

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202191012 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.08.17

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

(22) Дата подачи заявки
2019.11.08

(54) Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, СПЕЦИФИЧНЫЕ К МЕЗОТЕЛИНУ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ИММУНОТЕРАПИИ

(31) 62/758,397

(32) 2018.11.09

(33) US

(86) PCT/US2019/060570

(87) WO 2020/097530 2020.05.14

(88) 2020.07.23

(71) Заявитель:

ФРЕД ХАТЧИНСОН КЭНСЕР
РИСЕРЧ СЕНТЕР; ДЖУНО
ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

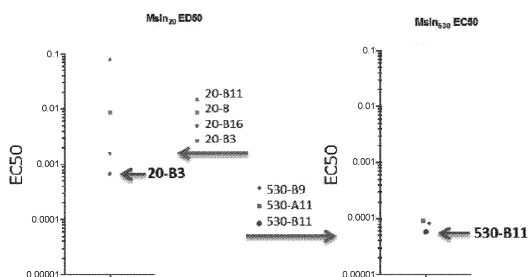
(72) Изобретатель:

Шмитт Томас М., Шапюи Од Дж.,
Гринберг Филип Д. (US)

(74) Представитель:

Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.,
Алексеев В.В. (RU)

(57) В данном документе представлены связывающие белки, специфичные к пептидам Msln20-28 или Msln530-538. Также представлены полинуклеотиды, кодирующие связывающие белки, а также композиции и рекомбинантные клетки-хозяева, содержащие связывающие белки или полинуклеотиды. Композиции и рекомбинантные клетки-хозяева можно использовать для лечения субъекта, имеющего мезотелиому, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак легких, рак, где пептид Msln20-28 экспрессируется на опухолевой клетке указанного злокачественного образования, или рак, где пептид Msln530-538 экспрессируется на опухолевой клетке указанного злокачественного образования.



A1

202191012

202191012

A1

Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, СПЕЦИФИЧНЫЕ К МЕЗОТЕЛИНУ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ИММУНОТЕРАПИИ

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0001] Перечень последовательностей, рассматриваемый вместе с настоящей заявкой, обеспечен в текстовом формате вместо бумажной копии и, таким образом, включен в описание посредством ссылки. Наименование текстового файла, содержащего список последовательностей, 360056_475WO_SEQUENCE_LISTING.txt. Текстовый файл размером 115 КБ создан 8 ноября 2019 г. и подан в электронном виде через электронную файловую систему в сети Интернет.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Настоящее изобретение относится к области биомедицины и, в частности, к способам и композициям, применимым для применения в лечении заболеваний или расстройств, при которых клетки экспрессируют мезотелин, например, при терапии рака. В частности, варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам и композициям TCR (Т-клеточный рецептор) с высокой аффинностью к опухолеассоциированному антигену мезотелину, Т-клеткам, экспрессирующим такие высокоаффинные антиген-специфические TCR, нуклеиновым кислотам, их кодирующим, и способам применения для проведения клеточной иммунотерапии, включая рекомбинантные Т-клетки.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Адоптивный перенос опухолеспецифических Т-клеток является привлекательной стратегией для устранения существующих опухолей и требует создания устойчивой популяции антиген-специфических Т-клеток *in vivo* для устранения существующей опухоли и предотвращения рецидивов (см. Stromnes, et al., Immunol. Rev. 257: 145, 2014). Хотя перенос опухолеспецифических CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) является безопасным и может опосредовать прямую противоопухолевую активность у некоторых пациентов (см. Chapuis et al., Cancer Res. 72:LB-136, 2012, Chapuis et al., Sci. Transl. Med. 5: 174ral27, 2013, и Chapuis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 09:4592, 2012), вариабельность авидности ЦТЛ, полученных от каждого пациента или донора, ограничивает противоопухолевую эффективность в клинических испытаниях (см. Chapuis et al., 2013). Поскольку аффинность TCR является важной детерминантой авидности ЦТЛ (см. Zoete et al., Frontiers Immunol. 4:26 %, 2013),

были разработаны стратегии для перенаправления антигенной специфичности Т-клеток донора или пациента с применением высокоаффинных генов TCR α/β , полученных из хорошо охарактеризованного клона Т-клеток, специфичного к опухолеспецифическому антигену (см. Stromnes et al., Immunol. Rev. 257: 145, 2014 и Robbins et al., J. Clin. Oncol. 29: 917, 2011).

[0004] Такие высокоаффинные ауто/опухолереактивные Т-клетки встречаются редко, поскольку Т-клетки, экспрессирующие ауто/опухолереактивные TCR, подвержены центральной и периферической толерантности (см. Stone and Kranz, Frontiers Immunol. 4:244, 2013), с относительной аффинностью TCR, сильно различающейся у разных доноров. Таким образом, многие подходящие доноры должны быть подвергнуты скринингу для выявления достаточно высокоаффинного опухолеспецифического клона Т-клеток, из которого может быть получена конструкция для генной терапии TCR α/β . Например, выделение естественно выделяемого TCR, специфичного к антигену опухоли Вильмса 1 (WT1) с высокофункциональной авидностью в отношении одного HLA-аллеля (HLA – человеческий лейкоцитарный антиген), потребовало скрининга сотен WT-специфических линий Т-клеток, представляющих тысячи отдельных клонов Т-клеток из периферического репертуара от более 75 нормальных доноров, и представляет собой очень затратный по времени и трудозатратам процесс (см. Chapuis et al., 2013, Schmitt et al., Hum. Gene Ther. 20:1240, 2009, и Ho et al., J. Immunol. Methods 310:40, 2006).

[0005] Существует потребность в альтернативных антиген-специфических иммунотерапевтических средствах, направленных против различных видов рака, таких как солидные опухоли. Варианты осуществления, описанные в данном документе, удовлетворяют эти потребности и обеспечивают другие соответствующие преимущества.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Варианты осуществления, описанные в данном документе, станут более очевидными на основе последующего описания и прилагаемой формулы изобретения, во взаимосвязи с сопроводительными графическими материалами.

[0006] На фиг. 1A показаны определение и отбор TCR, специфических в отношении Msln₂₀ (SEQ ID NO: 31), на основании кратного обогащения TCR для связывания тетрамера пептид:HLA. TCR, выбранный для дальнейших исследований, отмечен кружком.

[0007] На фиг. 1B показаны определение и отбор TCR, специфических в отношении Msln₅₃₀ (SEQ ID NO: 32), на основании кратного обогащения тетрамера из

пула TCR со связыванием с тетрамером Msln₅₃₀:HLA. TCR, отобранные для дальнейших исследований, отмечены кружком.

[0008] На фиг. 2 показано связывание тетрамера Msln₅₃₀-специфическими TCR (ранжированное по аффинности, основанное на связывании тетрамера) в анализах для определения того, способен ли экспрессируемый клетками TCR идентифицировать комплекс Msln₅₃₀ пептид:HLA в присутствии или в отсутствие ко- рецептора CD8. CD8-независимое связывание коррелирует с высокой аффинностью соответствующего клона Т-клетки.

[0009] На фиг. 3A-3C показаны дальнейшие функциональные анализы Msln-специфических TCR. (A) Характерные данные клона Т-лимфоцитов, оцененные в отношении антигенной активации, на основе линии репортерных клеток, экспрессирующих трансген Nur77-tdTomato, по данным проточной цитометрии. Nur77 представляет собой индикатор передачи сигналов через антигенный рецептор в Т-лимфоцитах человека (см., например, Ashouri and Weiss, J. Immunol. 198(2):657-658 (2017)). В данном анализе клон Т-лимфоцитов инкубировали с клетками-мишенями T2, активированными возрастающими концентрациями пептида, как показано. (B) Репортерную активность Nur77 TCR оценивали в соответствии с чувствительностью к T2-клеткам, активированным пептидом в указанной концентрации. (C) Ранжирование avidности TCR на основе значения EC₅₀ пептида в отношении репортерной активности Nur77. "B11" (также обозначаемый в настоящем документе как 11B) имел самое низкое значение EC₅₀ среди протестированных клонов TCR.

[0010] На фиг. 4 показана функциональная оценка клонов TCR в ответ на пептид на основе репортерной активности Nur77tomato. Некоторые TCR, включая "B9" и "A11" (также называемые в настоящем документе "11A"), придают высокую антигенную специфичность, несмотря на то, что проявляют более низкое связывание тетрамера. TCR ранжируются (слева направо и сверху вниз) в соответствии со связыванием тетрамера.

[0011] На фиг. 5A-5C показана функциональная оценка TCR, гетерологично экспрессируемых на первичных CD8⁺ Т-лимфоцитах. CD8⁺ Т-лимфоциты очищали от донорских МКПК и трансдуцировали посредством лентивируса каждый TCR. Через 8 дней клетки, которые были хорошо отсортированы как тетрамер-положительные, были дополнительно отсортированы и дополнительно размножены в течение от 8 до 10 дней.

[0012] На фиг. 6A-6C показаны характеристики первичных CD8⁺ Т-лимфоцитов, которые были трансдуцированы указанным Msln-специфическим TCR и оценены на функциональную активность при инкубации с T2-клетками, активированными пептидом,

по данным продукции интерферона-гамма (А, В). TCR ранжировали по значению EC50 на основании количества пептида, активировавшего клетки T2 (С).

[0013] На фиг. 7А-7D показан специфический лизис двух типичных Msln-положительных линий опухолевых клеток ((А, В) MDA-MB-468 и (С, D) MDA-MB-231) CD8⁺ Т-лимфоцитами, трансдуцированными указанным Msln₅₃₀-специфическим TCR или Msln₂₀-специфическим TCR и в присутствии или в отсутствие экзогенного IFN-γ.

[0014] На фиг. 8 представлен эксперимент по сканированию мутагенеза аланина для оценки того, какие аминокислоты целевого пептида Msln₂₀ (SEQ ID NO: 31) необходимы для эффективного связывания и уничтожения типичными Msln₂₀-специфическими TCR. Была создана серия вариантных пептидов, в которых аланин был заменен на каждое последующее положение вдоль пептида SEQ ID NO: 31, и каждый вариантный пептид оценивался на продукцию IFN-γ CD8⁺ Т-лимфоцитами, экспрессирующими указанный Msln₂₀-специфический TCR. Эти данные показывают, что положения 3-6 SEQ ID NO: 31 важны для связывания TCR. В консенсусной последовательности SEQ ID NO: 60 символ "X" указывает на то, что мутация по типу замены указанного остатка в SEQ ID NO: 31 на аланин не влияет или по существу не влияет на функциональное связывание TCR с его когнатной пептидной мишенью.

[0015] На фиг. 9А-9D показаны результаты экспериментов по аланин-сканирующему мутагенезу с применением TCR, специфичных в отношении Msln₂₀ (SEQ ID NO: 31) или Msln₅₃₀ (SEQ ID NO: 32). По оси абсцисс показан процент IFN-γ⁺ Т-клеток в ответ на каждый аланин-замещенный пептид. По оси ординат показана последовательность тестируемого пептида, где X обозначает, что этот остаток не требуется для специфичности TCR, на что указывает почти нормальная функциональная активность по сравнению с пептидом дикого типа.

[0016] На фиг. 10 показаны пептиды человека (SEQ ID NO: 63-77), которые были исследованы в отношении потенциальной перекрестной реактивности с целевым пептидом Msln₅₃₀ (SEQ ID NO: 32) на основе специфичности TCR, определенной экспериментами по сканированию аланина. Гены, кодирующие указанные пептиды, показаны в левой части таблицы. Консенсусные последовательности, содержащие основные остатки, идентифицированные аланиновым сканированием, вводили в алгоритмы прогнозирования, как описано в Примере 8.

[0017] На фиг. 11А и 11В показан анализ синтезированных пептидов с потенциальной гомологией с Msln₅₃₀ в протеоме человека. Как описано в примере 9, функциональную активность двух Msln₅₃₀-специфических TCR (фиг. 11А, фиг. 11В) при инкубации с клетками T2, активированными высокой дозой (10 мкМ) пептида, измеряли с

помощью IFN- γ . (B) Для пептидов, которые показали перекрестную реактивность с тестируемым TCR, для определения значения EC50 было выполнено дозозависимое титрование. TCR ранжировали по значению EC50 на основе количества пептида, активировавшего T2 клетки. Пептид № 10 получен от гена ENF. Этот ген кодирует белок, который принадлежит к подсемейству транскрипционных факторов ETS, характеризующемуся эпителиально-специфической экспрессией. ETS действует как транскрипционный репрессор и может участвовать в эпителиальной дифференцировке и канцерогенезе.

[0018] На фиг. 12A-12I показаны эксперименты по изучению потенциала аллореактивности Т-лимфоцитов, экспрессирующих типичный Msln-специфический TCR по настоящему изобретению (Meso20-3B, Meso530-11A или Meso530-11B), путем направленного воздействия на различные донорские лимфобластные клеточные линии (LCL) в присутствии или в отсутствии пептида дикого типа.

[0019] На фиг. 13A-13H представлен дополнительный анализ аллореактивности путем направленного воздействия на различные донорские LCL для оценки отсутствия перекрестной реактивности с другими подтипами HLA, как описано в примере 10. Как указано для клеточных линий FAN и GIM, Meso530-11B указывает на потенциальную реактивность в присутствии пептида (как показано в таблице) для аллелей, отличных от HLA-A2.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0020] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к связывающим белкам, которые содержат вариабельный домен альфа-цепи (V_α) TCR и вариабельный домен бета-цепи (V_β) TCR, и способны специфически связываться с эпитопом и/или пептидом Msln₂₀₋₂₈ или Msln₅₃₀₋₅₃₈ (Msln₂₀₋₂₈ (SLLFLLFSL, SEQ ID NO: 31)) и Msln₅₃₀₋₅₃₈ (SEQ ID NO: 32 (VLPLTVAEV)), также обозначены в данном документе как Msln₂₀ и M₅₃₀ соответственно), например, в комплексе пептид:HLA. В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, Msln-специфический связывающий белок способен связываться с комплексом пептид Msln:HLA, где пептид Msln содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31 или 32, и где HLA представляет собой или содержит HLA-A2, такой как HLA-A*02:01.

[0021] В некоторых вариантах осуществления Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок содержит: (a) TCR V_α , содержащую аминокислотную последовательность CDR3, как указано в SEQ ID NO: 33 или 35, и TCR V_β , где необязательно TCR V_β имеет последовательность по меньшей мере приблизительно на 85

% (т.е. по меньшей мере приблизительно на 85 %, 86 %, 87 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или более) идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 95 или 97, (b) TCR V_β, содержащую аминокислотную последовательность CDR3, как указано в SEQ ID NO: 34 или 36, и (b) TCR V_α, где необязательно TCR V_α имеет последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % (т.е. по меньшей мере приблизительно на 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или более) идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 96 или 98, или (c) TCR V_α, содержащую аминокислотную последовательность CDR3, как указано в SEQ ID NO: 33 или 35, где необязательно TCR V_α имеет последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 96 или 98, и TCR V_β, содержащую аминокислотную последовательность CDR3, как указано в SEQ ID NO: 34 или 36, где необязательно TCR V_β имеет последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 95 или 97.

[0022] Если специально не указано иное, в контексте настоящего описания идентичность последовательности "по меньшей мере приблизительно" указанного процента включает указанный процент ± 20 % от него, а также все целые и нецелые значения процентов выше определенного процента. Соответственно, идентичность "по меньшей мере приблизительно на 85 %" относительно указанной последовательности (например, любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-123) включает приблизительно 85 %, 86 %, 87 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100% идентичности к указанной последовательности, а также включает все нецелые значения процентов между двумя целыми процентами (например, 92,5 %, 99,1 % и т.д.).

[0023] В некоторых вариантах осуществления Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок содержит аминокислотную последовательность CDR3_α, как указано в SEQ ID NO: 33, и аминокислотную последовательность CDR3_β, как указано в SEQ ID NO: 34. В дополнительных вариантах осуществления связывающий белок содержит аминокислотную последовательность CDR1_α, как указано в SEQ ID NO: 80, аминокислотную последовательность CDR2_α, как указано в SEQ ID NO: 81 или 118, аминокислотную последовательность CDR1_β, как указано в любой из последовательностей SEQ ID NO: 78, 82, 83 или 84, и аминокислотную последовательность CDR2_β, как указано в SEQ ID NO: 79. В некоторых вариантах осуществления V_α содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в

SEQ ID NO: 96, и/или V_{β} содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 95, где необязательно в CDR1 α , CDR2 α , CDR1 β и/или CDR2 β нет изменений.

[0024] В некоторых вариантах осуществления Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок содержит (i) TCR V_{β} , содержащую (a) аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRBV12-4*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRBV12-4*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105 или 108 смежных аминокислот в длину), и/или (b) аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRBJ2-7*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRBJ2-7*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 аминокислот в длину), и/или (ii) TCR V_{α} , содержащую (a) аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRAV1-1*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRAV1-1*01, то есть по меньшей мере приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105 или 107 смежных аминокислот в длину) и/или (b) аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRAJ3*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRAJ3*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот в длину).

[0025] В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, TCR V_{β} может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRBD1*01 или TRBD2*02.

[0026] Аминокислотные последовательности, кодируемые этими и другими генами TCR, известны и могут быть найдены, например, в сети Интернет на сайте imgt.org, где представлены таблицы генов, а также нуклеотидные и аминокислотные последовательности для человеческих аллелей TRAV, TRBV, TRAJ, TRBJ, TRBD, TRAC и TRBD.

[0027] В некоторых вариантах осуществления Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок содержит аминокислотную последовательность CDR3 α , как указано в

SEQ ID NO: 36, и аминокислотную последовательность CDR3 β , как указано в SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок дополнительно содержит аминокислотную последовательность CDR1 α , как указано в SEQ ID NO: 85, аминокислотную последовательность CDR2 α , как указано в SEQ ID NO: 86 или 119, аминокислотную последовательность CDR1 β , как указано в любой из последовательностей SEQ ID NO: 82, 83 или 84 и аминокислотную последовательность CDR2 β , как указано в SEQ ID NO: 79. В некоторых вариантах осуществления V α содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 98, и/или V β содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 97, где необязательно нет изменений в CDR1 α , CDR2 α , CDR1 β и/или CDR2 β .

[0028] В некоторых вариантах осуществления Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок содержит TCR V α , содержащую (а) аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRAV12-3*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRAV12-3*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105 или 108 смежных аминокислот в длину) и/или (b) аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRA29*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRAJ29*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19 аминокислот в длину).

[0029] В некоторых вариантах осуществления аланиновый мутагенез любого одного или более остатков 1, 2, 7, 8 или 9 последовательности SEQ ID NO: 31 не подавляет или по существу не ухудшает связывание Msln₂₀₋₂₈-специфическим связывающим белком. В некоторых вариантах осуществления Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок способен связываться с пептидом, содержащим или состоящим из консенсусной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 60, например, в комплексе пептид:HLA, как описано в настоящем документе.

[0030] В некоторых вариантах осуществления Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок содержит: (а) TCR V α , содержащую аминокислотную последовательность CDR3, как указано в SEQ ID NO: 37 или 39, и TCR V β , где TCR V β необязательно имеет последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 99 или 101,

(b) TCR V_β , содержащую аминокислотную последовательность CDR3, как указано в SEQ ID NO: 34 или 36, и (b) TCR V_α , где TCR V_α необязательно имеет последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 100 или 102, или (c) TCR V_α , содержащую аминокислотную последовательность CDR3, как указано в SEQ ID NO: 37 или 39, и TCR V_β , содержащую аминокислотную последовательность CDR3, как указано в SEQ ID NO: 38 или 40.

[0031] В некоторых вариантах осуществления Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок содержит аминокислотную последовательность CDR3 α , как указано в SEQ ID NO: 37, и аминокислотную последовательность CDR3 β , как указано в SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок дополнительно содержит аминокислотную последовательность CDR1 α , как указано в SEQ ID NO: 89, аминокислотную последовательность CDR2 α , как указано в SEQ ID NO: 90, аминокислотную последовательность CDR1 β , как указано в любой из SEQ ID NO: 83 или 87, и аминокислотную последовательность CDR2 β , как указано в SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления V_α содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 100, и/или V_β содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 99, где необязательно нет изменений в CDR1 α , CDR2 α , CDR1 β и/или CDR2 β .

[0032] В некоторых вариантах осуществления Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок содержит аминокислотную последовательность CDR3 α , как указано в SEQ ID NO: 39, и аминокислотную последовательность CDR3 β , как указано в SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок дополнительно содержит аминокислотную последовательность CDR1 α , как указано в SEQ ID NO: 93, аминокислотную последовательность CDR2 α , как указано в SEQ ID NO: 94, аминокислотную последовательность CDR1 β , как указано в любой из SEQ ID NO: 83, 84 или 91, и аминокислотную последовательность CDR2 β , как указано в SEQ ID NO: 92. В некоторых вариантах осуществления V_α содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 102, и/или V_β содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 101, где необязательно нет изменений в CDR1 α , CDR2 α , CDR1 β и/или CDR2 β .

[0033] В некоторых вариантах осуществления Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок содержит TCR V_β, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRBJ2-3*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRBJ2-3*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 15 смежных аминокислот в длину).

[0034] В некоторых вариантах осуществления аланиновый мутагенез любого одного или более остатков 3, 5, 6 или 9 последовательности SEQ ID NO: 32 не подавляет или по существу не ухудшает связывание Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфическим связывающим белком. В некоторых вариантах осуществления Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок способен связываться с пептидом, содержащим или состоящим из консенсусной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 61, например, в комплексе пептид:HLA, как описано в настоящем документе.

[0035] В некоторых вариантах осуществления аланиновый мутагенез любого одного или более остатков 1, 5 или 9 последовательности SEQ ID NO: 32 не подавляет или по существу не ухудшает связывание Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфическим связывающим белком. В некоторых вариантах осуществления Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок способен связываться с пептидом, содержащим или состоящим из консенсусной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 62, например, в комплексе пептид:HLA, как описано в настоящем документе.

[0036] В некоторых вариантах осуществления Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок по настоящему изобретению не связывается или не связывается специфически относительно Msln₅₃₀₋₅₃₈ с комплексом пептид:HLA, где пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой одной или более последовательности SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76 и 77, и где HLA необязательно содержит HLA-A2, такой как HLA-A:02*01.

