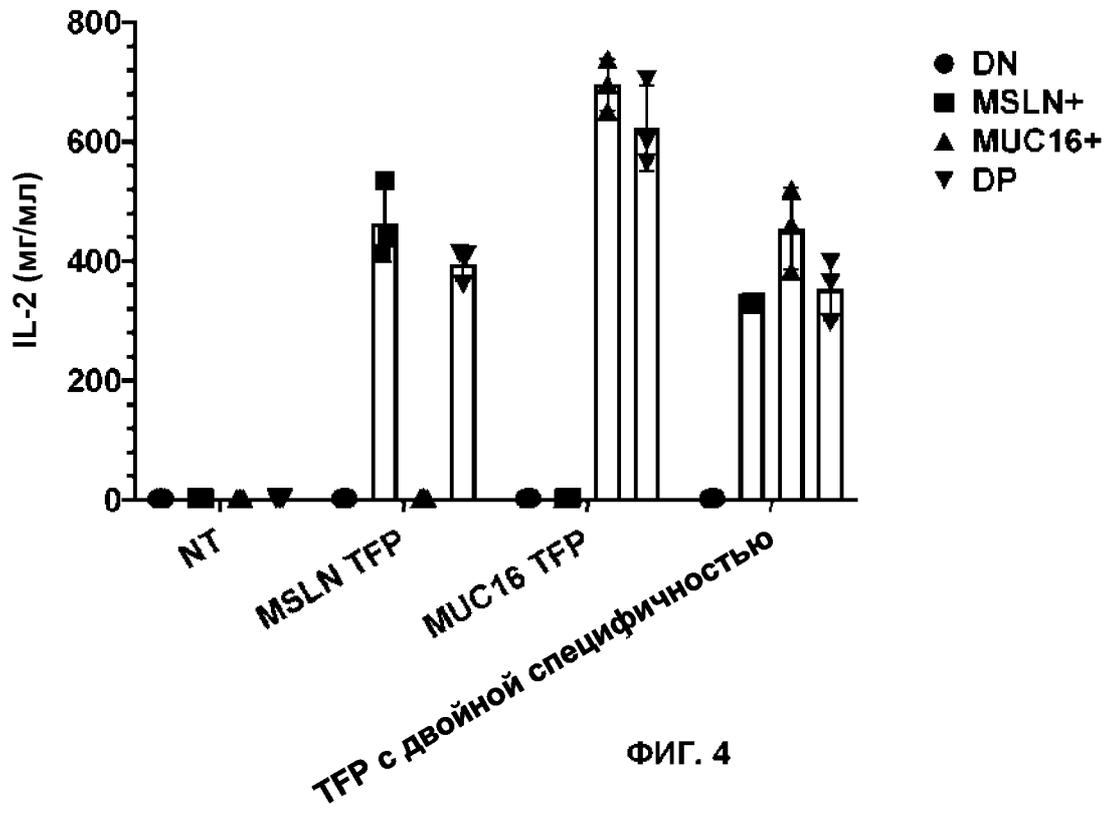


ФИГ. 2

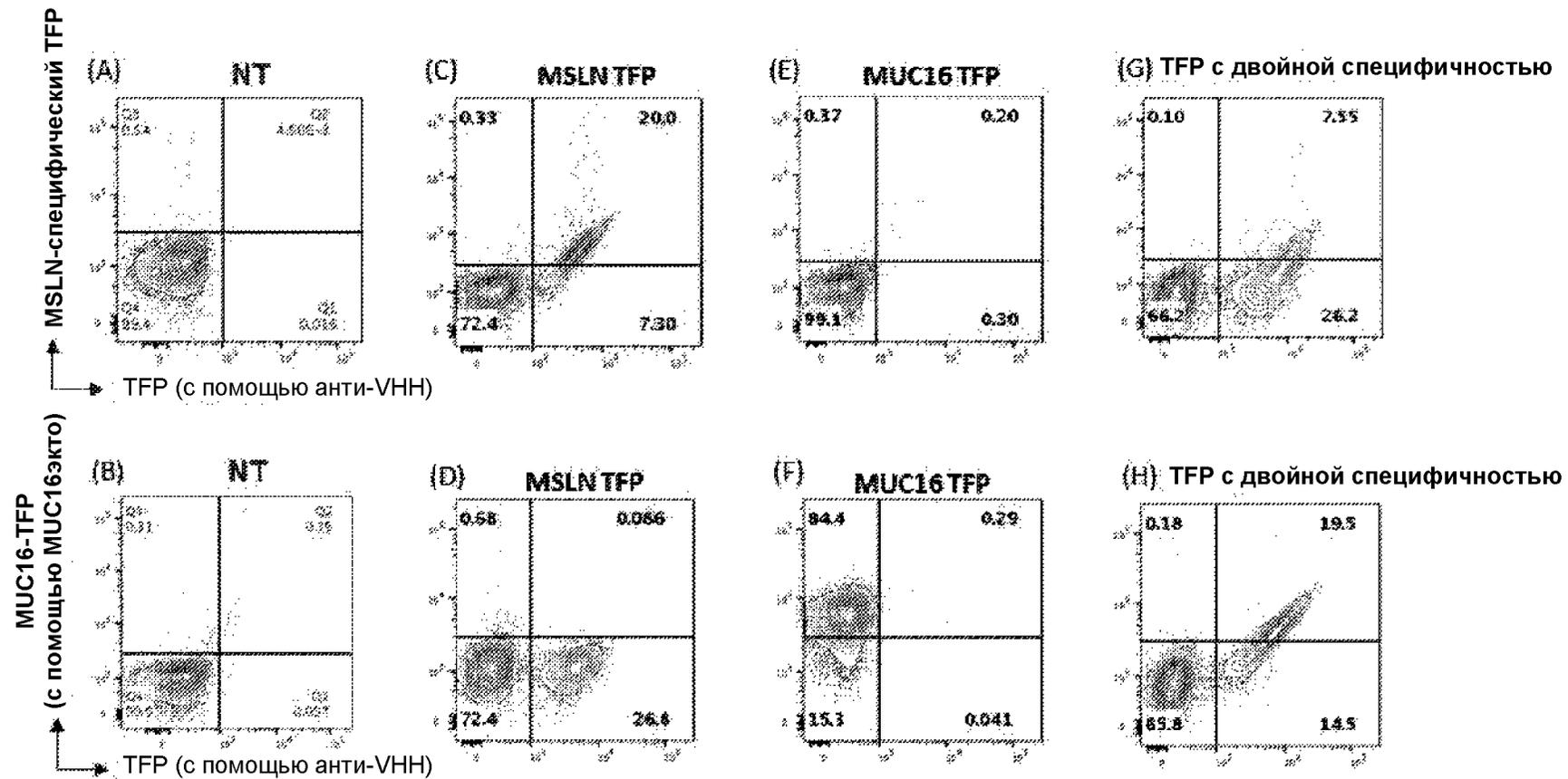
ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)



ФИГ. 3



ФИГ. 4



ФИГ. 5