[0037] В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, Msln-специфический связывающий белок (т.е. Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок, Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок) способен связываться с комплексом пептид Msln:HLA, как описано в настоящем документе, в отсутствие CD8 или независимо от него. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок (например, при экспрессии на клеточной поверхности Т-лимфоцита человека) имеет значение EC₅₀ пептида Msln составляет приблизительно 9 мкМ, приблизительно 8 мкМ, приблизительно 7 мкМ, приблизительно 6 мкМ, приблизительно 5 мкМ, приблизительно 4 мкМ, приблизительно 3 мкМ, приблизительно 2 мкМ, приблизительно 1 мкМ,

приблизительно 0,9 мкМ, приблизительно 0,8 мкМ, приблизительно 0,7 мкМ, приблизительно 0,6 мкМ, приблизительно 0,5 мкМ, приблизительно 0,4 мкМ, приблизительно 0,3 мкМ, приблизительно 0,2 мкМ или менее.

[0038] Msln-специфические связывающие белки не являются аллореактивными в отношении различных типов HLA человека в отсутствие пептидного антигена Msln. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка (например, Т-клетка), экспрессирующая Msln-специфический связывающий белок по настоящему изобретению, не продуцирует IFN- γ и/или не проявляет активации (например, экспрессия CD8, экспрессия CD3, экспрессия Nur77) и/или цитотоксической активности (например, специфическое уничтожение, продуцирование и высвобождение перфорина и/или гранзима) при контакте с клеткой, экспрессирующей: (i) HLA-C6:02:01, (ii) HLA-B13:01:01 без HLA-B13:02:01, (iii) HLA-A3, (iv) HLA-A29, (v) HLA-B40, (vi) HLA-B44, (vii) HLA-C3, (viii) HLA-C16, (ix) HLA-A1, (x) HLA-24, (xi) HLA-B7, (xii) HLA-B57, (xiii) HLA-C7, (xiv) HLA-A11, (xv) HLA-B15, (xvi) HLA-C4, (xvii) HLA-C12, (xviii) HLA-B8, (xix) HLA-B49, (xx) HLA-B51, (xxi) HLA-C15, (xxii) HLA-A30, (xxiii) HLA-A68, (xxiv) HLA-C2, (xxv) HLA-A32, (xxvi) HLA-A33, (xxvii) HLA-B55, (xxviii) HLA-C1, (xxvix) HLA-C5, (xxix) HLA-B8, (xxx) HLA-B35, или (xxxi) любую комбинацию с (i) по (xxx) в отсутствие пептида Msln, как описано в настоящем документе.

[0039] Настоящее изобретение также относится к композициям и рекомбинантным клеткам-хозяевам (например, иммунным клеткам, таким как Т-клеткам), включающим, кодирующим и/или экспрессирующим связывающие белки. В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, связывающий белок способен экспрессироваться на клеточной поверхности Т-клеткой-хозяином. В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, связывание Msln-специфическим связывающим белком, который экспрессируется на поверхности иммунной клетки (например, Т-лимфоцита), комплекса пептид Msln:HLA активирует иммунную клетку, где активация необязательно определяется экспрессией и/или активностью Nur77.

[0040] Связывающие белки, описанные в данном документе, являются высокочувствительными к когнатному пептидному антигену Msln. В некоторых вариантах осуществления экспрессия Nur77 увеличивается, когда иммунная клетка находится в присутствии приблизительно 10^{-2} мкМ пептида, приблизительно 10^{-1} мкМ пептида, приблизительно 1 мкМ пептида или приблизительно 10^1 мкМ пептида, где пептид необязательно представлен антигенпрезентирующей клеткой, т.е. в комплексе пептид:HLA.

[0041] В другом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим мезотелин-специфический связывающий белок, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, включает полинуклеотид, имеющий по меньшей мере приблизительно 50 % идентичности последовательности (т.е. по меньшей мере приблизительно 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или более) к полинуклеотидной последовательности, указанной в любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-5, 9-13, 17-21, 25-27 и 120. Также настоящее изобретение относится к векторам, содержащим полинуклеотид.

[0042] Связывающие белки, описанные в данном документе, рекомбинантные клетки-хозяева и родственные композиции можно применять для лечения субъекта, имеющего заболевание или расстройство, связанное с экспрессией и/или активностью мезотелина, такое как, например, рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидный рак. В некоторых вариантах осуществления солидный рак представляет собой или включает рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, карциному костей и мягких тканей, опухоль головного мозга, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, колоректальную аденокарциному, колоректальный рак, десмоидную опухоль, эмбриональный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, аденокарциному желудка, мультиформную глиобластому, гинекологическую опухоль, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак печени, рак легких, мезотелиому, злокачественную меланому, остеосаркому, рак яичников, рак поджелудочной железы, аденокарциному протоков поджелудочной железы, первичную астроцитарную опухоль, первичный рак щитовидной железы, рак предстательной железы, рак почек, почечно-клеточную карциному, рабдомиосаркому, рак кожи, саркому мягких тканей, опухоль половых клеток яичка, уротелиальный рак, саркому матки или рак матки. В некоторых вариантах осуществления композиции и рекомбинантные клетки-хозяева по настоящему изобретению можно применять для лечения рака, где пептид Msln₂₀₋₂₈ экспрессируется на опухолевой клетке указанного злокачественного образования, или рака, где пептид Msln₅₃₀₋₅₃₈ экспрессируется на опухолевой клетке указанного злокачественного образования, такого как, например, мезотелиома, рак поджелудочной железы, рак яичников или рак легких.

[0043] Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, кодирующим связывающий белок, как описано в настоящем документе, векторам, которые содержат

полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, и клеткам-хозяевам, содержащим вектор.

[0044] Перед тем как перейти к более подробному описанию настоящего изобретения, для лучшего его понимания, далее приведены определения некоторых терминов, используемых в данном документе. Если специально не указано иное, технические термины, используемые в данном документе, имеют свое обычное значение, принятое в данной области техники. Дополнительные определения приведены в настоящем описании.

[0045] В настоящем описании любой диапазон концентраций, процентный диапазон, диапазон соотношений или диапазон целочисленных значений следует понимать как включающий значение любого целого числа в указанном диапазоне и, при необходимости, его доли (например, одну десятую и одну сотую целого числа), если не указано иное. Кроме того, следует понимать, что любой диапазон чисел, указанный в данном документе, относящийся к любой физической характеристике, такой как полимерные субъединицы, размер или толщина, включает любое целое число в указанном диапазоне, если не указано иное. "Приблизительно" в контексте настоящего описания, при отношении к измеряемому значению, диапазону или структуре, подразумевает охват отклонения на $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ или $\pm 0,1\%$ от указанного значения, если не указано иное.

[0046] Следует понимать, что формы единственного числа, используемые в данном документе, относятся к "одному или более" перечисленным компонентам. Использование предлогов альтернативы (например, "или") следует понимать, как обозначение одной, одной и другой либо любой комбинации альтернатив. В контексте данного документа термины "включать", "иметь" и "содержать" применяются синонимично, и такие термины и их варианты рассматриваются как неограничивающие.

[0047] "Необязательный" или "необязательно" означает, что описанный далее элемент, компонент, действие или обстоятельство может быть реализован, а может и не быть реализован, и что описание включает случаи, когда элемент, компонент, действие или обстоятельство реализованы, и случаи, когда они не реализованы.

[0048] Кроме того, следует понимать, что отдельные конструкции или группы конструкций, полученные из различных комбинаций структур и субъединиц, описанных в данном документе, раскрыты в настоящей заявке в той же степени, как если бы каждая конструкция или группа конструкций были бы изложены отдельно. Таким образом, выбор конкретных структур или конкретных субъединиц находится в пределах объема настоящего изобретения.

[0049] Термин "состоящий по существу из" не эквивалентен термину "содержащий" и относится к определённым материалам или стадиям формулы изобретения или к тем, которые по существу не влияют на основные характеристики заявленного объекта изобретения. Например, домен, область или модуль белка (например, связывающий домен, шарнирная область или линкер) или белок (который может иметь один или более доменов, областей или модулей) "состоит по существу из" конкретной аминокислотной последовательности, когда аминокислотная последовательность домена, области, модуля или белка включает удлинения, делеции, мутации или их комбинацию (например, аминокислоты на амино- или карбокси-конце или между доменами), которые в комбинации составляют не более 20 % (например, не более 15 %, 10 %, 8 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % или 1 %) от длины домена, области, модуля или белка и не оказывают влияния по существу (т.е. не снижают активность более чем на 50 %, например, не более чем на 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 % или 1 %) на активность домена(ов), области(ей), модуля(ей) или белка (например, аффинность связывания с мишенью у связывающего белка).

[0050] В контексте данного документа термин "аминокислота" относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые действуют аналогично встречающимся в природе аминокислотам. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые позже модифицируются, например, гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и О-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые имеют ту же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота, то есть α -углерод, который связан с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и группой R, например, гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные группы R (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют ту же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, структура которых отличается от общей химической структуры аминокислоты, но функционирует аналогично природным аминокислотам.

[0051] В контексте настоящего описания термин "мутация" относится к изменению последовательности молекулы нуклеиновой кислоты или молекулы полипептида по сравнению с эталонной молекулой или молекулой нуклеиновой кислоты или молекулой полипептида дикого типа, соответственно. Мутация может привести к нескольким

различным типам изменения последовательности, включая замену, вставку или удаление нуклеотида(ов) или аминокислоты(аминокислот). В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой замену одного или трех кодонов или аминокислот, делецию от одного до приблизительно 5 кодонов или аминокислот или их комбинацию.

[0052] "Консервативная замена" относится к аминокислотным заменам, которые по существу не влияют или не изменяют характеристики связывания конкретного белка. Обычно консервативные замены представляют собой замены, при которых замещенный аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Консервативные замены включают замену, обнаруженную в одной из следующих групп: Группа 1: аланин (Ala или A), глицин (Gly или G), серин (Ser или S), треонин (Thr или T), Группа 2: аспарагиновая кислота (Asp или D), глутаминовая кислота (Glu или Z), Группа 3: аспарагин (Asn или N), глутамин (Gln или Q), Группа 4: аргинин (Arg или R), лизин (Lys или K), гистидин (His или H), Группа 5: изолейцин (Ile или I), лейцин (Leu или L), метионин (Met или M), валин (Val или V), и группа 6: фенилаланин (Phe или F), тирозин (Tyr или Y), триптофан (Trp или W). Дополнительно или альтернативно, аминокислоты могут быть сгруппированы в консервативные замещающие группы по сходной функции, химической структуре или составу (например, кислые, основные, алифатические, ароматические или серосодержащие). Например, алифатическая группа может включать в целях замещения Gly, Ala, Val, Leu и Ile. Другие группы консервативных замен включают: серосодержащие: Met и цистеин (Cys или C), кислые: Asp, Glu, Asn и Gln, небольшие алифатические, неполярные или слабополярные остатки: Ala, Ser, Thr, Pro и Gly, полярные отрицательно заряженные остатки и их амиды: Asp, Asn, Glu и Gln, полярные положительно заряженные остатки: His, Arg и Lys, крупные алифатические неполярные остатки: Met, Leu, Ile, Val и Cys, и крупные ароматические остатки: Phe, Tyr и Trp. Дополнительную информацию можно найти в публикации Creighton (1984) *Proteins*, W.H. Freeman and Company. Варианты белков, пептидов, полипептидов и аминокислотных последовательностей по настоящему изобретению могут, в некоторых вариантах осуществления, содержать одну или более консервативных замен относительно эталонной аминокислотной последовательности.

[0053] В контексте настоящего описания термины "белок" или "полипептид" относятся к полимеру из аминокислотных остатков. Белки применимы к встречающимся в природе аминокислотным полимерам, а также к аминокислотным полимерам, в которых один или более аминокислотных остатков представляют собой искусственные химические миметики соответствующих встречающихся в природе аминокислот, и не встречающимся в природе аминокислотным полимерам.

[0054] В контексте настоящего описания термин "слитый белок" относится к белку, который в одной цепи имеет по меньшей мере два отдельных домена или мотива, причем эти домены или мотивы не встречаются в природе вместе (например, в указанном положении, порядке, или числе, или вообще) в белке. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит по меньшей мере два отдельных домена или мотива, которые не встречаются в природе вместе в одном пептиде или полипептиде. Полинуклеотид, кодирующий слитый белок, может быть сконструирован с применением ПЦР, рекомбинантно сконструирован и т.п., или такие слитые белки могут быть синтезированы. Слитый белок может дополнительно содержать другие компоненты, такие как метка, линкер или маркер трансдукции. В некоторых вариантах осуществления слитый белок, экспрессируемый или продуцируемый клеткой-хозяином (например, Т-лимфоцитом), располагается на поверхности клетки, где слитый белок прикреплен к клеточной мембране (например, через трансмембранный домен) и включает внеклеточную часть или компонент (например, содержащий связывающий домен и, в некоторых вариантах осуществления, линкер, спейсер или и то, и другое) и внутриклеточную часть или компонент.

[0055] Термины "соединительные аминокислоты" или "соединительные аминокислотные остатки" относятся к одному или более (например, приблизительно от 2 до 10) аминокислотным остаткам между двумя смежными мотивами, областями или доменами полипептида, например, между связывающим доменом и смежным константным доменом или между цепью TCR и соседним самоотщепляющимся пептидом. Соединительные аминокислоты могут быть результатом моделирования конструкции слитого белка (например, аминокислотные остатки, полученные в результате применения сайта рестрикционного фермента при конструировании молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок).

[0056] "Молекула нуклеиновой кислоты" или "полинуклеотид" относится к полимерному соединению, включающему ковалентно связанные нуклеотиды, которые могут состоять из природных субъединиц (например, пуриновых или пиримидиновых оснований) или неприродных субъединиц (например, морфолинового кольца). Основания пуринов включают аденин, гуанин, гипоксантин и ксантин, а основания пиримидина включают урацил, тимин и цитозин. Молекулы нуклеиновой кислоты включают полирибонуклеиновую кислоту (РНК), полидезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), которая включает кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК, каждая из которых может быть одноцепочечной или двухцепочечной. В случае одноцепочечной, молекула нуклеиновой кислоты может быть кодирующей цепью или не кодирующей

(антисмысловой цепью). Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность, включает все нуклеотидные последовательности, которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Некоторые версии нуклеотидных последовательностей могут также включать интрон(ы) в тех случаях, когда интрон(ы) будет удален посредством ко- или посттранскрипционных механизмов. Другими словами, разные нуклеотидные последовательности могут кодировать одну и ту же аминокислотную последовательность в результате избыточности или вырожденности генетического кода или в результате сплайсинга.

[0057] Также обеспечены варианты молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Варианты молекул нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % и предпочтительно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 99,9 % идентичны определенному или эталонному полинуклеотиду или молекуле нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе, или которые гибридизуются с полинуклеотидом в жестких условиях гибридизации 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия при приблизительно 65-68 °C или 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия и 50 % формамида приблизительно при 42 °C. Варианты молекулы нуклеиновой кислоты сохраняют способность кодировать слитый белок или его связывающий домен, имеющий описанную в данном документе функциональность, такую как специфическое связывание с молекулой-мишенью.

[0058] "Процент идентичности последовательностей" относится к взаимосвязи между двумя или более последовательностями, по данным сравнения последовательностей. Предпочтительные способы определения идентичности последовательностей разработаны для обеспечения наилучшего совпадения сравниваемых последовательностей. Например, последовательности выравниваются для целей оптимального сравнения (например, для оптимального выравнивания могут быть введены гэпы в одну или обе из первой и второй аминокислотной или нуклеиновой последовательностей). Кроме того, негомологичные последовательности можно не принимать во внимание при сравнении. Процент идентичности последовательностей, в контексте настоящего документа, рассчитывают по длине эталонной последовательности, если не указано иное. Способы определения идентичности и сходства последовательностей можно найти в общедоступных компьютерных программах. Выравнивание последовательностей и значения процента идентичности последовательностей могут быть выполнены с применением программного обеспечения BLAST (например, BLAST 2.0, BLASTP, BLASTN или BLASTX). Математический алгоритм, применяемый в программах BLAST, можно найти в публикации Altschul et al.,

Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997. В контексте настоящего изобретения следует понимать, что там, где для анализа применяют программное обеспечение для анализа последовательностей, результаты анализа основаны на "значениях по умолчанию" указанной программы. "Значения по умолчанию" означают любой набор значений или параметров, которые изначально загружены вместе с программным обеспечением при первой установке.

[0059] Как принято понимать в данной области техники, "сходство" между двумя полипептидами определяется путем сравнения аминокислотной последовательности и консервативных аминокислотных замен полипептида с последовательностью второго полипептида (например, с применением GENEWORKS™, Align, Clustal™, алгоритма BLAST или аналогов). В некоторых вариантах осуществления предпочтителен алгоритм BLAST.

[0060] Термин "выделенный" относится к материалу, который удален из своей исходной среды (например, из естественной среды, если он встречается в природе). Например, встречающаяся в природе нуклеиновая кислота или полипептид, присутствующие в живом животном, не выделена, но выделена та же самая нуклеиновая кислота или полипептид, отделенная от некоторых или всех сосуществующих материалов в природной системе. Такая нуклеиновая кислота может быть частью вектора и/или такая нуклеиновая кислота или полипептид может быть частью композиции (например, клеточного лизата) и при этом быть выделенной в том смысле, что такой вектор или композиция не является частью природной среды для нуклеиновой кислоты или полипептида. Термин "ген" относится к сегменту ДНК, участвующему в продуцировании полипептидной цепи, он включает области, предшествующие и следующие за кодирующей областью ("лидерная и трейлерная последовательность"), а также промежуточные последовательности (интроны) между отдельными кодирующими сегментами (экзоны).

[0061] В некотором контексте настоящего описания, термин "вариант" относится по меньшей мере к одному фрагменту указанной полноразмерной последовательности, более конкретно, к одной или более аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты, которые относительно полноразмерной последовательности, являются усеченными по одному или обоим концам одной или более аминокислот. Такой фрагмент включает или кодирует пептид, имеющий по меньшей мере 6, 7, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150 или 200 последовательных аминокислот исходной последовательности или ее варианта. Общая длина варианта может составлять по

меньшей мере 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более аминокислот.

[0062] В некоторых вариантах осуществления термин "вариант" относится не только к по меньшей мере одному фрагменту, но также к полипептиду или его фрагменту, включая аминокислотные последовательности, которые составляют по меньшей мере на 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 99,5 % идентичны указанной эталонной аминокислотной последовательности к или его фрагменту, где аминокислоты, отличные от тех, которые необходимы для биологической активности, складки или структуры полипептида, удалены или заменены, одна или более таких незаменимых аминокислот заменены консервативным способом, и/или аминокислоты добавлены таким образом, чтобы сохранялась биологическая активность полипептида. Уровень техники включает в себя различные способы, которые можно применять для выравнивания двух заданных последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислот и для расчета степени идентичности (см., например, Arthur Lesk (2008), *Introduction to bioinformatics*, Oxford University Press, 2008, 3rd edition). В некоторых вариантах осуществления программное обеспечение Clustal W можно применять, используя настройки по умолчанию (Larkin, M. A., et al. (2007). *Clustal W and Clustal X version 2.0*. *Bioinformatics*, 23, 2947–2948).

[0063] В некоторых вариантах осуществления варианты могут, дополнительно, включать химические модификации, например, изотопные метки или ковалентные модификации, такие как гликозилирование, фосфорилирование, ацетилирование, декарбоксилирование, цитруллинирование, гидроксилирование и тому подобное. Способы модификации полипептидов известны и, как правило, будут применяться для того, чтобы не отменить или по существу снизить желаемую активность полипептида.

[0064] В одном варианте осуществления термин "вариант" молекулы нуклеиновой кислоты включает нуклеиновые кислоты, комплементарная цепь которых гибридизуется, например, в жестких условиях, с эталонной нуклеиновой кислотой или нуклеиновой кислотой дикого типа. Жесткость реакций гибридизации легко определяется средним специалистом в данной области техники, и, как правило, это эмпирический расчет, зависящий от длины зонда, температуры промывки и концентрации соли. Как правило, более длинные зонды требуют более высоких температур для надлежащего отжига, а более короткие - в меньшей степени. Гибридизация обычно зависит от способности денатурированной ДНК к повторному отжигу если комплементарные цепи присутствуют в среде, температура которой ниже их температуры плавления: чем выше степень желаемой гомологии между зондом и гибридизируемой последовательностью, тем выше

относительная температура, которую можно применять. В результате более высокие относительные температуры создают тенденцию к более жестким условиям реакции, а более низкие температуры создают тенденцию к менее жестким условиям. Дополнительное описание и объяснение условий жесткости реакций гибридизации можно найти в публикации Ausubel, F. M. (1995), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. Кроме того, специалист в данной области может следовать инструкциям, приведенным в руководстве Boehringer Mannheim GmbH (1993) *The DIG System Users Guide for Filter Hybridization*, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany и в Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W., and Schleifer, K. H. (1991) *International Journal of Systematic Bacteriology* 41: 255-260 о том, как идентифицировать последовательности ДНК посредством гибридизации. В одном из вариантов осуществления для любой гибридизации применяют жесткие условия, т.е. гибридизация происходит только в том случае, если зонд на 70 % или более идентичен целевой последовательности. Зонды, имеющие более низкую степень идентичности по отношению к целевой последовательности, могут гибридизоваться, но такие гибриды нестабильны и будут удалены на стадии промывки в жестких условиях, например, при снижении концентрации соли до $2\times\text{SSC}$ (раствор цитрата и хлорида натрия) или, необязательно и впоследствии, до $0,5\times\text{SSC}$, при этом температура составляет, например, приблизительно от 50 до 68 °C, приблизительно от 52 до 68 °C, приблизительно от 54 до 68 °C, приблизительно от 56 до 68 °C, приблизительно от 58 до 68 °C, приблизительно от 60 до 68 °C, приблизительно от 62 до 68 °C, приблизительно от 64 до 68 °C или приблизительно от 66 до 68 °C. В одном варианте осуществления температура составляет приблизительно от 64 до 68 °C или приблизительно от 66 до 68 °C. Можно отрегулировать концентрацию соли до $0,2\times\text{SSC}$ или даже до $0,1\times\text{SSC}$. Последовательности нуклеиновой кислоты, имеющие степень идентичности по отношению к эталонной последовательности или последовательности дикого типа по меньшей мере 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 99,5 % могут быть выделены. В одном из вариантов осуществления термин "вариант последовательности нуклеиновой кислоты", в контексте настоящего документа, относится к любой последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует ту же аминокислотную последовательность и ее варианты, что и эталонная последовательность нуклеиновой кислоты, в соответствии с вырожденностью генетического кода.

[0065] "Функциональный вариант" относится к полипептиду или полинуклеотиду, который структурно подобен или по существу структурно подобен исходному или эталонному соединению по настоящему изобретению, но отличается, в некоторых

контекстах, незначительно по составу (например, одно основание, атом или функциональная группа отличается, добавлена или удалена, или одна или более аминокислот мутированы, вставлены или удалены), так что полипептид или кодируемый полипептид способен выполнять по меньшей мере одну функцию кодируемого исходного полипептида с эффективностью по меньшей мере 50 %, предпочтительно по меньшей мере 55 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,9 % или 100 % уровня активности исходного полипептида. Другими словами, функциональный вариант полипептида или кодируемого полипептида по настоящему изобретению имеет "аналогичное связывание", "аналогичную аффинность" или "аналогичную активность", когда функциональный вариант демонстрирует не более чем 50 % снижение эффективности в выбранном анализе, как по сравнению с исходным или эталонным полипептидом, например, анализе для измерения аффинности связывания (например, *Biacore*® или окрашивание тетрамера с измерением константы ассоциации (K_a) или диссоциации (K_D)), avidности или активации клетки-хозяина. В контексте настоящего документа, термин "функциональная часть" или "функциональный фрагмент" относится к полипептиду или полинуклеотиду, который включает только домен, мотив, часть или фрагмент исходного или эталонного соединения, и полипептид или кодируемый полипептид сохраняет по меньшей мере 50 % активности, ассоциированной с доменом, частью или фрагментом исходного или эталонного соединения, предпочтительно по меньшей мере 55 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,9 % или 100 % уровня активности исходного полипептида, или обеспечивает биологическое преимущество (например, эффекторную функцию).

[0066] "Функциональная часть" или "функциональный фрагмент" полипептида или кодируемого полипептида по настоящему изобретению имеет "аналогичное связывание" или "аналогичную активность", когда функциональная часть или фрагмент демонстрирует не более чем 50 % снижение эффективности в выбранном анализе, как по сравнению с исходным или эталонным полипептидом (предпочтительно не более 20 % или 10 %, или не более чем логарифмическая разница по сравнению с исходным или эталонным полипептидом в отношении аффинности), например, анализ измерения аффинности связывания или измерения эффекторной функции (например, высвобождения цитокинов). В некоторых вариантах осуществления функциональная часть относится к "сигнальной части" эффекторной молекулы, эффекторного домена, костимулирующей молекулы или костимулирующего домена.

[0067] "Измененный домен" или "измененный белок" относится к мотиву, области, домену, пептиду, полипептиду или белку с неидентичной последовательностью,

идентичной мотиву, области, домену, пептиду, полипептиду или белку дикого типа (например, цепь TCR α , цепь TCR β , константный домен TCR α или константный домен TCR β дикого типа) по меньшей мере на 85 % (например, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 % или 99,9 %).

[0068] В контексте настоящего описания термины "гетерологичный", "неэндогенный" или "экзогенный" относятся к любому гену, белку, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или активности, которые не являются природными для клетки-хозяина или субъекта, или любому гену, белку, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или активности, присущим клетке-хозяину или субъекту, которые были изменены. Гетерологичные, неэндогенные или экзогенные относятся к генам, белкам, соединениям или молекулам нуклеиновых кислот, которые были мутированы или изменены иным образом, так что структура, активность или и то, и другое отличается у природных и измененных генов, белков, соединений или молекулы нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления гетерологичные, неэндогенные или экзогенные гены, белки или молекулы нуклеиновых кислот (например, рецепторы, лиганды и т.д.) могут не быть эндогенными для клетки-хозяина или субъекта, а вместо этого нуклеиновые кислоты, кодирующие такие гены, белки или молекулы нуклеиновых кислот могут быть добавлены в клетку-хозяина путем конъюгации, трансформации, трансфекции, электропорации и т.п., при этом добавленная молекула нуклеиновой кислоты может интегрироваться в геном клетки-хозяина или может существовать в виде внехромосомного генетического материала (например, в виде плазмиды или другого самореплицирующегося вектора). Следует понимать, что в случае клетки-хозяина, которая содержит гетерологичный полинуклеотид, полинуклеотид является "гетерологичным" по отношению к потомству клетки-хозяина, независимо от того, проводили ли манипуляции с самим потомством (например, трансдуцировали), чтобы оно содержало полинуклеотид.

[0069] Термин "гомологичный" или "гомолог" относится к гену, белку, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или активности, обнаруженным в клетке-хозяине, виду или штамму или полученным из них. Например, гетерологичный или экзогенный полинуклеотид или ген, кодирующий полипептид, может быть гомологичным природному полинуклеотиду или гену и кодировать гомологичный полипептид или активность, но полинуклеотид или полипептид может иметь измененную структуру, последовательность, уровень экспрессии или любую их комбинацию. Неэндогенный

полинуклеотид или ген, а также кодируемый полипептид или активность могут происходить от одного и того же вида, другого вида или их комбинации.

[0070] В контексте данного документа термины "эндогенный" или "природный" относятся к полинуклеотиду, гену, белку, соединению, молекуле или активности, которые обычно присутствуют в клетке-хозяине или субъекте.

[0071] Термин "экспрессия", в контексте данного документа, относится к процессу получения полипептида на основе кодирующей последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, такой как ген. Процесс может включать транскрипцию, посттранскрипционный контроль, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционный контроль, посттрансляционную модификацию или любую их комбинацию. Экспрессированная молекула нуклеиновой кислоты обычно функционально связана с последовательностью контроля экспрессии (например, с промотором).

[0072] Термин "функционально связанный" относится к ассоциации двух или более молекул нуклеиновой кислоты на одном фрагменте нуклеиновой кислоты, так что на функцию одной влияет другая. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, когда он способен влиять на экспрессию этой кодирующей последовательности (т.е. кодирующая последовательность находится под транскрипционным контролем промотора). "Несвязанный" означает, что связанные генетические элементы не связаны друг с другом тесно, и функция одного не влияет на другой.

[0073] Термин "введенный" в контексте встраивания молекулы нуклеиновой кислоты в клетку означает "трансфекцию", или "трансформацию", или "трандукцию" и относится к включению молекулы нуклеиновой кислоты в эукариотическую или прокариотическую клетку, в которой молекула нуклеиновой кислоты может быть включена в геном клетки (например, хромосомную, плазмидную, пластидную или митохондриальную ДНК), преобразована в автономный репликон или временно экспрессирована (например, трансфицированная мРНК). В контексте данного документа термины "сконструированный", "рекомбинантный", "неприродный" или "модифицированный" относятся к организму, микроорганизму, клетке, молекуле нуклеиновой кислоты или вектору, который включает по меньшей мере одно генетическое изменение или был модифицирован посредством введения экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты, при этом такие изменения или модификации выполняют с помощью генной инженерии (т.е. вмешательства человека). Генетические изменения включают, например, модификации введения экспрессируемых молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих белков, слитых белков или ферментов, или добавления, делеции,

замены или другие функциональные нарушения генетического материала клетки. Дополнительные модификации включают, например, некодирующие регуляторные области, в которых модификации изменяют экспрессию полинуклеотида, гена или оперона, например, такой, что экспрессия молекулы или гена эндогенной нуклеиновой кислоты является контролируемой, дерегулируемой или конститутивной, где такие изменения или модификации могут быть внесены с помощью генной инженерии. Генетические изменения могут включать, например, модификации, вводящие молекулы нуклеиновой кислоты (которые могут включать элемент контроля экспрессии, такой как промотор), кодирующие один или более белков или ферментов, или другие добавления, делеции, замены молекул нуклеиновых кислот или другие функциональные нарушения генетического материала клетки или его дополнения. Примеры модификаций включают модификации в кодирующих областях или их функциональных фрагментах гетерологичных или гомологичных полипептидов из эталонной или исходной молекулы.

[0074] Как описано в данном документе, более одной молекулы гетерологичной нуклеиновой кислоты можно ввести в клетку-хозяина в виде отдельных молекул нуклеиновой кислоты, в виде множества индивидуально контролируемых генов, в виде молекулы полицистроновой нуклеиновой кислоты, в виде единственной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, или любой их комбинации. Когда две или более молекул гетерологичных нуклеиновых кислот вводят в клетку-хозяина, подразумевается, что две или более молекул гетерологичных нуклеиновых кислот могут быть введены как одна молекула нуклеиновой кислоты (например, в одном векторе) в отдельные векторы, интегрированные в хромосому хозяина в одном или более сайтах, или в любой их комбинации. Количество указанных гетерологичных молекул нуклеиновых кислот или активности белков относится к количеству кодирующих молекул нуклеиновых кислот или количеству активностей белка, а не к количеству отдельных молекул нуклеиновых кислот, введенных в клетку-хозяина.

[0075] Термин "конструкция" относится к любому полинуклеотиду, который содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Конструкция может присутствовать в векторе (например, бактериальном векторе, вирусном векторе) или может быть интегрирована в геном. "Вектор" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая способна транспортировать другую молекулу нуклеиновой кислоты. Векторы могут представлять собой, например, плазмиды, космиды, вирусы, вектор РНК или линейную или кольцевую молекулу ДНК или РНК, которая может включать хромосомные, нехромосомные, полусинтетические или синтетические молекулы нуклеиновых кислот. Векторы по настоящему изобретению также включают системы

транспозонов (например, *Sleeping Beauty*, см., например, Geurts et al., *Mol. Ther.* 8:108, 2003; Mátés et al., *Nat. Genet.* 41:753, 2009). Иллюстративные векторы представляют собой векторы, способные к автономной репликации (эписомальный вектор), способные доставлять полинуклеотид в геном клетки (например, вирусный вектор) или способные экспрессировать молекулы нуклеиновой кислоты, с которыми они связаны (векторы экспрессии).

[0076] В контексте данного документа термин "хозяин" относится к клетке (например, клетке иммунной системы, как описано в данном документе) или микроорганизму, направленному на генетическую модификацию с помощью гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты для получения полипептида, представляющего интерес. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин может необязательно уже обладать или быть модифицированной для включения других генетических модификаций, которые придают целевые свойства, связанные или не связанные, например, с биосинтезом гетерологичного белка (например, включение детектируемого маркера, удаленный, измененный или усеченный эндогенный TCR, или повышенная экспрессия костимуляторного фактора).

[0077] "Связывающий домен" (также называемый "связывающая область" или "связывающий фрагмент") в контексте настоящего описания относится к молекуле, такой как пептид, олигопептид, полипептид или белок, которая обладает способностью к специфическому и нековалентному связыванию, объединению или комбинированию с целевой молекулой (например, пептидом Msln₂₀₋₂₈ (SEQ ID NO: 31) или пептидом Msln₅₃₀₋₅₃₈ (SEQ ID NO: 32), в некоторых вариантах осуществления, в комплексе с молекулой HLA). Связывающий домен включает любой встречающийся в природе, синтетический, полусинтетический или рекомбинантный партнер связывания для биологической молекулы или другой мишени, представляющей интерес. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен представляет собой антигенсвязывающий домен, такой как антитело или TCR, или его функциональный связывающий домен или его антигенсвязывающий фрагмент. Примеры связывающих доменов включают переменные области одноцепочечных антител (например, однодоменные антитела, sFv, scFv и Fab), рецепторные эктодомены (например, TNF- α), лиганды (например, цитокины и хемокины), антигенсвязывающие области TCR, такие как одноцепочечные TCR (scTCR), синтетические полипептиды, выбранные по специфической способности связываться с биологической молекулой, аптамеры или однодоменные антитела (например, однодоменные антитела, полученные от верблюдовых или от рыб, см., например, Arbabi-Ghahroudi M (2017)) *Front. Immunol.* 8:1589).

[0078] Термин "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к домену α -цепи или β -цепи TCR (или γ -цепи и δ -цепи для $\gamma\delta$ TCR) или тяжелой или легкой цепи антитела, которая участвует в связывании с антигеном (т.е. содержит аминокислоты и/или другие структуры, которые связываются с антигеном и приводят к связыванию). Вариабельные домены α -цепи и β -цепи (V_α и V_β , соответственно) природного TCR обычно имеют сходные структуры, причем каждый домен содержит четыре обычно консервативных каркасных области (FR) и три CDR. Каждый из вариабельных доменов тяжелой (V_H) и легкой (V_L) цепей антитела также обычно содержит четыре обычно консервативных каркасных области (FR) и три CDR. И в TCR, и в антителах каркасные области разделяют CDR, и CDR расположены между каркасными областями (т.е. в первичной структуре).

[0079] Вариабельные домены α -цепи и β -цепи (V_α и V_β , соответственно) природного TCR обычно имеют сходные структуры, причем каждый домен содержит четыре консервативных каркасных области (FR) и три CDR. Домен V_α кодируется двумя отдельными сегментами ДНК, вариабельным сегментом гена и соединительным сегментом гена (V-J), домен V_β кодируется тремя отдельными сегментами ДНК, вариабельным сегментом гена, разнообразия и соединительным сегментом гена (V-D-J). Аллели V, D и J человеческого TCR, включая их нуклеотидные и кодируемые аминокислотные последовательности, известны в данной области техники. Одного домена V_α или V_β может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, TCR, которые связывают конкретный антиген, могут быть выделены с применением домена V_α или V_β из TCR, который связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов V_α или V_β соответственно.

[0080] Термины "определяющая комплементарность область" и "CDR" являются синонимами "гипервариабельной области" или "HVR" и, как известно в данной области техники, относятся к последовательностям аминокислот в вариабельных областях TCR или антител, которые, в общем, придают антигенную специфичность и/или аффинность связывания и отделены друг от друга в первичной структуре каркасной последовательностью. В некоторых случаях каркасные аминокислоты также могут способствовать связыванию, например, могут также связываться с антигеном или антигенсодержащей молекулой. В общем, в каждой вариабельной области представлены три CDR (т.е. по три CDR в каждой вариабельной области TCR α -цепи и β -цепи, по 3 CDR в каждой вариабельной области тяжелой цепи и легкой цепи). В случае TCR считается, что CDR3 представляет собой основную CDR, ответственную за распознавание процессированного антигена. CDR1 и CDR2 в основном или в некоторых случаях

исключительно взаимодействуют с МНС (главный комплекс гистосовместимости). Последовательности переменных доменов могут быть выровнены по схеме нумерации (например, Kabat, EU, International Immunogenetics Information System (IMGT) и Aho), что позволяет аннотировать эквивалентные положения остатков и сравнивать различные молекулы с применением программного обеспечения Antigen receptor Numbering And Receptor Classification (ANARCI) (2016, Bioinformatics 15:298-300). В некоторых вариантах осуществления CDR пронумерованы в соответствии с системой нумерации IMGT.

[0081] В контексте настоящего описания термин "специфически связывает" относится к ассоциации или объединению связывающего домена или белка, содержащего его, с молекулой-мишенью с аффинностью или K_a (т.е. равновесной константой ассоциации конкретного взаимодействия связывания с единицами $1/M$), равной или большей $10^5 M^{-1}$, при этом без ассоциации или объединения по существу с любыми другими молекулами или компонентами в образце. Связывающие домены (или их слитые белки) можно классифицировать как "высокоаффинные" связывающие домены (или их слитые белки) или "низкоаффинные" связывающие домены (или их слитые белки). "Высокоаффинные" связывающие домены относятся к связывающим доменам с K_a по меньшей мере $10^7 M^{-1}$, по меньшей мере $10^8 M^{-1}$, по меньшей мере $10^9 M^{-1}$, по меньшей мере $10^{10} M^{-1}$, по меньшей мере $10^{11} M^{-1}$, по меньшей мере $10^{12} M^{-1}$ или по меньшей мере $10^{13} M^{-1}$. "Низкоаффинные" связывающие домены относятся к связывающим доменам с K_a до $10^7 M^{-1}$, до $10^6 M^{-1}$ или до $10^5 M^{-1}$. В качестве альтернативы, аффинность может быть определена как равновесная константа диссоциации (K_d) конкретного взаимодействия связывания с помощью единиц M (например, от $10^{-5} M$ до $10^{-13} M$). В некоторых вариантах осуществления связывающий домен может иметь "повышенную аффинность", что относится к выбранному или сконструированному связывающему домену с более сильным связыванием с целевым антигеном, чем связывающий домен дикого типа (или исходный). Например, повышенная аффинность может быть связана с K_a (равновесной константой ассоциации) для целевого антигена, которая выше, чем у связывающего домена дикого типа, или K_d для целевого антигена, которая меньше, чем у связывающего домена дикого типа, или ее можно объяснить скоростью диссоциации (K_{off}) для антигена-мишени, которая меньше, чем у связывающего домена дикого типа. Известны различные способы идентификации связывающих доменов по настоящему изобретению, которые специфически связываются с конкретной мишенью, а также для определения аффинностей связывающего домена или слитого белка, такие как вестерн-блоттинг, ELISA и анализ BIACORE® (см. также, например, Scatchard, et al., Ann. NY Acad. Sci. 57: 660, 1949, и патенты США № 5 283 173, 5 468 614 или эквиваленты).

[0082] Известны анализы для оценки аффинности или кажущейся аффинности или относительной аффинности. В некоторых примерах кажущуюся аффинность TCR измеряют путем оценки связывания с различными концентрациями тетрамеров, например, с помощью проточной цитометрии с применением меченых тетрамеров. В некоторых примерах кажущуюся K_d TCR измеряют с применением 2-кратных разведений меченых тетрамеров (например, тетрамеры пептид:МНС) в диапазоне концентраций с последующим определением кривых связывания с помощью нелинейной регрессии, при этом кажущуюся K_d определяют, как концентрацию лиганда, которая дает половину максимального связывания. В некоторых вариантах осуществления Msln₂₀₋₂₈- или Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок включает Msln₂₀₋₂₈- или Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок суперсемейства иммуноглобулинов или его связывающую часть, соответственно.

[0083] "Окрашивание тетрамера МНС-пептида" относится к способу обнаружения антиген-специфических Т-лимфоцитов, который включает тетрамер молекул МНС, каждая из которых содержит идентичный пептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая является когнатной (например, идентичной или родственной) по меньшей мере одному эпитопу (например, Msln₂₀₋₂₈ или Msln₅₃₀₋₅₃₈), где комплекс способен связываться с TCR, специфическими для когнатного эпитопа. Каждая из молекул МНС может быть помечена молекулой биотина. Биотинилированные МНС/пептиды тетрамеризуются добавлением стрептавидина, который может быть помечен флуоресцентной меткой. Тетрамер можно обнаружить с помощью проточной цитометрии по флуоресцентной метке. В некоторых вариантах осуществления способ тетрамера МНС-пептид применяют для обнаружения или отбора TCR с повышенной аффинностью в соответствии с настоящим изобретением. Уровни цитокинов можно определять в соответствии со способами, описанными в данном документе и применяемыми на практике в данной области техники, включая, например, ELISA, ELISpot, внутриклеточное окрашивание цитокинов, проточную цитометрию и их комбинации (например, окрашивание внутриклеточных цитокинов и проточную цитометрию). Пролиферацию иммунных клеток и клональную экспансию в результате антиген-специфической элиситации или стимуляции иммунного ответа можно определить путем выделения лимфоцитов, таких как циркулирующие лимфоциты в образцах клеток периферической крови или клеток из лимфатических узлов, стимуляции клеток антигеном и измерения продукция цитокинов, пролиферации клеток и/или жизнеспособности клеток, например, путем включения меченного тритием тимидина или нерадиоактивных способов, таких как МТТ-тест и т.п. Влияние иммуногена, описанного в данном

документе, на баланс между иммунным ответом Th1 и иммунным ответом Th2 может быть исследовано, например, путем определения уровней цитокинов Th1, таких как IFN- γ , IL-12, IL-2 и TNF- β и цитокинов типа 2, таких как IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 и IL-13.

[0084] "Антиген" или "АГ" в контексте настоящего описания относится к иммуногенной молекуле, которая вызывает иммунный ответ. Такой иммунный ответ может включать выработку антител, активацию специфических иммунологически компетентных клеток (например, Т-клеток) или и то, и другое. Антиген (иммуногенная молекула) может быть, например, пептидом, гликопептидом, полипептидом, гликополипептидом, полинуклеотидом, полисахаридом, липидом и т.п. Совершенно очевидно, что антиген может быть синтезирован, получен рекомбинантным путем или получен из биологического образца. Примеры биологических образцов, которые могут содержать один или более антигенов, включают образцы тканей, образцы опухолей, клетки, биологические жидкости или их комбинации. Антигены могут быть синтезированы химическим путем или продуцированы клетками, которые были модифицированы или генетически сконструированы для экспрессии антигена.

[0085] Термин "эпитоп" или "антигенный эпитоп" включает любую молекулу, структуру, аминокислотную последовательность или белковую детерминанту, которые распознаются и специфически связываются родственной связывающей молекулой, такой как иммуноглобулин, Т-клеточный рецептор (TCR), химерный рецептор антигена (CAR) или другая связывающая молекула, домен или белок. Эпитопные детерминанты обычно содержат химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда.

[0086] "Msln₂₀₋₂₈" и "пептид Msln₂₀₋₂₈" и "пептид Msln₂₀" в контексте настоящего описания относятся к пептиду, содержащему или состоящему из аминокислот с 20 по 28 мезотелина последовательности SEQ ID NO: 50 (человеческий мезотелин, изоформа 1), то есть SLLFLLFSL (SEQ ID NO: 31), пептид которого может связываться с HLA-A*201.

[0087] "Msln₅₃₀₋₅₃₈" и "пептид Msln₅₃₀₋₅₃₈", "пептид Msln₅₃₀" в контексте настоящего описания относятся к пептиду, содержащему или состоящему из аминокислот с 530 по 538 мезотелина последовательности SEQ ID NO: 50, например, VLPLTVAEV (SEQ ID NO: 32), пептид которого может связываться с HLA-A*201.

[0088] Термин "Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок" относится к белку или полипептиду, который специфически связывается с пептидом Msln₂₀₋₂₈ и/или который специфичен для него и/или который имеет или придает высокую авидность в отношении пептида Msln₂₀₋₂₈. В некоторых вариантах осуществления белок или полипептид

связывается с Msln₂₀₋₂₈, например, пептид Msln₂₀₋₂₈ в комплексе с молекулой МНС или HLA, например, на поверхности клетки, с определенной аффинностью или по меньшей мере приблизительно с определенной аффинностью. Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок может связываться с пептидом Msln₂₀₋₂₈, его вариантом или его фрагментом. Например, Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок может связываться с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31 (SLLFLLFSL) или аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок связывает комплекс Msln₂₀₋₂₈-пептид:HLA (или комплекс пептид, производный от Msln₂₀₋₂₈:МНС) с аффинностью, которая приблизительно равна, по меньшей мере приблизительно равна, или больше по сравнению с аффинностью, проявляемой типичным Msln₂₀₋₂₈-специфическим связывающим белком, представленным в настоящем документе, таким как любой из Msln₂₀₋₂₈-специфических TCR, представленных в настоящем документе, например, по данным измерений того же способа. В некоторых вариантах осуществления Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок может связываться с эпитопом Msln₂₀₋₂₈, как описано в настоящем документе, например, консенсусной последовательностью эпитопа в соответствии с последовательностью SEQ ID NO: 60. Как описано в данном документе, Msln-специфический связывающий белок не связывается или по существу не связывается с человеческим белком или пептидом, не относящимся к Msln, имеющим высокую гомологию последовательности или идентичность с последовательностью SEQ ID NO: 60.

[0089] Термин "Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок" относится к белку или полипептиду, который специфически связывается с пептидом Msln₅₃₀₋₅₃₈ и/или который специфичен и/или который имеет или придает высокую авидность в отношении пептида Msln₅₃₀₋₅₃₈. В некоторых вариантах осуществления белок или полипептид связывается с Msln₅₃₀₋₅₃₈, например, пептид Msln₅₃₀₋₅₃₈ образует комплекс с молекулой МНС или HLA, например, на поверхности клетки, с определенной аффинностью или по меньшей мере приблизительно с определенной аффинностью. Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок может связываться с пептидом Msln₅₃₀₋₅₃₈, его вариантом или его фрагментом. Например, Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок может связываться с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32 (VLPLTVAEV) или аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий

белок связывает комплекс Msln₅₃₀₋₅₃₈-пептид:HLA (или комплекс пептид, производный от Msln₅₃₀₋₅₃₈:MHC) с аффинностью, которая приблизительно равна, по меньшей мере приблизительно равна, или больше по сравнению с аффинностью, проявляемой типичным Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфическим связывающим белком, описанным в настоящем документе, таким как любой из Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфических TCR, описанных в настоящем документе, например, по данным измерений того же способа. В некоторых вариантах осуществления Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок может связываться с эпитопом Msln₅₃₀₋₅₃₈, как описано в настоящем документе, например, консенсусной последовательностью эпитопа в соответствии с последовательностью SEQ ID NO: 61 или 62. Как описано в данном документе, Msln-специфический связывающий белок не связывается или по существу не связывается с человеческим белком или пептидом, не относящимся к Msln, имеющим высокую гомологию последовательности или идентичность с последовательностями SEQ ID NO: 61 или 62.

[0090] Молекула-мишень, которая специфически связана со связывающим доменом по настоящему изобретению, может быть обнаружена на интересующей клетке ("клетка-мишень") или в ассоциации с ней. Типичные клетки-мишени включают раковую клетку, клетку, связанную с аутоиммунным заболеванием или расстройством, или с воспалительным заболеванием или расстройством, и инфекционный организм или клетку (например, бактерии, вирус или инфицированную вирусом клетку). Клетка инфекционного организма, такого как паразит млекопитающего, также рассматривается как клетка-мишень.

[0091] Термин "функциональная avidность" относится к биологической мере или порогу активации реакции иммунной клетки *in vitro* (например, Т-клетки, НК-клетки, НК-Т-клетки) на заданную концентрацию лиганда, при этом биологические показатели могут включать продукцию цитокинов (например, продукцию IFN γ , продукцию IL-2 и т.д.), цитотоксическую активность и пролиферацию. Например, Т-клетки, которые биологически (иммунологически) реагируют *in vitro* на низкую дозу антигена, продуцируя цитокины, будучи цитотоксичными или пролиферирующими, считаются имеющими высокую функциональную avidность, в то время как Т-клетки, имеющие более низкую функциональную avidность, требуют большего количества антигена для вызова иммунного ответа, подобного Т-клеткам с высокой avidностью. Следует понимать, что функциональная avidность отличается от аффинности и avidности. Аффинность относится к силе любой данной связи между связывающим белком и его антигеном/лигандом. Некоторые связывающие белки мультивалентны и связываются с несколькими антигенами, в этом случае сила общей связи представляет собой avidность.

[0092] Существует множество корреляций между функциональной авидностью и эффективностью иммунного ответа. Некоторые исследования *ex vivo* показали, что различные функции Т-клеток (например, пролиферация, продукция цитокинов и т.д.) могут запускаться при разных порогах (см., например, Betts et al., J. Immunol. 172:6407, 2004, Langenkamp et al., Eur. J. Immunol. 32:2046, 2002). Факторы, которые влияют на функциональную авидность, включают (а) аффинность TCR к комплексу pMHC, то есть силу взаимодействия между TCR и pMHC (Cawthon et al., J. Immunol. 167:2577, 2001), (b) уровни экспрессии TCR и корецепторов CD4 или CD8, и (c) распределение и композицию сигнальных молекул (Viola and Lanzavecchia, Science 273:104, 1996), а также уровни экспрессии молекул, которые ослабляют функцию Т-клетки и сигналинг TCR.

[0093] Концентрация антигена, необходимая для индукции полумаксимального ответа между исходным уровнем и максимальным ответом после определенного времени воздействия, называется "полумаксимальной эффективной концентрацией" или "EC50". Величина EC50 обычно выражается в молях (моль/литр), но часто преобразуется в логарифмическое значение следующим образом - $\log_{10}(\text{EC50})$. Например, если EC50 равен 1 мкМ (10^{-6} М), значение $\log_{10}(\text{EC50})$ равно -6. Другое применяемое значение представляет собой pEC50, которое определяется как отрицательный логарифм EC50 ($-\log_{10}(\text{EC50})$). В приведенном выше примере EC50, равное 1 мкМ, имеет значение pEC50, равное 6. В некоторых вариантах осуществления функциональная авидность связывающих белков по настоящему изобретению будет мерой их способности стимулировать продукцию IFN γ Т-лимфоцитами, которую можно измерить, применяя описанные в настоящей заявке способы. TCR с "высокой функциональной авидностью" или их связывающие домены относятся к тем TCR или их связывающим доменам, имеющим EC50 по меньшей мере 10^{-4} М, по меньшей мере приблизительно 10^{-5} М или по меньшей мере приблизительно 10^{-6} М.

[0094] В некоторых вариантах осуществления мезотелин-специфические связывающие белки или домены, как описано в данном документе, могут экспрессироваться Т-клеткой-хозяином и могут быть функционально охарактеризованы в соответствии с любым из большого числа принятых в данной области техники способов для анализа активности Т-клеток, включая определение связывания, активации или индукции Т-клеток, а также определение ответов Т-клеток, которые являются антиген-специфическими. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок способен стимулировать антиген-специфический Т-клеточный ответ в отношении мезотелина человека рестриктированным по HLA класса I образом. В дополнительных вариантах осуществления рестриктированный по HLA класса I ответ независим от транспортер-

ассоциированного представления антигена (ТАР). В некоторых вариантах осуществления антиген-специфический Т-клеточный ответ включает по меньшей мере один из ответа CD4⁺ хелперных Т-лимфоцитов (Th) и ответа CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). В родственных вариантах осуществления ответ ЦТЛ направлен против клетки, сверхэкспрессирующей мезотелин. Дополнительные примеры способов анализа активности Т-лимфоцитов включают определение пролиферации Т-лимфоцитов, высвобождения Т-клеточных цитокинов, антиген-специфической стимуляции Т-лимфоцитов, стимуляции Т-лимфоцитов, рестриктированных по МНС, активности ЦТЛ (например, путем обнаружения высвобождения ⁵¹Cr из предварительно нагруженных клеток-мишеней), изменения в экспрессии фенотипических маркеров Т-лимфоцитов и другие показатели функций Т-клеток. Способы выполнения этих и подобных анализов можно найти, например, в публикации Lefkovits (Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques, 1998). См. также Protocols in Immunology, Weir, Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific, Boston, MA (1986), Mishell and Shigii (eds.) Selected Methods in Cellular Immunology, Freeman Publishing, San Francisco, CA (1979), Green and Reed, Science 281:1309 (1998) и цитируемые там ссылки).

[0095] В контексте данного документа "клетка иммунной системы" относится к любой клетке иммунной системы, которая происходит из гемопоэтической стволовой клетки в костном мозге, которая дает начало двум основным линиям, миелоидным клеткам-предшественникам (которые дают начало миелоидным клеткам, такие как моноциты, макрофаги, дендритные клетки, мегакариоциты и гранулоциты) и лимфоидным клеткам-предшественникам (которые дают начало лимфоидным клеткам, таким как Т-клетки, В-клетки и натуральные клетки-киллеры (НК)). Примеры клеток иммунной системы включают CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, CD4⁻ CD8⁻ двойные отрицательные Т-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки, регуляторные Т-клетки, стволовые Т-клетки памяти, натуральные клетки-киллеры (например, НК-клетка или НК-Т-клетка), В-клетки и дендритные клетки. Макрофаги и дендритные клетки могут называться "антигенпрезентирующими клетками" или "АПК", представляющие собой специализированные клетки, которые могут активировать Т-клетки, когда рецептор главного комплекса гистосовместимости (МНС) на поверхности АПК в комплексе с пептидом взаимодействует с TCR на поверхности Т-клетки.

[0096] "Т-клетка" или "Т-лимфоцит" представляет собой клетку иммунной системы, которая созревает в тимусе и продуцирует TCR. Т-лимфоциты могут быть наивными (не подвергшиеся воздействию антигена, повышенная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 и CD45RA и пониженная экспрессия CD45RO по сравнению с

Т_{СМ}), Т-лимфоцитами памяти (Т_М) (подвергшиеся воздействию антигена и долгоживущие) и эффекторные клетки (подвергшиеся воздействию антигена, цитотоксические). Т_М можно далее разделить на подсемейства: центральные Т-клетки памяти (Т_{СМ}, повышенная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO и CD95 и пониженная экспрессия CD54RA по сравнению с наивными Т-лимфоцитами) и эффекторные Т-клетки памяти (Т_{ЕМ}, сниженная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD45RA и повышенная экспрессия CD127 по сравнению с наивными Т-лимфоцитами или Т_{СМ}).

[0097] Эффекторные Т-лимфоциты (Т_Е) относятся к цитотоксическим Т-лимфоцитам CD8⁺, подвергшимся воздействию антигена, которые имеют пониженную экспрессию CD62L, CCR7, CD28 и являются положительными в отношении гранзима и перфорина по сравнению с Т_{СМ}. Другие типичные Т-клетки включают регуляторные Т-клетки, такие как регуляторные Т-клетки CD4⁺ CD25⁺ (Foxp3⁺) и клетки Treg17, а также Т-лимфоциты рестриктированные по Tr1, Th3, CD8⁺ CD28⁻ и Qa-1.

[0098] Хелперные Т-клетки (Т_Н) представляют собой CD4⁺ клетки, которые влияют на активность других иммунных клеток, высвобождая цитокины. CD4⁺ Т-лимфоциты могут активировать и подавлять адаптивный иммунный ответ, и то, какая из этих двух функций индуцируется, будет зависеть от присутствия других клеток и сигналов. Т-клетки можно собирать с применением известных способов, и различные субпопуляции или их комбинации могут быть обогащены или истощены известными способами, такими как аффинное связывание с антителами, проточная цитометрия или иммуномагнитная селекция.

[0099] "Клетки Т-клеточного происхождения" относятся к клеткам, которые демонстрируют по меньшей мере одну фенотипическую характеристику Т-клетки или ее предшественника, которая отличает эти клетки от других лимфоидных клеток и клеток эритроидного или миелоидного происхождения. Такие фенотипические характеристики могут включать экспрессию одного или более белков, специфичных для Т-клеток (например, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺), или физиологических, морфологических, функциональных или иммунологических характеристик, специфичных для Т-клеток. Например, клетки линии Т-клеток могут быть клетками-предшественниками, дифференцированными в Т-клеточную линию, CD25⁺ незрелые и инактивированные Т-клетки, клетки, которые подверглись детерминации дифференцировки CD4 или CD8, клетки-предшественники тимоцитов, которые являются CD4⁺ CD8⁺ дважды положительными, одиночный положительный CD4⁺ или CD8⁺, TCRαβ или TCR γβ, или зрелые и функциональные, или активированные Т-клетки.

[0100] "Гематопозитическая клетка-предшественник" представляет собой клетку, происходящую от гематопозитических стволовых клеток (HSC) или ткани плода, которая способна к дальнейшей дифференцировке в зрелые типы клеток (например, клетки Т-клеточной линии). В некоторых вариантах осуществления можно применять гематопозитические клетки-предшественники $CD24^{lo} Lin^{-} CD117^{+}$. Как определено в данном документе, гематопозитические клетки-предшественники могут включать эмбриональные стволовые клетки, которые способны к дальнейшей дифференцировке в клетки Т-клеточной линии. Гематопозитические клетки-предшественники могут происходить от различных видов животных, включая человека, мышь, крысу или других млекопитающих. "Клетка-предшественник тимоцита" или "timoцит" представляет собой гематопозитическую клетку-предшественника, присутствующую в тимусе.

[0101] "Гематопозитические стволовые клетки" или "HSC" относятся к недифференцированным гематопозитическим клеткам, которые способны к самообновлению либо *in vivo*, к по существу неограниченному размножению или наращиванию *in vitro*, и способным к дифференцировке в другие типы клеток, включая клетки Т-клеточной линии. Гематопозитические стволовые клетки могут быть выделены, например, но не ограничиваясь ими, из печени, костного мозга и пуповинной крови плода.

[0102] "Эмбриональные стволовые клетки", "ES-клетки" или "ESC" относятся к недифференцированным эмбриональным стволовым клеткам, обладающим способностью интегрироваться и становиться частью зародышевой линии развивающегося эмбриона. Эмбриональные стволовые клетки способны к дифференцировке в гематопозитические клетки-предшественники и любую ткань или орган. Эмбриональные стволовые клетки, пригодные для применения в настоящем документе, включают клетки из клеточной линии J1 ES, клеточной линии 129J ES, клеточной линии стволовых клеток мышей D3 (Американская коллекция типовых культур), клеточных линий R1 или E14K, полученных от мышей 129/Sv, клеточных линий, полученных от мышей Balb/c и C57B1/6, и эмбриональные стволовые клетки человека (например, из WICELL® Research Institute, Висконсин, или ES cell International, Мельбурн, Австралия).

[0103] Термин "Т-клеточный рецептор" (TCR) относится к члену суперсемейства иммуноглобулинов (имеющему вариабельный связывающий домен, константный домен, трансмембранную область и короткий цитоплазматический хвост, см., например, Janeway, et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997), способному специфически связываться с антигенным пептидом, связанным с рецептором главного комплекса гистосовместимости. TCR может быть представлен на поверхности клетки или в растворимой форме и обычно состоит из

гетеродимера, имеющего α - и β -цепи (также известные как TCR α и TCR β , соответственно) или γ - и δ -цепи (также известные как TCR γ и TCR δ , соответственно). Как и другие иммуноглобулины, внеклеточная часть цепей TCR (например, α -цепь и β -цепь) содержит два домена иммуноглобулина, переменный домен (например, переменный домен α -цепи или V α , переменный домен β -цепи или V β , обычно аминокислоты от 1 до 116 на основе нумерации Кабата (Kabat, et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest," US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.)) на N-конце, и один константный домен (например, константный домен α -цепи или C α , обычно аминокислоты со 117 по 259 на основе нумерации Кабата, константный домен β -цепи или C β , обычно аминокислоты со 117 по 295 на основе нумерации Кабата), прилегающий к клеточной мембране. Также, как и другие иммуноглобулины, переменные домены содержат области, определяющие комплементарность (CDR), разделенные каркасными областями (FR) (см., например, Jores, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 57: 9138, 1990, Chothia, et al., EMBO J. 7:3745, 1988, см. также Lefranc, et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003). В некоторых вариантах осуществления TCR представлен на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов) и связан с комплексом CD3. Источник TCR, применяемый в настоящем описании, может происходить от различных видов животных, таких как человек, мышь, крыса, кошка, собака, коза, лошадь или другое млекопитающее.

[0104] "CD3" представляет собой мультибелковый комплекс из шести цепей (см. Borst J, et al., J Biol Chem, 258(8):5135-41, 1983 и Janeway, et al., P. 172 and 178, 1999, выше). У млекопитающих комплекс включает цепь CD3 γ , цепь CD3 δ , две цепи CD3 ϵ и гомодимер цепей CD3 ζ . Цепи CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ представляют собой родственные белки клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулинов, содержащих один домен иммуноглобулина. Трансмембранные области цепей CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ заряжены отрицательно, что, как полагают, позволяет таким цепям связываться с положительно заряженными участками цепей TCR. Внутриклеточные хвосты цепей CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ каждая содержат один консервативный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM, тогда как каждая цепь CD3 ζ имеет три таких мотива. Не ограничиваясь теорией, полагают, что ITAM важны для сигнальной способности комплекса TCR. CD3, в контексте настоящего описания, может происходить от различных видов животных, включая человека, мышь, крысу или других млекопитающих.

[0105] В контексте настоящего описания термин "комплекс TCR" относится к комплексу, образованному связью CD3 с TCR. Например, комплекс TCR может состоять из цепи CD3 γ , цепи CD3 δ , двух цепей CD3 ϵ , гомодимера цепей CD3 ζ , цепи TCR α и цепи

TCR β . Альтернативно, комплекс TCR может состоять из цепи CD3 γ , цепи CD3 δ , двух цепей CD3 ϵ , гомодимера цепей CD3 ζ , цепи TCR γ и цепи TCR δ .

[0106] "Компонент комплекса TCR" в контексте настоящего описания относится к цепи TCR (т.е. TCR α , TCR β , TCR γ или TCR δ), цепи CD3 (т.е. CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 ζ), или комплексу, образованному двумя или более цепями TCR или цепями CD3 (например, комплексу TCR α и TCR β , комплексу TCR γ и TCR δ , комплексу CD3 ϵ и CD3 δ , комплексу CD3 γ и CD3 ϵ или субкомплексу TCR из TCR α , TCR β , CD3 γ , CD3 δ и двух цепей CD3 ϵ).

[0107] "Главный комплекс гистосовместимости" (МНС) относится к гликопротеинам, которые доставляют пептидные антигены к поверхности клетки. Молекулы МНС класса I представляют собой гетеродимеры, имеющие трансмембранную α -цепь (с тремя α -доменами) и нековалентно связанный β 2-микроглобулин. Молекулы МНС класса II состоят из двух трансмембранных гликопротеинов, α и β , оба из которых пронизывают мембрану. Каждая цепь состоит из двух доменов. Молекулы МНС класса I доставляют пептиды, продуцируемые в цитозоле, на поверхность клетки, где комплекс пептида и МНС распознается CD8 $^{+}$ Т-лимфоцитами. Молекулы МНС класса II доставляют пептиды, продуцируемые в везикулярной системе, на поверхность клетки, где они распознаются CD4 $^{+}$ Т-лимфоцитами. МНС человека называют человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA).

Мезотелин-специфические связывающие белки

[0108] В определенных аспектах настоящее изобретение относится к связывающим белкам, которые способны специфически связываться с антигенным пептидом мезотелин, как описано в данном документе (например, пептид, содержащий, состоящий или состоящий по существу из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 32). Связывающие белки по настоящему изобретению включают переменный домен альфа-цепи TCR (V_{α}) и переменный домен бета-цепи TCR (V_{β}). В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, мезотелин-специфический связывающий белок способен специфически связываться с комплексом пептида мезотелина и HLA, таким как комплекс пептид мезотелин и HLA-A*02:01.

[0109] В некоторых вариантах осуществления обеспечен Msln-₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок, который содержит: (а) TCR V_{α} , содержащую аминокислотную последовательность CDR3, как указано в SEQ ID NO: 37 или 39, и TCR V_{β} , где TCR V_{β} необязательно содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % (т.е., по меньшей мере приблизительно на 86 %, 85 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или более) идентичную

аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 99 или 101, (b) TCR V_β , содержащую аминокислотную последовательность CDR3, как указано в SEQ ID NO: 38 или 40, и (b) TCR V_α , где TCR V_α необязательно содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85% (т.е. по меньшей мере приблизительно 86%, 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % или более) идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 100 или 102, или (c) TCR V_α , содержащую аминокислотную последовательность CDR3, как указано в SEQ ID NO: 37 или 39, где TCR V_α необязательно содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 100 или 102, и TCR V_β , содержащую аминокислотную последовательность CDR3, как указано в SEQ ID NO: 38 или 40, где TCR V_β необязательно содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 99 или 101.

[0110] В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, кодируемый полипептид по настоящему изобретению (например, варибельный домен TCR или цепь TCR) может содержать "сигнальный пептид" (также известный как лидерная последовательность, лидерный пептид или транзитный пептид). Сигнальные пептиды нацелены на вновь синтезированные полипептиды в определенном месте внутри или вне клетки. Сигнальный пептид может быть удален из полипептида во время или после завершения локализации или секреции. Полипептиды, которые имеют сигнальный пептид, обозначены в данном документе как "белок-предшественник", а полипептиды, у которых удален сигнальный пептид, обозначены в данном документе как "зрелые" белки или полипептиды. Типичные сигнальные пептиды включают такие аминокислотные последовательности от положения 1 до положения 19 любой из последовательностей SEQ ID NO: 6, 14, 22, 28 или 29, от положения 1 до 17 SEQ ID NO: 7, от положения 1 до 22 SEQ ID NO: 15, от положения 1 до 21 SEQ ID NO: 23. Типичные последовательности зрелого полипептида обеспечены в последовательностях SEQ ID NO: 95-119.

[0111] В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок может содержать TCR V_α , содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 100 или 102 и/или TCR V_β , содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 99 или 101. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок

содержит вариант указанной последовательности переменного домена TCR, при условии, что по меньшей мере три или четыре CDR связывающего белка не имеют изменений в последовательности в соответствии с указанной последовательностью переменного домена TCR, при этом CDR, которые действительно имеют изменения последовательности, имеют только до двух аминокислотных замен, до пяти смежных делеций аминокислот или их комбинацию.

[0112] В некоторых вариантах осуществления Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок содержит аминокислотную последовательность CDR3 α , как указано в SEQ ID NO: 39, и аминокислотную последовательность CDR3 β , как указано в SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок дополнительно содержит аминокислотную последовательность CDR1 α , как указано в SEQ ID NO: 93, аминокислотную последовательность CDR2 α , как указано в SEQ ID NO: 94, аминокислотную последовательность CDR1 β , как указано в любом из SEQ ID NO: 83, 84 или 91, и/или аминокислотную последовательность CDR2 β , как указано в SEQ ID NO: 92. В дополнительных вариантах осуществления V α содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 102, и/или V β содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 101, где необязательно нет изменений в CDR1 α , CDR2 α , CDR1 β и/или CDR2 β .

[0113] В некоторых вариантах осуществления Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок содержит TCR V β , содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRBJ2-3*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRBJ2-3*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 15 смежных аминокислот в длину), и/или аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRAV21*01 или TRAV21*02 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRAV21*01 или TRAV21*02, которая имеет по меньшей мере приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105 или 107 аминокислот в длину), и/или аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRBV5-4*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRBV5-4*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90,

95, 100, 105 или 108 аминокислот в длину), и/или аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRAJ57*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRAJ57*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот в длину).

[0114] В некоторых вариантах осуществления Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок содержит TCR V_α, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 102, и TCR V_β, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 101.

[0115] В других вариантах осуществления Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок содержит аминокислотную последовательность CDR3_α, как указано в SEQ ID NO: 37, и аминокислотную последовательность CDR3_β, как указано в SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок дополнительно содержит аминокислотную последовательность CDR1_α, как указано в SEQ ID NO: 89, аминокислотную последовательность CDR2_α, как указано в SEQ ID NO: 90, аминокислотную последовательность CDR1_β, как указано в любой из SEQ ID NO: 83 или 87, и аминокислотную последовательность CDR2_β, как указано в SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления V_α содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 100, и/или V_β содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 99, где необязательно нет изменений в CDR1_α, CDR2_α, CDR1_β и/или CDR2_β.

[0116] В некоторых вариантах осуществления Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRAV4-1*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRAV4-1*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105 или 108 аминокислот в длину), и/или аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85% идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRAJ18*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRAJ18*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 аминокислоту в длину) и/или аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой

TRBJ1-1*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRBJ1-1*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в длину), и/или аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRBJ2-3*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRBJ2-3*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 аминокислот в длину).

[0117] В некоторых вариантах осуществления Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок содержит TCR V_α, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 100, и TCR V_β, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 99.

[0118] В некоторых вариантах осуществления аланиновый мутагенез любого одного или более остатков 3, 5, 6 или 9 последовательности SEQ ID NO: 32 не подавляет или по существу не ухудшает связывание Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфическим связывающим белком. В некоторых вариантах осуществления Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок способен связываться с пептидом, содержащим или состоящим из консенсусной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 61, например, в комплексе пептида и HLA, как описано в настоящем документе.

[0119] В некоторых вариантах осуществления аланиновый мутагенез любого одного или более остатков 1, 5 или 9 последовательности SEQ ID NO: 32 не подавляет или по существу не ухудшает связывание Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфическим связывающим белком. В некоторых вариантах осуществления Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок способен связываться с пептидом, содержащим или состоящим из консенсусной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 62, например, в комплексе пептида и HLA, как описано в настоящем документе.

[0120] Msln-специфические связывающие белки по настоящему изобретению преимущественно представляют низкий или нулевой риск аллореактивности в отношении мишеней, не относящихся к Msln, например, которые экспрессируются в здоровой ткани. Кратко, настоящее изобретение показывает, что Msln-специфические связывающие белки не взаимодействуют или по существу не взаимодействуют с белками человека с гомологией последовательности к антигенному пептиду Msln, как обеспечено в настоящем документе. Таким образом, связывающие белки обладают высокой специфичностью в отношении пептидных антигенов Msln.

[0121] Например, в некоторых вариантах осуществления Msln₅₃₀₋₅₃₈-специфический связывающий белок по настоящему изобретению не связывается или специфически не

связывается относительно связывания с Msln₅₃₀₋₅₃₈, с комплексом пептид:HLA, где пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой одной или более последовательностях SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76 и 77, и где HLA необязательно содержит HLA-A2, например HLA-A:02*01.

[0122] В некоторых вариантах осуществления обеспечен Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок, который содержит: (a) TCR V_α, содержащую аминокислотную последовательность CDR3, как указано в SEQ ID NO: 33 или 35, и TCR V_β, где TCR V_β необязательно имеет последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % (т.е. по меньшей мере приблизительно на 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или более) идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 95 или 97, (b) TCR V_β, содержащую аминокислотную последовательность CDR3, как указано в SEQ ID NO: 34 или 36, и (b) TCR V_α, где TCR V_α необязательно имеет последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 96 или 98, или (c) TCR V_α, содержащую аминокислотную последовательность CDR3, как указано в SEQ ID NO: 33 или 35, и TCR V_β, содержащую аминокислотную последовательность CDR3, как указано в SEQ ID NO: 34 или 36, где TCR V_α необязательно содержит последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 95 или 97, и где V_β TCR необязательно содержит последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 96 или 98.

[0123] В любом из описанных в настоящей заявке варианте осуществления Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок может содержать TCR V_α, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 96 или 98 и/или TCR V_β, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 95 или 97. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит вариант указанной последовательности вариабельного домена TCR, при условии, что по меньшей мере три или четыре из CDR связывающего белка не имеют изменений в последовательности в соответствии с указанной последовательностью вариабельного домена TCR, где CDR, которые действительно имеют изменения последовательности, имеют только до двух аминокислотных замен, до пяти смежных делеций аминокислот или их комбинацию.

[0124] В некоторых вариантах осуществления, Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок содержит аминокислотную последовательность CDR3 α , как указано в SEQ ID NO: 33, и аминокислотную последовательность CDR3 β , как указано в SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок дополнительно содержит аминокислотную последовательность CDR1 α , как указано в SEQ ID NO: 80, аминокислотную последовательность CDR2 α , как указано в SEQ ID NO: 81 или 118, аминокислотную последовательность CDR1 β , как указано в любой одной из последовательностей SEQ ID NO: 78, 83 или 84 и аминокислотную последовательность CDR2 β , как указано в SEQ ID NO: 79. В некоторых вариантах осуществления V α содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 96, и/или V β содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 95, где необязательно нет изменений в CDR1 α , CDR2 α , CDR1 β и/или CDR2 β .

[0125] В некоторых вариантах осуществления Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок содержит (i) TCR V β , содержащую (a) аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % (т.е., по меньшей мере приблизительно на 5 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или более) идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRBV12-4*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRBV12-4*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105 или 108 смежных аминокислот в длину), и/или (b) аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRBJ2-7*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRBJ2-7*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 аминокислот в длину), и/или (ii) TCR V α , содержащую (a) аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRAV1-1*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRAV1-1*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105 или 107 смежных аминокислот в длину) и/или (b) аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRAJ3*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRAJ3*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот в

длину), и/или (с) аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRBJ2-3*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRBJ2-3*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 аминокислот в длину).

[0126] В некоторых вариантах осуществления, Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок содержит TCR V_α, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 96, и TCR V_β, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 95.

[0127] В некоторых вариантах осуществления Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок содержит аминокислотную последовательность CDR3_α, как указано в SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность CDR3_β, как указано в SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок дополнительно содержит аминокислотную последовательность CDR1_α, как указано в SEQ ID NO: 85, аминокислотную последовательность CDR2_α, как указано в SEQ ID NO: 86 или 119, аминокислотную последовательность CDR1_β, как указано в любой одной из последовательностей SEQ ID NO: 82, 83 или 84, и аминокислотную последовательность CDR2_β, как указано в SEQ ID NO: 79. В некоторых вариантах осуществления V_α содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 98, и/или V_β содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 97, где необязательно нет изменений в CDR1_α, CDR2_α, CDR1_β и/или CDR2_β.

[0128] В некоторых вариантах осуществления Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок содержит TCR V_α, содержащую (а) аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRAV12-3*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRAV12-3*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105 или 108 смежных аминокислот в длину) и/или (b) аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRAJ29*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRAJ29*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19 аминокислот в длину), и/или (с) и/или аминокислотную последовательность по меньшей мере

приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой TRBJ2-3*01 (например, аминокислотной последовательности, кодируемой TRBJ2-3*01, которая имеет по меньшей мере приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 аминокислот в длину).

[0129] В некоторых вариантах осуществления Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок содержит TCR V_α, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 98, и TCR V_β, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 97.

[0130] В некоторых вариантах осуществления аланиновый мутагенез любого одного или более остатков 1, 2, 7, 8 или 9 последовательности SEQ ID NO: 31 не подавляет или по существу не ухудшает связывание Msln₂₀₋₂₈-специфическим связывающим белком. В некоторых вариантах осуществления Msln₂₀₋₂₈-специфический связывающий белок способен связываться с пептидом, содержащим или состоящим из консенсусной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 60, например, в комплексе пептид:HLA, как описано в настоящем документе.

[0131] В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, Msln-специфический связывающий белок способен связываться с комплексом пептид Msln:HLA, где пептид Msln содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31 или 32, и где HLA представляет собой или содержит HLA-A2, такой как HLA-A*02:01.

[0132] В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, иммунная клетка (например, Т-клетка), экспрессирующая Msln-специфический связывающий белок по настоящему изобретению, не продуцирует IFN-γ и/или не проявляет активации (например, экспрессия CD8, экспрессия CD3, экспрессия Nur77) и/или цитотоксической активности (например, специфическое уничтожение, продукция и высвобождение перфорина и/или гранзима) при контакте с клеткой, экспрессирующей: (i) HLA-C6:02:01, (ii) HLA-B13:01:01 без HLA-B13:02:01, (iii) HLA-A3, (iv) HLA-A29, (v) HLA-B40, (vi) HLA-B44, (vii) HLA-C3, (viii) HLA-C16, (ix) HLA-A1, (x) HLA-24, (xi) HLA-B7, (xii) HLA-B57, (xiii) HLA-C7, (xiv) HLA-A11, (xv) HLA-B15, (xvi) HLA-C4, (xvii) HLA-C12, (xviii) HLA-B8, (xix) HLA-B49, (xx) HLA-B51, (xxi) HLA-C15, (xxii) HLA-A30, (xxiii) HLA-A68, (xxiv) HLA-C2, (xxv) HLA-A32, (xxvi) HLA-A33, (xxvii) HLA-B55, (xxviii) HLA-C1, (xxvix) HLA-C5, (xxix) HLA-B8, (xxx) HLA-B35, или (xxxi) любую комбинацию с (i) по (xxx) в отсутствие пептида Msln, как описано в настоящем документе.

[0133] В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, Msln-специфический связывающий белок, когда он экспрессируется на поверхности

клетки-хозяина, способен связываться с комплексом пептид Msln:HLA, как описано в настоящем документе, в отсутствие CD8или независимо от него.

[0134] В некоторых вариантах осуществления связывающий белок по настоящему изобретению имеет значение EC50 пептида Msln приблизительно 9 мкМ, приблизительно 8 мкМ, приблизительно 7 мкМ, приблизительно 6 мкМ, приблизительно 5 мкМ, приблизительно 4 мкМ, приблизительно 3 мкМ, приблизительно 2 мкМ, приблизительно 1 мкМ, приблизительно 0,9 мкМ, приблизительно 0,8 мкМ, приблизительно 0,7 мкМ, приблизительно 0,6 мкМ, приблизительно 0,5 мкМ, приблизительно 0,4 мкМ, приблизительно 0,3 мкМ, приблизительно 0,2 мкМ или менее.

[0135] В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, Msln-специфический связывающий белок способен более эффективно связываться с белком CD3 и/или имеет повышенную экспрессию на поверхности клетки по сравнению с эндогенным TCR, когда Msln-специфический связывающий белок экспрессируется в Т-клетке-хозяине или НК-Т-клетке.

[0136] В некоторых вариантах осуществления связывающий белок представляет собой TCR, одноцепочечный TCR (scTCR) или CAR.

[0137] В некоторых вариантах осуществления связывающий белок представляет собой TCR. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит TCR V_β , TCR C_β , TCR V_α и TCR C_α , где V_β и C_β вместе составляют β -цепь TCR (TCR β), и где, V_α и C_α вместе составляют цепь α TCR (TCR α), и при этом TCR β и TCR α способны связываться с образованием димера. В дополнительных вариантах осуществления TCR C_β содержит аминокислоту цистеин вместо природного серина в 57 аминокислотном положении (например, GV(S $\rightarrow$ C)TD), а TCR C_α содержит аминокислоту цистеин вместо природного треонина в 48 аминокислотном положении (например, DK(T $\rightarrow$ C)VL, см., например, Cohen et al., Cancer Res. 67(8):3898-3903 (2007)).

[0138] В дополнительных вариантах осуществления Msln-специфический связывающий белок представляет собой TCR, содержащий TCR β и TCR α , где TCR β и TCR α соответственно содержат аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или более идентичную аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO: (i) 103 или 6 (TCR β) и 104 или 7 (TCR α), (ii) 105 или 14 (TCR β) и 106 или 15 (TCR α), (iii) 107 или 22 (TCR β) и 108 или 23 (TCR α), или (iv) 109 или 28 (TCR β) и 110 или 29 (TCR α).

[0139] В некоторых вариантах осуществления связывающий белок представляет собой растворимый TCR, необязательно содержащий или связанный с цитотоксическим и/или определяемым элементом или агентом (см., например, Walseng et al., PLoS One

doi:10.1371/journal.pone.0119559 (2015)). Способы выделения и очистки рекомбинантно продуцируемого растворимого TCR, в качестве примера, могут включать получение супернатантов из подходящих систем клетка-хозяин/вектор, которые секретируют рекомбинантный растворимый TCR в культуральную среду, а затем концентрирование среды с применением коммерчески доступного фильтра. После концентрирования концентрат можно наносить на единственную подходящую очищающую матрицу или на ряд подходящих матриц, таких как аффинная матрица или ионообменная смола. Для дополнительной очистки рекомбинантного полипептида можно применять одну или более стадий обращенно-фазовой ВЭЖХ. Такие способы очистки также можно применять при выделении иммуногена из его естественной среды. Способы крупномасштабного получения одного или более выделенных/рекомбинантных растворимых TCR, описанных в данном документе, включают периодическую культуру клеток, которую отслеживают и контролируют для поддержания соответствующих условий культивирования. Очистку растворимого TCR можно проводить способами, описанными в данном документе и известными в данной области техники, которые соответствуют законам и руководствам национальных и зарубежных регулирующих органов.

[0140] В некоторых вариантах осуществления два или более отдельных полипептидных домена или последовательностей связаны линкером (например, TCRV α и TCRV β в контексте scTCR или CAR). "Линкер" относится к аминокислотной последовательности, которая соединяет два белка, полипептида, пептида, домена, области или мотива и может обеспечивать спейсерную функцию, совместимую с взаимодействием двух субсвязывающих доменов, так что полученный полипептид сохраняет специфическую аффинность связывания (например, scTCR) с молекулой-мишенью или сохраняет сигнальную активность (например, комплекс TCR). В некоторых вариантах осуществления линкер состоит из от приблизительно двух до приблизительно 35 аминокислот, от приблизительно четырех до приблизительно 20 аминокислот, от приблизительно восьми до приблизительно 15 аминокислот, от приблизительно 15 до приблизительно 25 аминокислот или другого подходящего количества аминокислот. Как правило, линкер предпочтительно является химически инертным, гибким и неиммуногенным или минимально иммуногенным. Последовательности линкера могут повторяться для достижения желаемой длины, например, для облегчения желаемого взаимодействия белков между связанными доменами или между ними. Типичные линкеры (включая глицин-сериновые линкеры) и свойства линкеров описаны, например, в публикации Chen et al., *Adv. Drug Deliv Rev*, 65(10):1357-1369 (2013), и van Rosmalen et al., *Biochemistry* 56(60):6565-6574 (2017), аминокислотные последовательности линкера и

конструктивные свойства, описанные в указанных публикациях, включены в настоящий документ посредством ссылки. .

[0141] В конкретных вариантах осуществления, Msln-специфический связывающий белок представляет собой или содержит scTCR (например, одноцепочечные белки $\alpha\beta$ TCR, такие как V_α -L- V_β , V_β -L- V_α , V_α - C_α -L- V_α или V_α -L- V_β - C_β , где V_α и V_β представляют собой переменные домены TCR α и β соответственно, C_α и C_β представляют собой константные домены TCR α и β соответственно, а L представляет собой линкер).

[0142] В некоторых вариантах осуществления Msln-специфический связывающий белок представляет собой или содержит CAR. "Химерный рецептор антигена" (CAR) относится к слитому белку по настоящему изобретению, сконструированному так, чтобы он содержал две или более встречающихся в природе (или сконструированных) аминокислотных последовательностей, связанных вместе таким образом, который не встречается в природе или не встречается в природе в клетке-хозяине, причем такой слитый белок может действовать как рецептор, когда присутствует на поверхности клетки. CAR по настоящему изобретению содержат внеклеточную часть, содержащую антигенсвязывающий домен (например, полученный или происходящий от иммуноглобулина или иммуноглобулиноподобной молекулы, такой как scFv или scTCR, полученный из антитела или TCR, специфических для ракового антигена, или антигенсвязывающий домен, происходящий или полученный от иммунорецептора-киллера из НК-клетки, или из другого белка (природного, рекомбинантного или синтетического), который имеет или сконструирован так, чтобы обладать способностью специфически связываться с антигеном), связанный с трансмембранным доменом и одним или более внутриклеточными сигнальными доменами (необязательно содержащих костимулирующий домен(ы)) (см., например, Sadelain et al., *Cancer Discov.*, 3(4):388 (2013), см. также Harris and Kranz, *Trends Pharmacol. Sci.*, 37(3):220 (2016), Stone et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 63(11):1163 (2014)). В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит CAR, содержащий антигенспецифический связывающий домен TCR (см., например, Walseng et al., *Scientific Reports* 7:10713, 2017, конструкции TCR CAR и способы которых полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки).

Полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева

[0143] В настоящем документе также представлены полинуклеотиды, которые кодируют Msln-специфический связывающий белок или его часть (например, переменный домен TCR) по настоящему изобретению. Специалистам в данной области техники будет понятно, что вследствие вырожденности генетического кода существует

множество нуклеотидных последовательностей, которые кодируют связывающий белок или его часть, как описано в данном документе. Некоторые такие полинуклеотиды могут иметь ограниченную или минимальную идентичность последовательности с нуклеотидной последовательностью природной, исходной или установленной полинуклеотидной последовательности. Тем не менее, полинуклеотиды, которые различаются из-за различий в применении кодонов, прямо предусмотрены настоящим изобретением.

[0144] В некоторых вариантах осуществления специально обеспечены последовательности, оптимизированные по кодонам для экспрессии в клетке-хозяине, такой как клетка млекопитающего. Оптимизация кодонов может быть выполнена с применением известных способов и инструментов, например, с помощью инструмента GenScript® OptimiumGeneTM. Последовательности, оптимизированные для кодонов, включают последовательности, которые, по меньшей мере, частично оптимизированы для кодонов (т.е. один или более кодонов оптимизированы для экспрессии в клетке-хозяине), и последовательности, которые полностью оптимизированы для кодонов. Оптимизация кодонов для экспрессии в определенных иммунных клетках-хозяевах описана, например, в публикации Scholten et al., Clin. Immunol. 119:135, 2006.

[0145] Типичные полинуклеотидные последовательности, кодирующие цепи TCR по настоящему изобретению, представлены в последовательностях SEQ ID NO: 1-4, 9-12, 17-20, 25 и 26. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий Msln-специфический связывающий белок включает полинуклеотид, имеющий последовательность по меньшей мере приблизительно на 50 % (т.е. по меньшей мере приблизительно на 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или более) идентичную полинуклеотидной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 1-4, 9-12, 17-20, 25 и 26.

[0146] В некоторых вариантах осуществления обеспечены полинуклеотид, кодирующий цепь TCR α , и полинуклеотид, кодирующий цепь TCR β , которые по меньшей мере приблизительно на 50 % идентичны полинуклеотидным последовательностям, указанным в SEQ ID NO: (i) 1 и 3 соответственно, (ii) 2 и 4 соответственно, (iii) 9 и 11 соответственно, (iv) 10 и 12 соответственно, (v) 17 и 19, соответственно, (vi) 18 и 20 соответственно, или (vii) 25 и 26 соответственно.

[0147] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий два или более компонентов или частей связывающего белка или TCR по настоящему изобретению, содержит две или более кодирующих последовательности, функционально

связанных в одной открытой рамке считывания. Такое расположение может преимущественно обеспечивать скоординированную экспрессию желаемых генных продуктов, таких как, например, одновременная экспрессия альфа- и бета-цепей TCR, так что они продуцируются приблизительно в соотношении 1:1. В некоторых вариантах осуществления два или более продукта гена-заместителя связывающего белка по настоящему изобретению, такого как TCR (например, альфа- и бета-цепи), экспрессируются как отдельные молекулы и связываются посттрансляционно. В дополнительных вариантах осуществления два или более продукта гена-заместителя связывающего белка по настоящему изобретению экспрессируются как один пептид, части которого разделены расщепляемым или удаляемым сегментом.

[0148] Например, саморасщепляющиеся пептиды (также называемые "рибосомные пропускающие элементы"), пригодные для экспрессии разделяемых полипептидов, кодируемых одним полинуклеотидом или вектором, известны в данной области техники и включают, например, пептид P2A, кодируемый полинуклеотидом, имеющим нуклеотидную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 41-46, пептид вируса *Thoseaasigna* 2A (T2A), такой как пептид, кодируемый полинуклеотидом, имеющим нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 47, пептид вируса ринита А лошадей (ERAV) 2A (E2A), такой как пептид, кодируемый полинуклеотидом, имеющим нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 48, и пептид вируса ящура 2A (F2A), такой как пептид, кодируемый полинуклеотидом, имеющим нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 49. Типичные аминокислотные последовательности саморасщепляющихся пептидов представлены в SEQ ID NO: 113-117.

[0149] Типичные полинуклеотиды, кодирующие Msln-специфический TCR по настоящему изобретению, где полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, расположен между полинуклеотидом, кодирующим цепь TCR β , и полинуклеотидом, кодирующим цепь TCR α , включают те, которые кодируют аминокислотную последовательность как указано в любой из SEQ ID NO: 8, 16, 24 и 30. Примеры таких полинуклеотидов имеют полинуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 5, 13, 21, 27 и 120, в некоторых вариантах осуществления обеспечен полинуклеотид, имеющий последовательность по меньшей мере приблизительно на 50 % идентичную полинуклеотидной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 5, 13, 21, 27 и 120.

[0150] В дополнительных вариантах осуществления связывающий белок экспрессируется как часть трансгенной конструкции, которая кодирует, и/или иммунная

клетка хозяина, содержащая полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, может дополнительно кодировать: один или более дополнительных аксессуарных белков, таких как белок-переключатель безопасности, метка, селективный маркер, β -цепь корцептора CD8, альфа-цепь корцептора CD8 или обе цепи, или любую их комбинацию. Полинуклеотиды и трансгенные конструкции, пригодные для кодирования и экспрессии связывающих белков и аксессуарных компонентов (например, одного или более из белков-переключателей безопасности, селективных маркеров, β -цепи корцептора CD8 или α -цепи корцептора CD8) описаны в заявке на патент PCT WO 2018/058002, полинуклеотиды, трансгенные конструкции и аксессуарные компоненты, включая их нуклеотидные и аминокислотные последовательности, описанные в указанной публикации, включены в настоящий документ посредством ссылки. Следует понимать, что любой или все связывающие белки по настоящему изобретению, белок-переключатель безопасности, метка, селективный маркер, β -цепь корцептора CD8 или α -цепь корцептора CD8 могут кодироваться единственной молекулой нуклеиновой кислоты или могут кодироваться полинуклеотидными последовательностями, которые представляют собой или присутствуют на отдельных молекулах нуклеиновых кислот.

[0151] Примеры белков-переключателей («switch»-белки) безопасности включают, например, усеченный полипептид рецептора EGF (huEGFRt), который лишен внеклеточных N-концевых лигандсвязывающих доменов и активности внутриклеточной рецепторной тирозинкиназы, но который сохраняет свою природную аминокислотную последовательность, имеет трансмембранный тип I локализации на клеточной поверхности и имеет конформационно интактный связывающий эпитоп для моноклонального антитела против EGFR фармацевтической степени чистоты, рецептор цетуксимаба (Erbix) tEGF (tEGFr, Wang et al., Blood 118:1255-1263, 2011), полипептид каспазы (например, iCasp9, Straathof et al., Blood 105:4247-4254, 2005, Di Stasi et al., N. Engl. J. Med. 365:1673-1683, 2011, Zhou and Brenner, Exp. Hematol. pii: S0301-472X(16)30513-6. doi:10.1016/j.exphem.2016.07.011), RQR8 (Philip et al., Blood 124:1277-1287, 2014), метку из 10 аминокислот, полученную из человеческого белка с-мус (Myc) (Kieback et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:623-628, 2008), и полипептид маркера/переключателя безопасности, такой как RQR (CD20 + CD34, Philip et al., 2014).

[0152] Другие аксессуарные компоненты, пригодные для рекомбинантных клеток-хозяев по настоящему изобретению, содержат метку или селективный маркер, который позволяет идентифицировать, сортировать, выделять, обогащать или отслеживать клетки. Например, меченые клетки, имеющие желаемые характеристики (например, антиген-специфический TCR и белок-переключатель безопасности), могут быть отсортированы от

немаркированных клеток в образце и более эффективно активировать и размножить для включения в продукт желаемой чистоты.

[0153] В контексте данного документа термин "селективный маркер" включает конструкцию нуклеиновой кислоты (и кодируемый генный продукт), который придает идентифицируемое изменение клетке, позволяя обнаруживать и положительный отбор иммунных клеток, трансдуцированных полинуклеотидом, содержащим селективный маркер. RQR представляет собой селективный маркер, содержащий главную внеклеточную петлю CD20 и два минимальных сайта связывания CD34. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий RQR, включает полинуклеотид, который кодирует минимальный эпитоп CD34 из 16 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления минимальный эпитоп CD34 включен в аминоконцевое положение стеблеобразного домена корцептора CD8 (Q8). В дополнительных вариантах осуществления последовательность минимального сайта связывания CD34 может быть объединена с целевым эпитопом для CD20 с образованием компактного маркерного/"суицидального" гена для Т-лимфоцитов (RQR8) (Philip et al., 2014, включена в настоящее описание посредством ссылки). Такая конструкция позволяет отобрать иммунные клетки, экспрессирующие конструкцию, например, с CD34-специфическим антителом, связанным с магнитными шариками (Miltenyi), и применять клинически приемлемое фармацевтическое антитело ритуксимаб, позволяющее селективную делецию трансгена, экспрессирующего сконструированные Т-лимфоциты (Philip et al., 2014).

[0154] Дополнительные типичные селективные маркеры также включают несколько усеченных трансмембранных белков типа I, обычно не экспрессируемых на Т-клетках: усеченный низкоаффинный фактор роста нервов, усеченный CD19 и усеченный CD34 (см., например, Di Stasi et al., N. Engl. J. Med. 365:1673-1683, 2011, Mavilio et al., Blood 83:1988-1997, 1994, Fehse et al., Mol. Ther. 1:448-456, 2000, содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки). Полезным признаком CD19 и CD34 является наличие готовой к применению системы отбора Miltenyi CliniMACs™, которая может нацеливать данные маркеры для сортировки клинического уровня. Однако CD19 и CD34 представляют собой относительно большие поверхностные белки, которые могут влиять на способность упаковки вектора и эффективность транскрипции интегрирующего вектора. Также можно применять поверхностные маркеры, содержащие внеклеточные, несигнальные домены или различные белки (например, CD19, CD34, LNGFR). Можно применять любой селективный маркер, и он должен соответствовать нормам надлежащей производственной практики. В некоторых вариантах осуществления селективные маркеры экспрессируются полинуклеотидом,

который кодирует генный продукт, представляющий интерес (например, связывающий белок по настоящему изобретению, такой как TCR или CAR). Дополнительные примеры селективных маркеров включают, например, репортеры, такие как GFP, EGFP, β -gal или хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT). В некоторых вариантах осуществления селективный маркер, такой как, например, CD34, экспрессируется клеткой, и CD34 можно применять для отбора, обогащения или выделения (например, иммуномагнитного разделения) трансдуцированных клеток, представляющих интерес, для применения в способах по настоящему изобретению. В контексте данного документа, маркер CD34 отличается от антитела против CD34 или, например, scFv, TCR или другой части распознавания антигена, которая связывается с CD34.

[0155] В некоторых вариантах осуществления селективный маркер содержит полипептид RQR, низкоаффинный усеченный фактор роста нервов (tNGFR), усеченный CD19 (tCD19), усеченный CD34 (tCD34) или любую их комбинацию.

[0156] При практическом применении различных вариантов осуществления настоящего изобретения стандартные способы можно применять для получения рекомбинантной ДНК, пептида и олигонуклеотида, иммуноанализа, культуры ткани, и трансформации (например, электропорация и липофекция). Ферментативные реакции и способы очистки могут быть выполнены в соответствии с рекомендациями производителя или в соответствии с обычными способами, применяемыми в данной области техники, или описанными в данном документе. Такие и связанные с ними способы и процедуры могут обычно выполняться в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более конкретных публикациях в области микробиологии, молекулярной биологии, биохимии, молекулярной генетики, клеточной биологии, вирусологии и иммунологии, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании (см., например, Sambrook, et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, updated July 2008), *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (IRL Press, Oxford Univ. Press USA, 1985), *Current Protocols in Immunology* (Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY), *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*, Edited by Julie Logan, Kirstin Edwards and Nick Saunders, 2009, Caister Academic Press, Norfolk, UK, Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992), Guthrie and Fink, *Guide to Yeast*

Genetics and Molecular Biology (Academic Press, New York, 1991), Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, Ed., 1984), Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1985), Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984), Animal Cell Culture (R. Freshney, Ed., 1986), Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984), Next-Generation Genome Sequencing (Janitz, 2008 Wiley-VCH), PCR Protocols (Methods in Molecular Biology) (Park, Ed., 3rd Edition, 2010 Humana Press), Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986), the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.), Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory), Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987), Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and CC Blackwell, eds., 1986), Roitt, Essential Immunology, 6th Edition, (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988), Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed., 2002), Embryonic Stem Cell Protocols: Volume I: Isolation and Characterization (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed., 2006), Embryonic Stem Cell Protocols: Volume II: Differentiation Models (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed., 2006), Human Embryonic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen Ed., 2006), Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Darwin J. Prockop, Donald G. Phinney, and Bruce A. Bunnell Eds., 2008), Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Medicine) (Christopher A. Klug, and Craig T. Jordan Eds., 2001), и Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kevin D. Bunting Ed., 2008) Neural Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Leslie P. Weiner Ed., 2008)).

[0157] Настоящее изобретение также относится к векторам, содержащим полинуклеотид по настоящему изобретению. Можно применять любой подходящий вектор экспрессии, включая иллюстративный вектор экспрессии, описанный в данном документе. Кроме того, вектор экспрессии может иметь подходящую конфигурацию или способен доставлять полинуклеотид в клетку-хозяина.

[0158] Типичный вектор может содержать молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана, или которая способна реплицироваться в организме-хозяине. В контексте данного документа, некоторые примеры векторов включают плазмиды, вирусные векторы, космиды и другие.

[0159] Некоторые векторы могут быть способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации и эписомальные векторы млекопитающих),

тогда как другие векторы могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Кроме того, некоторые векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны (такие векторы могут называться "векторами экспрессии"). В соответствии с родственными вариантами осуществления также следует понимать, что, если один или более агентов (например, полинуклеотиды, кодирующие Msln-специфический связывающий белок или его вариант, как описано в настоящем документе) совместно вводят субъекту, причем каждый агент может находиться в отдельных или одинаковых векторах, и множестве векторов (каждый из которых содержит другой агент или один и тот же агент), они могут быть введены в клетку или популяцию клеток или введены субъекту.

[0160] В контексте данного документа термин "вектор экспрессии" относится к конструкции ДНК, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, которая функционально связана с подходящей контрольной последовательностью, способной влиять на экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты в подходящем хозяине. Такие контрольные последовательности включают промотор для осуществления транскрипции, необязательную операторную последовательность для контроля такой транскрипции, последовательность, кодирующую подходящие сайты связывания мРНК с рибосомами, и последовательности, которые контролируют завершение транскрипции и трансляции. Вектор может представлять собой плазмиду, фаговую частицу, вирус или просто необязательную геномную вставку. После введения в подходящего хозяина вектор может реплицироваться и функционировать независимо от генома хозяина или, в некоторых случаях, может интегрироваться в сам геном. В настоящем описании термины "плазида", "экспрессионная плазида", "вирус" и "вектор" часто представляют собой взаимозаменяемые.

[0161] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор применяют для введения неэндогенной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей мишень-специфический полипептид. Вирусный вектор может представлять ретровирусный вектор или лентивирусный вектор. Вирусный вектор может также содержать последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие маркер трансдукции.

[0162] Вирусные векторы, подходящие для применения с композициями по настоящему изобретению, включают векторы, подходящие для применения в генной терапии человека (см. Pfeifer and Verma, *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2:177, 2001). Подходящие вирусные векторы включают векторы на основе РНК-вирусов, такие как векторы, полученные от ретровирусов, например, векторы, полученные от вируса

мышинного лейкоза Молони (MLV), и включают более сложные векторы на основе ретровируса, например векторы, полученные от лентивируса. К этой категории относятся векторы, полученные от ВИЧ-1.

[0163] Вирусные векторы включают ретровирус, аденовирус, парвовирус (например, аденоассоциированные вирусы), коронавирусы, вирусы с отрицательной цепью РНК, такие как ортомиксовирус (например, вирус гриппа), рабдовирус (например, вирус бешенства и везикулярного стоматита), парамиксовирус (например, кори и Сендай), вирусы с положительной цепью РНК, такие как пикорнавирус и альфавирус, и вирусы с двухцепочечной ДНК, включая аденовирус, вирус герпеса (например, вирус простого герпеса типов 1 и 2, вирус Эпштейн-Барра и цитомегаловирус) и поксвирус (например, коровьей оспы, птичьей оспы и канареек). Другие вирусы включают, но не ограничиваются ими, вирус Норуолк, тогавирус, флавивирус, реовирусы, паповавирус, гепаднавирус и вирус гепатита. Примеры ретровирусов включают лейкоз-саркому птиц, вирусы С-типа, В-типа, D-типа млекопитающих, группу HTLV-BLV, лентивирус и спумавирус (Coffin, J. M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, In *Fundamental Virology*, Third Edition, B. N. Fields, et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996).

[0164] "Ретровирусы" представляют собой вирусы, имеющие геном РНК, который подвергается обратной транскрипции в ДНК с помощью фермента обратной транскриптазы, после чего обратно транскрибируемая ДНК включается в геном клетки-хозяина. "Гаммаретровирус" относится к роду семейства Ретровирусы. Примеры гаммаретровирусов включают вирус стволовых клеток мыши, вирус лейкоза мышей, вирус лейкоза кошек, вирус саркомы кошек и вирусы ретикулоэндотелиоза птиц.

[0165] "Лентивирусный вектор" в контексте настоящего описания относится к лентивирусным векторам на основе ВИЧ для доставки генов, которые могут быть интегративными или неинтегративными, обладают относительно большой упаковочной способностью и могут трансдуцировать ряд различных типов клеток. Лентивирусные векторы обычно образуются после временной трансфекции трех (упаковка, оболочка и перенос) или более плазмид в клетки-продуценты. Подобно ВИЧ, лентивирусные векторы проникают в клетку-мишень посредством взаимодействия гликопротеинов на поверхности вируса с рецепторами на поверхности клетки. При входе вирусная РНК подвергается обратной транскрипции, которая опосредуется комплексом обратной транскриптазы вируса. Продукт обратной транскрипции представляет собой двухцепочечную линейную вирусную ДНК, которая является субстратом для интеграции вируса в ДНК инфицированных клеток. "Лентивирус" относится к роду ретровирусов,

которые способны инфицировать делящиеся и неделящиеся клетки. Несколько примеров лентивирусов включают ВИЧ (вирус иммунодефицита человека: включая ВИЧ типа 1 и ВИЧ типа 2), вирус инфекционной анемии лошадей, вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV), и вирус иммунодефицита обезьян (SIV). Другие примеры включают лентивирусные векторы, полученные из ВИЧ-2, FIV, вируса инфекционной анемии лошадей, SIV и вируса висна-маэди (лентивирус овец).

[0166] Способы применения ретровирусных и лентивирусных вирусных векторов и упаковывающих клеток для трансдукции клеток-хозяев млекопитающих вирусными частицами, содержащими трансгены химерного антигенного рецептора, известны в данной области техники и были ранее описаны, например, в патенте США № 8119772, Walchli, et al., PLoS One 6:327930, 2011, Zhao, et al., J. Immunol. 174:4415, 2005, Engels, et al., Hum. Gene Ther. 14: 1155, 2003, Frecha, et al., Mol. Ther. 75: 1748, 2010, и Verhoeven, et al., Methods Mol. Biol. 506:91, 2009. Ретровирусные и лентивирусные векторные конструкции и системы экспрессии также коммерчески доступны.

[0167] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой гаммаретровирус, например векторы, производные от вируса мышинного лейкоза Молони (MLV). В других вариантах осуществления вирусный вектор может быть более сложным вектором, полученным от ретровируса, например, вектором, полученным от лентивируса. К этой категории относятся векторы, производные от ВИЧ-1. Другие примеры включают лентивирусные векторы, полученные от ВИЧ-2, FIV, вируса инфекционной анемии лошадей, SIV и вируса висна-маэди (лентивирус овец). Способы применения ретровирусных и лентивирусных векторов и упаковывающих клеток для трансдукции клеток-хозяев млекопитающих вирусными частицами, содержащими трансгены TCR или CAR, известны в данной области техники и были ранее описаны, например, в патенте США 8119772, Walchli et al., PLoS One 6:327930, 2011, Zhao et al., J. Immunol. 174:4415, 2005, Engels et al., Hum. Gene Ther. 14:1155, 2003, Frecha et al., Mol. Ther. 18:1748, 2010, и Verhoeven et al., Methods Mol. Biol. 506:97, 2009. Ретровирусные и лентивирусные векторные конструкции и системы экспрессии также коммерчески доступны. Другие вирусные векторы также можно применять для доставки полинуклеотидов, включая ДНК-вирусные векторы, включая, например, векторы на основе аденовируса и векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV), векторы, полученные от вирусов простого герпеса (HSV), включая векторы ампликонов, HSV с дефектом репликации и аттенуированный HSV (Krisky et al., Gene Ther. 5:1517, 1998).

[0168] Другие векторы, разработанные для применения в генной терапии, также можно применять с композициями и способами по настоящему изобретению. Такие

векторы включают векторы, полученные из бакуловирусов и α -вирусов. (Jolly, D. J. 1999. Emerging Viral Vectors. Pp. 209-40 in Friedmann T. ed. The Development of Human Gene Therapy. New York: Cold Spring Harbor Lab), или плазмидные векторы (такие как Sleeping Beauty или другие транспозонные векторы).

[0169] Когда геном вирусного вектора содержит множество полинуклеотидов, которые должны экспрессироваться в клетке-хозяине в виде отдельных транскриптов, вирусный вектор может также содержать дополнительные последовательности между двумя (или более) транскриптами, обеспечивающие бицистронную или мультицистронную экспрессию. Примеры таких последовательностей, применяемых в вирусных векторах, включают внутренние сайты посадки рибосомы (IRES), сайты расщепления фурином, вирусный пептид 2A или любую их комбинацию.

[0170] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий Msln-специфический связывающий белок, может быть функционально связан с одним или более определенными элементами вектора. Например, полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для осуществления экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы, могут быть функционально связаны. Последовательности контроля экспрессии могут включать соответствующие последовательности инициации, терминации, промотора и энхансера транскрипции, эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования, последовательности, стабилизирующие цитоплазматическую мРНК, последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусные последовательности Козака), последовательности, повышающие стабильность белка, и, необязательно, последовательности, которые усиливают секрецию белка. Последовательности контроля экспрессии могут быть функционально связаны, если они смежные с геном, представляющим интерес, и последовательностями контроля экспрессии, которые действуют транс-активно или на расстоянии, чтобы контролировать ген, представляющий интерес. В некоторых вариантах осуществления вирусный или плазмидный вектор дополнительно содержит маркер трансдукции (например, зеленый флуоресцентный белок, tEGFR, tCD19, tNGFR и т.д.).

[0171] В некоторых вариантах осуществления вектор способен доставлять полинуклеотидную конструкцию в клетку-хозяина (например, гематопозитическую клетку-предшественника или клетку иммунной системы человека). В конкретных вариантах осуществления вектор способен доставлять конструкцию в клетку иммунной системы человека, такую как, например, CD4⁺ Т-клетка, CD8⁺ Т-клетка, CD4⁻ CD8⁻ двойная негативная Т-клетка, $\gamma\delta$ Т-клетка, натуральная клетка-киллер, дендритная клетка или

любая их комбинация. В дополнительных вариантах осуществления вектор способен доставлять конструкцию в наивную Т-клетку, центральную Т-клетку памяти, стволовую Т-клетку памяти, эффекторную Т-клетку памяти или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления вектор, который кодирует конструкцию по настоящему изобретению, может дополнительно содержать полинуклеотид, кодирующий нуклеазу, которую можно применять для выполнения хромосомного нокаута в клетке-хозяине (например, эндонуклеаза CRISPR-Cas или другая эндонуклеаза, как описано в настоящем документе) или которую можно применять для доставки терапевтического трансгена или его части в клетку-хозяин в заместительной генной терапии или терапии репарации генов. Альтернативно, нуклеаза, применяемая для хромосомного нокаута, замены гена или терапии репарации генов, может быть доставлена в клетку-хозяин независимо от вектора, который кодирует конструкцию по настоящему изобретению.

[0172] Получение вектора экспрессии, применяемого для рекомбинантного получения Msln-специфического связывающего белка, может быть выполнено с применением любых подходящих способов молекулярной биологии, известных в данной области техники, включая применение расщепления рестрикционной эндонуклеазой, лигирования, трансформации, очистки плазмиды и секвенирования ДНК, например, как описано в Sambrook, et al. (1989 and 2001 editions, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) и Ausubel, et al. (*Current Protocols in Molecular Biology* (2003)). Для обеспечения эффективной транскрипции и трансляции полинуклеотид в каждой рекомбинантной конструкции экспрессии включает по меньшей мере одну соответствующую последовательность контроля экспрессии (также называемую регуляторной последовательностью), такую как лидерная последовательность и, в частности, промотор, функционально (т.е. эффективно) связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок или пептид, представляющий интерес.

[0173] В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие связывающий белок, специфичный для пептида Msln₂₀₋₂₈ или Msln₅₃₀₋₅₃₈, применяют для трансфекции/трансдукции клетки-хозяина (например, Т-лимфоцитов) для применения в терапии путем адоптивного переноса. Достижения в секвенировании TCR описаны в публикациях (например, Robins, et al, 2009 *Blood* 114:4099, Robins, et al, 2010 *Sci. Translat. Med.* 2:47ra64, PMID: 20811043, Robins, et al. 2011 (Sept. 10) *J. Imm. Meth.* Epub ahead of print, PMID: 21945395, и Warren, et al., 2011 *Genome Res.* 21:790) и подходят для практического применения вариантов осуществления по настоящему изобретению.

[0174] Аналогичным образом были описаны способы трансфекции/трансдукции Т-клеток желаемыми нуклеиновыми кислотами (например, US 2004/0087025), включая способы адоптивного переноса с применением Т-лимфоцитов с желаемой антиген-специфичностью (например, Schmitt, et al., Hum. Gen. 20: 1240, 2009, Dossett, et al., Mol. Ther. 77:742, 2009, Till et al, Blood 112:2261, 2008, Wang, et al., Hum. Gene Ther. 18:112, 2007, Kuball et al, Blood 109:2331, 2007, US 2011/0243972, US 2011/0189141, и Leen, et al., Ann. Rev. Immunol. 25:243, 2007), таким образом предполагается адаптация указанных способов к раскрытым в настоящей заявке вариантам осуществления, на основе представлений, описанных в данном документе, включая те, которые направлены на связывание белков, специфичных для пептида Msln₂₀₋₂₈ (SEQ ID NO: 31) или Msln₅₃₀₋₅₃₈ (SEQ ID NO: 32) в комплексе с рецептором HLA.

[0175] Рекомбинантные векторы экспрессии могут включать, например, специфические для лимфоидной ткани регуляторные элементы транскрипции (TRE), такие как В-лимфоциты, Т-лимфоциты или TRE, специфичные для дендритных клеток. Специфические TRE для лимфоидной ткани известны в данной области техники (см., например, Thompson, et al., Mol. Cell. Biol. 72:1043, (1992), Todd et al, J. Exp. Med. 177:1663, (1993)), и Penix et al., J. Exp. Med. 775:1483 (1993)).

[0176] Также обеспечены рекомбинантные (например, модифицированные) клетки-хозяева, которые кодируют (например, содержат кодирующий гетерологичный полинуклеотид) и/или экспрессируют Msln-специфический связывающий белок, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин может быть кроветворной клеткой-предшественником или клеткой иммунной системы, как описано в данном документе, такой как клетка иммунной системы человека. В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, клетка иммунной системы представляет собой CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, CD4⁻ CD8⁻ двойной отрицательный Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, натуральную клетку-киллер, натуральную Т-клетку-киллер, макрофаг, дендритную клетку или любую их комбинацию. Кроме того, Т-клетка может быть наивной Т-клеткой, центральной Т-клеткой памяти, эффекторной Т-клеткой памяти, стволовой Т-клеткой памяти или любой их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин модифицирована так, чтобы содержать или включать гетерологичный полинуклеотид, с применением вектора, как описано в данном документе.

[0177] Рекомбинантная клетка-хозяин может быть аллогенной, сингенной или аутологичной (например, для субъекта, который получает клетку-хозяина для лечения). В некоторых вариантах осуществления, где клетка-хозяин кодирует эндогенный TCR, гетерологичный связывающий белок или TCR, экспрессируемый Т-лимфоцитом, способен

более эффективно связываться с белком CD3 по сравнению с эндогенным TCR. В некоторых вариантах осуществления Msln-специфический связывающий белок, экспрессируемый Т-клеткой-хозяином, способен связываться с комплексом CD3 и проявлять функциональную экспрессию на клеточной поверхности и иммунную активность, например, продукцию цитокинов и/или уничтожение антиген-экспрессирующих клеток-мишеней. В некоторых вариантах осуществления Msln-специфический связывающий белок может иметь более высокую экспрессию на клеточной поверхности по сравнению с эндогенным TCR.

[0178] В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, клетка-хозяин, такая как иммунная клетка-хозяин, может содержать нокаут хромосомного гена эндогенного белка иммунной клетки, такого как, например, PD-1, TIM3, LAG3, CTLA4, TIGIT, компонент HLA или компонент TCR, или любую их комбинацию. В контексте данного документа термин "нокаут хромосомного гена" относится к генетическому изменению или введенному ингибирующему агенту в клетку-хозяин, который предотвращает (например, снижает, задерживает, подавляет или отменяет) продуцирование клеткой-хозяином функционально активного эндогенного полипептидного продукта. Изменения, приводящие к нокауту хромосомного гена, могут включать, например, введенные нонсенс-мутации (включая образование преждевременных стоп-кодона), миссенс-мутации, делеции гена и разрывы цепей, а также гетерологичную экспрессию ингибирующих молекул нуклеиновых кислот, которые ингибируют эндогенные гены экспрессии в клетке-хозяине.

[0179] Нокаут хромосомного гена можно подтвердить непосредственно секвенированием ДНК иммунной клетки-хозяина после применения способа нокаута или агента. Сделать вывод о нокауте хромосомного гена можно также при отсутствии экспрессии гена (например, отсутствии продукта мРНК или полипептида, кодируемого геном) после нокаута.

[0180] В некоторых вариантах осуществления нокаут хромосомного гена или нокаут гена осуществляется путем редактирования хромосомы клетки-хозяина. Хромосомное редактирование можно проводить, например, с помощью эндонуклеаз. В контексте данного документа термин "эндонуклеаза" относится к ферменту, способному катализировать расщепление фосфодиэфирной связи в полинуклеотидной цепи. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза способна расщеплять ген-мишень, тем самым инактивируя или "нокаутируя" ген-мишень. Эндонуклеаза может быть природной, рекомбинантной, генетически модифицированной или гибридной эндонуклеазой. Разрывы цепи нуклеиновой кислоты, вызванные эндонуклеазой, обычно восстанавливаются с

помощью различных механизмов гомологичной рекомбинации или нехомологичного соединения концов (NHEJ). Во время гомологичной рекомбинации молекула донорной нуклеиновой кислоты может быть использована для "нокаута" донорного гена, для "нокаута" гена-мишени и, необязательно, для инактивации гена-мишени посредством нокаута донорного гена или нокаута гена-мишени. NHEJ представляет собой склонный к ошибкам процесс репарации, который часто приводит к изменениям последовательности ДНК в месте расщепления, например, замене, делеции или добавлению по меньшей мере одного нуклеотида. NHEJ можно применять для "нокаута" гена-мишени. Примеры эндонуклеаз включают нуклеазы с цинковыми пальцами, нуклеазы TALE, нуклеазы CRISPR-Cas, мегануклеазы и мегаTAL.

[0181] В контексте данного документа термин "нуклеаза с цинковыми пальцами" (ZFN) относится к слитому белку, содержащему ДНК-связывающий домен с цинковыми пальцами, слитый с неспецифическим доменом расщепления ДНК, таким как эндонуклеаза FokI. Каждый мотив цинкового пальца из приблизительно 30 аминокислот связывается приблизительно с 3 парами оснований ДНК, и аминокислоты в определенных остатках могут быть изменены для изменения специфичности триплетной последовательности (см., например, Desjarlais et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90:2256-2260, 1993, Wolfe et al., J. Mol. Biol. 285:1917-1934, 1999). Множественные мотивы цинковых пальцев могут быть связаны в тандеме для создания специфичности связывания с желаемыми последовательностями ДНК, такими как области, имеющие длину от приблизительно 9 до приблизительно 18 пар оснований. В качестве пояснения, ZFN опосредуют редактирование генома, катализируя образование сайт-специфического двухцепочечного разрыва ДНК (DSB) в геноме, а целенаправленная интеграция трансгена, содержащего фланкирующие последовательности, гомологичные геному в сайте DSB, облегчается за счет гомологической репарации. Альтернативно, DSB, образуемый ZFN, может приводить к нокауту гена-мишени посредством репарации вследствие нехомологичного соединения концов (NHEJ), представляющего собой путь клеточной репарации с ошибками, который приводит к вставке или удалению нуклеотидов в сайте расщепления. В некоторых вариантах осуществления нокаут гена включает вставку, делецию, мутацию или их комбинацию, сделанные с применением молекулы ZFN.

[0182] В контексте данного документа термин "эффекторная нуклеаза, подобная активатору транскрипции" (TALEN) относится к слитому белку, содержащему ДНК-связывающий домен TALE и домен расщепления ДНК, такой как эндонуклеаза FokI. "ДНК-связывающий домен TALE" или "TALE" состоит из одного или более повторяющихся доменов/единиц TALE, каждый из которых обычно имеет

высококонсервативную последовательность от 33 до 35 аминокислот с дивергированными 12-ой и 13-ой аминокислотами. Домены повторов TALE участвуют в связывании TALE с целевой последовательностью ДНК. Дивергированные аминокислотные остатки, пара переменных аминокислотных остатков (RVD), коррелируют со специфическим распознаванием нуклеотидов. Естественный (канонический) код распознавания ДНК таких TALE был определен таким образом, что последовательность HD (гистидин-аспарагиновая кислота) в положениях 12 и 13 TALE приводит к связыванию TALE с цитозином (C), NG (аспарагин-глицин) связывается с нуклеотидом T, NI (аспарагин-изолейцин) с A, NN (аспарагин-аспарагин) связывается с нуклеотидом G или A, и NG (аспарагин-глицин) связывается с нуклеотидом T. Также известны неканонические (атипичные) RVD (см., например, патент США № US 2011/0301073, атипичные RVD полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). TALEN можно применять для управления сайт-специфическими двухцепочечными разрывами (DSB) в геноме Т-клеток. Негомологичное соединение концов (NHEJ) приводит к лигированию ДНК с обеих сторон двухцепочечного разрыва, в котором существует небольшое перекрытие последовательностей для отжига или оно отсутствует, тем самым вводя ошибки, инактивирующие экспрессию гена. Альтернативно, гомологической репарацией можно вводить трансген в сайт DSB, обеспечивая присутствие в трансгене гомологичных фланкирующих последовательностей. В некоторых вариантах осуществления нокаут гена включает вставку, делецию, мутацию или их комбинацию и осуществляется с применением молекулы TALEN.

[0183] В контексте данного документа нуклеазная система "кластерные короткие палиндромные повторы, разделённые регулярными промежутками/Cas" (CRISPR/Cas) относится к системе, в которой применяется нуклеаза Cas, направляемая CRISPR-РНК (crРНК), для распознавания целевых сайтов в геноме (известные в качестве протоспейсеров) посредством комплементарности спаривания оснований, а затем расщепления ДНК, если короткий консервативный мотив, связанный с протоспейсером (PAM), следует сразу за 3' комплементарной целевой последовательностью. Системы CRISPR/Cas подразделяют на три типа (т.е. тип I, тип II и тип III) в зависимости от последовательности и структуры нуклеаз Cas. Контрольные комплексы, управляемые crРНК, в типах I и III нуждаются в нескольких субъединицах Cas. Система типа II, наиболее изученная, содержит по меньшей мере три компонента: РНК-направляемую нуклеазу Cas9, crРНК и транс-активную crРНК (tracrРНК). TracrРНК представляет собой дуплекс-образующую область. CrРНК и tracrРНК образуют дуплекс, способный взаимодействовать с нуклеазой Cas9 и направлять комплекс Cas9/crРНК:tracrРНК к

определенному сайту на целевой ДНК посредством образования пары оснований Уотсона-Крика между спейсером на crPНК и протоспейсером на целевой ДНК выше РАМ. Нуклеаза Cas9 расщепляет двухцепочечный разрыв в области, определяемой спейсером crPНК. Репарация с помощью NHEJ приводит к вставкам и/или делециям, которые нарушают экспрессию целевого локуса. Альтернативно, трансген с гомологичными фланкирующими последовательностями может быть введен в сайт DSB посредством гомологической репарации. CrPНК и tracrPНК могут быть сконструированы в одиночную направляющую PНК (sgPНК или gPНК) (см., например, Jinek et al., Science 337:816-21, 2012). Кроме того, область направляющей PНК, комплементарной целевому сайту, может быть изменена или запрограммирована для нацеливания на желаемую последовательность (Xie et al., PLOS One 9:e100448, 2014, заявка на патент США № US 2014/0068797, заявка на патент США № US 2014/0186843, патент США № 8697359 и PCT № WO 2015/071474, содержание каждой из которых включено посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления нокаут гена включает вставку, делецию, мутацию или их комбинацию и выполняется с применением системы нуклеаз CRISPR/Cas.

[0184] Типичные последовательности gPНК и способы их применения для нокаута эндогенных генов, кодирующих белки иммунных клеток, включают те, что описаны в публикации Ren et al., Clin. Cancer Res. 23(9):2255-2266 (2017), где gRNA, ДНК CAS9, векторы и способы нокаута генов полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

[0185] В контексте данного документа термин "мегануклеаза", также называемая "хоминг-эндонуклеазой", относится к эндодезоксирибонуклеазе, характеризующейся большим сайтом распознавания (двухцепочечные последовательности ДНК от приблизительно 12 до приблизительно 40 пар оснований). Мегануклеазы можно разделить на пять семейств на основе мотивов последовательности и структуры: LAGLIDADG (SEQ ID NO: 121), GIY-YIG (SEQ ID NO: 122), HNH, кассета His-Cys и PD-(D/E)XK (SEQ ID NO: 123). Примеры мегануклеаз включают I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII и I-TevIII, последовательности распознавания которых известны (см., например, патенты США № 5,420,032 и 6,833,252, Belfort et al., Nucleic Acids Res. 25:3379-3388, 1997, Dujon et al., Gene 82:115-118, 1989, Perler et al., Nucleic Acids Res. 22:1125-1127, 1994, Jasin, Trends Genet. 12:224-228, 1996, Gimble et al., J. Mol. Biol. 263:163-180, 1996, Argast et al., J. Mol. Biol. 280:345-353, 1998).

[0186] В некоторых вариантах осуществления природные мегануклеазы можно применять для стимуляции сайт-специфической модификации генома мишени, выбранной

из PD-1, LAG3, TIM3, CTLA4, TIGIT, гена, кодирующего HLA, или гена, кодирующего компонент TCR.

[0187] В других вариантах осуществления сконструированную мегануклеазу, обладающую новой специфичностью связывания с геном-мишенью, применяют для сайт-специфической модификации генома (см., например, Porteus et al., *Nat. Biotechnol.* 23:967-73, 2005, Sussman et al., *J. Mol. Biol.* 342:31-41, 2004, Epinat et al., *Nucleic Acids Res.* 31:2952-62, 2003, Chevalier et al., *Molec. Cell* 10:895-905, 2002, Ashworth et al., *Nature* 441:656-659, 2006, Paques et al., *Curr. Gene Ther.* 7:49-66, 2007, патент США № 2007/0117128, США 2006/0206949, США 2006/0153826, США 2006/0078552, и США 2004/0002092). В дополнительных вариантах осуществления нокаут хромосомного гена осуществляют с применением хоминг-эндонуклеазы, модифицированной модульными ДНК-связывающими доменами TALEN, для получения слитого белка, известного как мегаTAL. МегаTAL можно применять не только для нокаута одного или более генов-мишеней, но также для введения (нокин) гетерологичных или экзогенных полинуклеотидов при применении в сочетании с экзогенной донорной матрицей, кодирующей полипептид, представляющий интерес.

[0188] В некоторых вариантах осуществления нокаут хромосомного гена включает ингибирующую молекулу нуклеиновой кислоты, которую вводят в клетку-хозяин (например, иммунную клетку), содержащую гетерологичный полинуклеотид, кодирующий антигенспецифический рецептор, который специфически связывается с антигеном, ассоциированным с опухолью, где ингибирующая молекула нуклеиновой кислоты кодирует мишень-специфический ингибитор, и где кодируемый мишень-специфический ингибитор подавляет экспрессию эндогенного гена (т.е. PD-1, TIM3, LAG3, CTLA4, TIGIT, компонента HLA или компонента TCR, или любую их комбинацию) в иммунной клетке-хозяине.

[0189] В некоторых вариантах осуществления для связывающего белка, представляющего интерес, может быть осуществлен нокин в клетку-хозяин, например, применяя раскрытые способы или реагенты, применимые для нокина интересующего полинуклеотида в клетку-хозяин. В некоторых вариантах осуществления для полинуклеотида, кодирующего связывающий белок, осуществляют нокин в клетку-хозяин, но он не интегрируется в эндогенную хромосому, например, в ядро клетки. В некоторых вариантах осуществления для полинуклеотида, кодирующего связывающий белок, осуществляют нокин в клетку-хозяин в локусе эндогенного гена, необязательно нарушая кодирующую последовательность эндогенного локуса. В некоторых вариантах осуществления для полинуклеотида, кодирующего связывающий белок, может быть

осуществлен нокин в эндогенный локус TCR, что приведет к нокауту эндогенного TCR и нокину белка, представляющего интерес. См., например, Eyquem et al., Nature 543 (7643):113–117 (2017).

[0190] В некоторых вариантах осуществления для полинуклеотида, кодирующего мезотелин-специфический связывающий белок (например, полипептид, содержащий, состоящий или состоящий по существу из аминокислотной последовательности, указанной в любой одной или более из SEQ ID NO: 6-8, 14 -16, 22-24, 28-40, 78-110, 118, 119) осуществляют нокин в клетку-хозяин. Связывающие белки по настоящему изобретению включают переменный домен альфа-цепи TCR (V_α) и переменный домен бета-цепи TCR (V_β). В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, мезотелин-специфический связывающий белок способен специфически связываться с комплексом пептид мезотелин:HLA, таким как комплекс пептид мезотелин:HLA-A*02:01.

[0191] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, нокин гена можно применять для введения полинуклеотида, кодирующего связывающий белок, который способен специфически связываться с антигенным пептидом мезотелином, как описано в данном документе (например, пептид, содержащий, состоящий или состоящий по существу из аминокислотной последовательности по меньшей мере приблизительно на 85 % (т.е. по меньшей мере приблизительно на 86 %, 85 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или более) идентичной аминокислотной последовательности, указанной в любой одной или более из SEQ ID NO: 6-8, 14-16, 22-24, 28-40, 78-110, 118 или 119).

[0192] В некоторых вариантах осуществления для полинуклеотида, кодирующего мезотелин-специфический связывающий белок (например, TCR), осуществляют нокин в клетку-хозяина, и такая клетка-хозяин дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий другой связывающий белок. В некоторых вариантах осуществления другой связывающий белок является гетерологичным по отношению к клетке-хозяину. В других вариантах осуществления другой связывающий белок является эндогенным для клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий другой связывающий белок, был помещен в клетку-хозяина путем нокина. В некоторых вариантах осуществления другой связывающий белок представляет собой связывающий белок, специфичный для другого антигена (например, другого антигена Msln или антигена из другого белка или мишени, такого как, например, BCMA, CA19-9, BRAF, CD3, CEACAM6, c-Met, EGFR, EGFRvIII, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EphA2, IGF1R, GD2, O-ацетил GD2, O-ацетил GD3, GHRHR, GHR, FLT1, KDR, FLT4, CD44v6, CD151, CA125, CEA,

CTLA-4, GITR, BTLA, TGFBR2, TGFBR1, IL6R, gp130, Lewis A, Lewis Y, TNFR1, TNFR2, PD1, PD-L1, PD-L2, HVEM, MAGE-A (например, включая MAGE-A1, MAGE-A3 и MAGE-A4), KRAS, HER2, NY-ESO-1, PSMA, RANK, ROR1, TNFRSF4, CD40, CD137, TWEAK-R, HLA, опухоль- или патоген-ассоциированный пептид, связанный с HLA, пептид hTERT, связанный с HLA, пептид тирозиназа, связанный с HLA, LT β R, LIFR β , LRP5, MUC1, OSMR β , TCR α , TCR β , CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD52, CD56, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86, CD123, CD171, CD276, B7H4, TLR7, TLR9, PTCH1, WT-1, HA1-H, Robo1, α -фетопротеин (AFP), Frizzled, OX40, PRAME и SSX-2 или тому подобное). Например, клетка-хозяин может содержать введенный путем нокина полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, который специфически связывается с комплексом антиген Msln:HLA и (например, введенный путем нокина) полинуклеотид, кодирующий связывающий белок (например, TCR или CAR), который специфически связывается с антигеном CA19-9.

[0193] В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка-хозяин, кодирующая и/или экспрессирующая Msln-специфический связывающий белок по настоящему изобретению, способна преимущественно мигрировать или локализоваться *in vivo* в ткани-мишени, которая экспрессирует когнатный антиген Msln, например в опухоли, но присутствует в статистически значимо сниженном количестве в несмежных тканях того же типа. В качестве примера, иммунная клетка-хозяин может присутствовать в опухоли легкого (например, по данным глубокого секвенирования V-области TCR кодируемого связывающего белка), но присутствует на более низком уровне или вовсе отсутствует, в ткани того же легкого, не прилегающей к опухоли. В некоторых вариантах осуществления несмежная ткань включает или относится к ткани, которая удалена от больной или злокачественной ткани по меньшей мере на 3 см.

[0194] В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин обогащена композицией клеток, которые можно вводить субъекту. В контексте данного документа термин "обогащенный" или "истощенный" по отношению к количеству типов клеток в смеси относится к увеличению количества "обогащенного" типа, уменьшению количества "истощенных" клеток или к тому и другому одновременно, в смеси клеток, полученной в результате одного или более способов, или стадий обогащения или истощения. Таким образом, в зависимости от источника исходной популяции клеток, подвергнутых обогащению, смесь или композиция может содержать 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % или более (по числу или количеству) "обогащенных" клеток. Клетки, подвергнутые истощению, могут привести к смеси или композиции, содержащей 50 %, 45

%, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % или 1 % или менее процентов (по числу или количеству) "истощенных" клеток. В некоторых вариантах осуществления количество клеток определенного типа в смеси будет увеличиваться, а количество клеток другого типа будет истощаться, например, обогащение клеток CD4⁺ при истощении клеток CD8⁺ или обогащение клеток CD62L⁺ при истощении клеток CD62L⁻, или их комбинации.

Применение

[0195] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта, нуждающегося в этом (т.е. имеющего или имеющего подозрение на наличие заболевания или расстройства, связанного с антигеном мезотелина), путем введения субъекту эффективного количества композиции (например, связывающего белка, рекомбинантной клетки-хозяина, полинуклеотида, вектора или родственной композиции), как описано в настоящем документе. Также настоящее изобретение относится к композициям для применения для лечения такого заболевания или для получения лекарственного средства для лечения такого заболевания. Такие заболевания включают различные формы пролиферативных или гиперпролиферативных расстройств, таких как солидный рак и гематологические злокачественные новообразования.

[0196] "Лечить", или "лечение", или "облегчить" относится к медицинскому лечению заболевания, расстройства или состояния субъекта (например, человека или млекопитающего, не относящегося к человеку, такого как примат, лошадь, кошка, собака, коза, мышь или крыса). Как правило, подходящую дозу или схему лечения, включающую клетку-хозяина, экспрессирующую связывающий белок по настоящему изобретению, и необязательно адъювант, вводят в количестве, достаточном для достижения терапевтического или профилактического эффекта. Терапевтический или профилактический/предупреждающий эффект включает улучшение клинического исхода, уменьшение или облегчение симптомов, связанных с заболеванием, уменьшение появления симптомов, улучшение качества жизни, более длительный статус без рецидивов заболевания, уменьшение степени заболевания, стабилизация стадии заболевания, задержка прогрессирования заболевания, ремиссия, продолжительность жизни, длительная продолжительность жизни, или любая их комбинация.

[0197] В контексте данного документа термины "адоптивная иммунотерапия" и "адоптивная клеточная терапия" относятся к введению встречающихся в природе или генно-инженерных иммунных клеток, специфических к антигену, вызывающему заболевание (например, Т-лимфоцитов). Адоптивная клеточная иммунотерапия может быть аутологичной (иммунные клетки от реципиента), аллогенной (иммунные клетки от

донора того же вида) или сингенной (иммунные клетки от донора генетически идентичного реципиенту).

[0198] "Терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" связывающего белка или клетки-хозяина в соответствии с настоящим изобретением относится к количеству связывающих белков или клеток-хозяев, достаточному для достижения статистически значимого терапевтического эффекта, включая улучшение клинического исхода, уменьшение или облегчение симптомов, связанных с заболеванием, уменьшение появления симптомов, улучшение качества жизни, более длительный статус без рецидивов заболевания, уменьшение степени заболевания, стабилизация стадии заболевания, задержка прогрессирования заболевания, ремиссия, продолжительность жизни или длительная продолжительность жизни. Когда речь идет об отдельном активном ингредиенте или клетке, экспрессирующей один активный ингредиент, вводимой отдельно, терапевтически эффективное количество относится к действию данного ингредиента или клетки, экспрессирующей только данный ингредиент. Когда речь идет о комбинации, терапевтически эффективное количество относится к комбинированным количествам активных ингредиентов или комбинированному дополнительному активному ингредиенту с клеткой, экспрессирующей активный ингредиент, что приводит к терапевтическому эффекту, независимо от того, вводятся ли они последовательно или одновременно. Комбинация также может представлять собой клетку, экспрессирующую более одного активного ингредиента, например, два разных связывающих белка, которые специфически связывают антиген, или слитый белок согласно настоящему изобретению.

[0199] В контексте данного документа термин "статистически значимый" относится к р-значению 0,050 или менее при вычислении с применением t-критерия Стьюдента и указывает на маловероятность того, что конкретное событие или измеряемый результат возникли случайно.

[0200] В контексте данного документа термин "гиперпролиферативное расстройство" относится к чрезмерному росту или пролиферации по сравнению с нормальной или не больной клеткой. Типичные гиперпролиферативные расстройства включают опухоли, рак, неопластическую ткань, карциному, саркому, злокачественные клетки, предраковые клетки, а также неопухолевые или доброкачественные гиперпролиферативные нарушения (например, аденому, фиброму, липому, лейомиому, гемангиому, фиброз, рестеноз, а также аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит, остеоартрит, псориаз, воспалительное заболевание кишечника и т.п.). Определенные заболевания, которые связаны с аномальным или чрезмерным ростом, который происходит медленнее, чем в контексте гиперпролиферативного заболевания,

могут называться "пролиферативными заболеваниями" и включают определенные опухоли, рак, опухолевую ткань, карциному, саркому, злокачественные клетки, предраковые клетки, а также неопухолевые или доброкачественные заболевания.

[0201] Кроме того, "рак" может относиться к любой ускоренной пролиферации клеток, включая солидные опухоли, асцитные опухоли, злокачественные заболевания крови или лимфы или других тканей, злокачественные новообразования соединительной ткани, метастатическое заболевание, минимальная остаточная болезнь после трансплантации органов или стволовых клеток, типы рака с множественной лекарственной устойчивостью, первичные или вторичные злокачественные новообразования, ангиогенез, связанный со злокачественными новообразованиями, или другие формы рака.

[0202] Раскрытые в настоящей заявке связывающие белки, клетки-хозяева, полинуклеотиды, векторы и композиции применимы для лечения или получения лекарственного средства для лечения рака, где пептид Msln₂₀₋₂₈ экспрессируется на опухолевой клетке указанного злокачественного образования, и/или где пептид Msln₅₃₀₋₅₃₈ экспрессируется на опухолевой клетке указанного злокачественного образования, примеры рака для лечения включают мезотелиому, рак поджелудочной железы, рак яичников и рак легких.

[0203] В некоторых вариантах осуществления раскрытые в настоящей заявке связывающие белки, клетки-хозяева, полинуклеотиды, векторы и композиции применимы для лечения и/или получения лекарственного средства для лечения рака, такого как солидный рак или гематологическое злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления изобретения солидный рак выбран из или включает рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, карциному костей и мягких тканей, опухоль головного мозга, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, колоректальную аденокарциному, колоректальный рак, десмоидную опухоль, эмбриональный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, аденокарциному желудка, мультиформную глиобластому, гинекологическую опухоль, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак печени, рак легких, мезотелиому, злокачественную меланому, остеосаркому, рак яичников, рак поджелудочной железы, аденокарциному протоков поджелудочной железы, первичную астроцитарную опухоль, первичный рак щитовидной железы, рак предстательной железы, рак почек, почечно-клеточную карциному, рабдомиосаркому, рак кожи, саркому мягких тканей, опухоль половых клеток яичка, уротелиальный рак, саркому матки или рак матки.

[0204] В некоторых вариантах осуществления рак, поддающийся лечению в соответствии со способами и применениями по настоящему изобретению, включает карциному, саркому, глиому, лимфому, лейкоз, миелому или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления рак включает рак головы или шеи, меланому, рак поджелудочной железы, холангиокарциному, гепатоцеллюлярный рак, рак молочной железы, включая тройной отрицательный рак молочной железы (TNBC), рак желудка, немелкоклеточный рак легких, рак предстательной железы, рак пищевода, мезотелиому, мелкоклеточный рак легких, колоректальный рак, глиобластому или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления рак включает опухоль Аскина, гроздевидную саркому, хондросаркому, саркому Юинга, примитивную нейроэктодермальную опухоль, злокачественную гемангиоэндотелиому, злокачественную шванному, остеосаркому, саркому мягкой альвеолярной части, ангиосаркому, филоидную цистосаркому, возвышающуюся дерматофибросаркому (DFSP), десмоидную опухоль, десмопластическую мелкоклеточную опухоль, эпителиоидную саркому, внескелетную хондросаркому, внескелетную остеосаркому, фибросаркому, желудочно-кишечную стромальную опухоль (GIST), гемангиоперицитому, гемангиосаркому, саркому Капоши, лейомиосаркому, липосаркому, лимфангиосаркому, лимфосаркому, недифференцированную плеоморфную саркому, злокачественную опухоль оболочек периферических нервов (MPNST), нейрофибросаркому, рабдомиосаркому, синовиальную саркому, недифференцированную плеоморфную саркому, плоскоклеточный рак, базально-клеточный рак, аденокарциному, диффузный рак желудка, випому, холангиокарциному, гепатоцеллюлярную карциному, аденоидно-кистозную карциному, почечно-клеточную карциному, светлоклеточный рак почки, эпендимому, астроцитому, олигодендроглиому, глиому ствола головного мозга, глиому зрительного нерва, смешанную глиому, лимфому Ходжкина, В-клеточную лимфому, неходжкинскую лимфому (НХЛ), лимфому Беркитта, малую лимфоцитарную лимфому (SLL), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, иммунобластную крупноклеточную лимфому, В-лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников и лимфому мантийных клеток, макроглобулинемию Вальденстрёма, лимфому дендритных клеток CD37+, лимфоплазмочитарную лимфому, лимфому маргинальной зоны селезенки, внеузловую В-клеточную лимфому из клеток краевой зоны лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), узловую В-клеточную лимфому из клеток краевой зоны, В-крупноклеточную лимфому средостения (тимуса), внутрисосудистую В-крупноклеточную лимфому, первичную выпотную лимфому, Т-клеточную лимфому взрослых, внеузловую Т-клеточная лимфома из натуральных киллеров, носовой полости, Т-клеточную лимфому

энтеропатического типа, гепатоспленическую Т-клеточную лимфому, бластную лимфому НК-клеток, синдром Сезари, ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому или любую их комбинацию.

[0205] В некоторых вариантах осуществления рак включает солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой саркому или карциному. В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль выбрана из хондросаркомы, фибросаркомы (фибробластической саркомы), возвышающейся дерматофибросаркомы (DFSP), остеосаркомы, рабдомиосаркомы, саркомы Юинга, желудочно-кишечной стромальной опухоли, лейомиосаркомы, ангиосаркомы (сосудистой саркомы), саркомы Капоши, липосаркомы, плеоморфной саркомы, или синовиальной саркомы.

[0206] В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль выбрана из карциномы легких (например, аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы (эпидермоидной карциномы), плоскоклеточной карциномы, аденокарциномы, аденосквамозной карциномы, анапластической карциномы, крупноклеточной карциномы, мелкоклеточной карциномы, карциномы молочной железы (например, протоковая карцинома *in situ* (неинвазивная), лобулярная карцинома *in situ* (неинвазивная), инвазивная протоковая карцинома, инвазивная лобулярная карцинома, неинвазивная карцинома), карциномы печени (например, гепатоцеллюлярная карцинома, холангиокарцинома или рак желчных протоков), крупноклеточной недифференцированной карциномы, бронхоальвеолярной карциномы), карциномы яичников (например, поверхностная эпителиально-стромальная опухоль (аденокарцинома) или эпителиальная карцинома яичников (включающая серозную опухоль, эндометриоидную опухоль и муцинозную цистаденокарциному), эпидермоидная (плоскоклеточная карцинома), эмбриональная карцинома и хориоклеточная опухоль) (эмбрионально-клеточная опухоль), карциномы почек (например, аденокарцинома почек, гипернефрома, переходно-клеточная карцинома (почечная лоханка), плоскоклеточная карцинома, карцинома канальцев Беллини, светлоклеточная аденокарцинома, переходно-клеточная карцинома, карциноидная опухоль почечной лоханки), карциномы надпочечников (например, карцинома коры надпочечников), карциномы яичка (например, карцинома зародышевых клеток (семинома, хориокарцинома, эмбриональная карцинома, тератокарцинома), серозная карцинома), рака желудка (например, аденокарцинома), карциномы кишечника (например, аденокарцинома двенадцатиперстной кишки), колоректального рака, или карциномы кожи (например, базальноклеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома). В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль

представляет собой карциному яичников, эпителиальную карциному яичников, аденокарциному шейки матки или мелкоклеточную карциному, карциному поджелудочной железы, колоректальную карциному (например, аденокарциному или плоскоклеточный рак), карциному легких, карциному протоков молочной железы или аденокарциному предстательной железы.

[0207] В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, клетка-хозяин представляет собой аллогенную клетку, сингенную клетку или аутологичную клетку. Субъекты, которых можно лечить с помощью настоящего изобретения, обычно представляют собой людей и других приматов, таких как обезьяны и человекообразные обезьяны для целей ветеринарной медицины. В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления субъект может представлять собой человека. Субъекты могут представлять собой мужчину или женщину и могут быть любого подходящего возраста, включая младенцев, детей юношеского периода, подростков, взрослых и пожилых людей. Клетки по настоящему изобретению можно вводить способом, подходящим для заболевания, состояния или расстройства, подлежащего лечению, как определено специалистами в области медицины. В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления клетка, содержащая слитый белок, как описано в данном документе, вводят внутривенно, внутрибрюшинно, интратуморально, в костный мозг, в лимфатический узел или в спинномозговую жидкость так, чтобы обнаружить меченые клетки, подлежащие удалению. Подходящая доза, подходящая продолжительность и частота введения композиций будут определяться такими факторами, как состояние пациента, размер, тип и тяжесть заболевания, состояния или расстройства, нежелательный тип или уровень или активность меченых клеток, конкретная форма активного ингредиента, и способ введения.

[0208] Как правило, подходящий режим дозирования и схема лечения обеспечивают активные молекулы или клетки в количестве, достаточном для обеспечения положительного эффекта. Такой ответ можно контролировать путем установления улучшенного клинического исхода (например, более частых ремиссий, полной или частичной, или более длительной продолжительности жизни без рецидивов заболевания) у субъектов, получивших лечение, по сравнению с субъектами, не получившими лечение. Повышение ранее существовавшего иммунного ответа на опухолевый белок в норме коррелирует с улучшением клинического исхода. Такие иммунные ответы обычно можно оценить с помощью стандартных анализов пролиферации, цитотоксичности или цитокинов, которые являются рутинными.

[0209] Для профилактического применения доза должна быть достаточной для предотвращения, отсрочки наступления или уменьшения тяжести заболевания, связанного с заболеванием или нарушением. Профилактическое действие иммуногенных композиций, вводимых в соответствии с описанными в данном документе способами, может быть определено путем проведения доклинических (включая исследования на животных *in vitro* и *in vivo*) и клинических исследований и анализа данных, полученных на их основе, с помощью соответствующих статистических, биологических и клинических способов и процедур, легко осуществляемых специалистом в данной области техники.

[0210] В случае адоптивной клеточной терапии эффективная доза представляет собой количество клеток-хозяев, кодирующих или экспрессирующих Msln-специфический связывающий белок, применяемый при адоптивном переносе, которое способно дать клинически желаемый результат (т.е. достаточное количество, чтобы статистически значимым образом индуцировать или усилить специфический Т-клеточный иммунный ответ в отношении клеток, экспрессирующих Msln-специфический антигенный ответ, например цитотоксический Т-клеточный ответ) у человека или млекопитающего, не являющегося человеком, получивших лечение. В конкретных вариантах осуществления Т-лимфоцит представляет собой наивную Т-клетку, центральную Т-клетку памяти, стволовую Т-клетку памяти, эффекторную Т-клетку памяти или любую их комбинацию.

[0211] Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям (композициям), которые содержат Msln-специфический связывающий белок, иммунную клетку-хозяина (т.е. модифицированную), полинуклеотид или вектор, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавители или эксципиент. Термин "фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель" или "физиологически приемлемый эксципиент или носитель" относится к биологически совместимым носителям, например, физиологическому раствору, которые более подробно описаны в данном документе, которые подходят для введения человеку или другому млекопитающему, не являющемуся человеком, и общепризнаны как безопасный или не вызывающий серьезных побочных эффектов носитель. Подходящие эксципиенты включают воду, физиологический раствор, декстрозу, глицерин и т.п. и их комбинации. В вариантах осуществления композиции, содержащие слитые белки или клетки-хозяева, как описано в настоящем документе, дополнительно содержат подходящую среду для инфузии. Подходящая среда для инфузии может представлять собой любую композицию изотонической среды, обычно можно применять физиологический раствор, Normosol R (Abbott) или Plasma-Lyte A (Baxter), 5 % раствор декстрозы в воде, лактат Рингера. Среда

для инфузий можно дополнить человеческим сывороточным альбумином или другими компонентами сыворотки человека.

[0212] Фармацевтические композиции можно вводить способом, соответствующим заболеванию или состоянию, подлежащему лечению (или предотвращению), как определено специалистами в данной области медицины. Подходящая доза, подходящая продолжительность и частота введения композиций будут определяться такими факторами, как состояние здоровья пациента, параметры пациента (т.е. вес, масса или площадь тела), тип и тяжесть состояния пациента, конкретная форма активного ингредиента и способ введения. Как правило, подходящая доза и схема лечения обеспечивают композицию(и) в количестве, достаточном для обеспечения терапевтического и/или профилактического действия (например, как описано в данном документе, включая улучшенный клинический исход, такой как более частые полные или частичные ремиссии, или более длительные периоды жизни без рецидивов и/или общая продолжительность жизни или уменьшение выраженности симптомов).

[0213] В настоящем изобретении также обеспечены однократные дозы, которые содержат эффективное количество модифицированной иммунной клетки или композиции, содержащей модифицированную иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 30 %, по меньшей мере приблизительно 40 %, по меньшей мере приблизительно 50 %, по меньшей мере приблизительно 60 %, по меньшей мере приблизительно 70 %, по меньшей мере приблизительно 80 %, по меньшей мере приблизительно 85 %, по меньшей мере приблизительно 90 % или по меньшей мере приблизительно 95 % модифицированных CD4⁺ Т-клеток в комбинации с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 30 %, по меньшей мере приблизительно 40 %, по меньшей мере приблизительно 50 %, по меньшей мере приблизительно 60 %, по меньшей мере приблизительно 70 %, по меньшей мере приблизительно 80 %, по меньшей мере приблизительно 85 %, по меньшей мере приблизительно 90 % или по меньшей мере приблизительно 95 % модифицированных CD8⁺ Т-клеток в соотношении приблизительно 1:1, где однократная доза содержит сниженное количество или по существу не содержит наивных Т-клеток (т.е. имеет менее приблизительно 50 %, менее приблизительно 40 %, менее приблизительно 30 %, менее приблизительно 20 %, менее приблизительно 10 %, менее приблизительно 5 % или менее приблизительно 1 % популяции наивных Т-клеток, присутствующих в однократной дозе, по сравнению с образцом пациента, имеющим сопоставимое количество МКПК).

[0214] В некоторых вариантах осуществления однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 50 % модифицированных CD4⁺ Т-клеток, в комбинации с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 50 % модифицированных CD8⁺ Т-клеток в соотношении приблизительно 1:1, где однократная доза содержит сниженное количество или по существу не содержит наивных Т-клеток. В дополнительных вариантах осуществления однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 60 % модифицированных CD4⁺ Т-клеток, в комбинации с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 60 % модифицированных CD8⁺ Т-клеток в соотношении приблизительно 1:1, где однократная доза содержит сниженное количество или по существу не содержит наивных Т-клеток. В дополнительных вариантах осуществления однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 70 % сконструированных CD4⁺ Т-клеток, в комбинации с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 70 % сконструированных CD8⁺ Т-клеток, в соотношении приблизительно 1:1, где однократная доза содержит сниженное количество или по существу не содержит наивных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 80 % модифицированных CD4⁺ Т-клеток, в комбинации с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 80 % модифицированных CD8⁺ Т-клеток в соотношении приблизительно 1:1, где однократная доза содержит сниженное количество или по существу не содержит наивных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 85 % модифицированных CD4⁺ Т-клеток, в комбинации с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 85 % модифицированных CD8⁺ Т-клеток в соотношении приблизительно 1:1, где однократная доза содержит сниженное количество или по существу не содержит наивных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 90 % модифицированных CD4⁺ Т-клеток, в комбинации с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 90 % модифицированных CD8⁺ Т-клеток в соотношении приблизительно 1:1, где однократная доза содержит сниженное количество или по существу не содержит наивных Т-клеток.

[0215] Количество клеток в композиции или однократной дозе составляет по меньшей мере одну клетку (например, одну субпопуляцию рекомбинантных CD8⁺ Т-клеток (например, необязательно включающую клетки памяти и/или наивные CD8⁺ Т-клетки), одну рекомбинантную субпопуляцию CD4⁺ Т-клеток (например, необязательно

содержащую клетки памяти и/или наивные CD8⁺ Т-клетки)) или, как правило, более 10^2 клеток, например, до 10^4 , до 10^5 , до 10^6 , до 10^7 , до 10^8 , до 10^9 , или более 10^{10} клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в количестве от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^{10} клеток/м², предпочтительно от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^9 клеток/м². В некоторых вариантах осуществления вводимая доза содержит до приблизительно $3,3 \times 10^5$ клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза содержит до приблизительно 1×10^6 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза содержит до приблизительно $3,3 \times 10^6$ клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза содержит до приблизительно 1×10^7 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления в дозе, вводимой субъекту, количество рекомбинантных клеток-хозяев составляет до приблизительно 5×10^4 клеток/кг, 5×10^5 клеток/кг, 5×10^6 клеток/кг или до приблизительно 5×10^7 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления в дозе, вводимой субъекту, количество рекомбинантных клеток-хозяев составляет по меньшей мере приблизительно 5×10^4 клеток/кг, 5×10^5 клеток/кг, 5×10^6 клеток/кг или до приблизительно 5×10^7 клеток/кг. Количество клеток будет зависеть от конечного применения, для которого предназначена композиция, а также от типа клеток, включенных в нее. Например, клетки, модифицированные для экспрессии или кодирования связывающего белка, будут содержать популяцию клеток, содержащую по меньшей мере 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % или более таких клеток. Для применения по настоящему изобретению клетки обычно обеспечены в объеме литр или менее, 500 мл или менее, 250 мл или менее или 100 мл или менее. В вариантах осуществления плотность желаемых клеток обычно составляет более 10^4 клеток/мл и обычно составляет более 10^7 клеток/мл, обычно 10^8 клеток/мл или более. Клетки можно вводить в виде одной инфузии или более инфузий в течение определенного периода времени. В некоторых вариантах осуществления клинически значимое количество клеток может быть разделено на несколько инфузий, которые в совокупности равны или превышают 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} или 10^{11} клеток. В некоторых вариантах осуществления однократная доза клеток может быть введена совместно (например, одновременно или в одно время с) гемопоэтическими стволовыми клетками от аллогенного донора. В некоторых вариантах осуществления одна или более клеток, входящих в однократную дозу, являются аутологичными по отношению к субъекту.

[0216] Следует понимать, что однократная доза, композиция или схема лечения по настоящему изобретению могут включать Msln-специфический связывающий белок или рекомбинантную клетку-хозяин, как описано в данном документе, а также включать (например, модифицированную) иммунную клетку, экспрессирующую связывающий

белок, специфичный для другого антигена (например, другого антигена Msln или антигена другого белка или мишени, такого как, например, BCMA, CA19-9, BRAF, CD3, CEACAM6, c-Met, EGFR, EGFRvIII, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EphA2, IGF1R, GD2, O-ацетил GD2, O-ацетил GD3, GHRHR, GHR, FLT1, KDR, FLT4, CD44v6, CD151, CA125, CEA, CTLA-4, GITR, BTLA, TGFBR2, TGFBR1, IL6R, gp130, Lewis A, Lewis Y, TNFR1, TNFR2, PD1, PD-L1, PD-L2, HVEM, MAGE-A (например, включая MAGE-A1, MAGE-A3 и MAGE-A4), KRAS, HER2, NY-ESO-1, PSMA, RANK, ROR1, TNFRSF4, CD40, CD137, TWEAK-R, HLA, опухоль- или патоген-ассоциированный пептид, связанный с HLA, пептид hTERT, связанный с HLA, пептид тирозиназа, связанный с HLA, LT β R, LIFR β , LRP5, MUC1, OSMR β , TCR α , TCR β , CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD52, CD56, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86, CD123, CD171, CD276, B7H4, TLR7, TLR9, PTCH1, WT-1, HA1-H, Robo1, α -фетопротеин (AFP), Frizzled, OX40, PRAME и SSX-2 или тому подобное). Например, однократная доза или схема лечения могут включать модифицированные CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие связывающий белок, который специфически связывается с комплексом антиген Msln:HLA, и модифицированные CD4⁺ Т-клетки (и/или модифицированные CD8⁺ Т-клетки), экспрессирующие связывающий белок (например, TCR или CAR), который специфически связывается с антигеном CA19-9.

[0217] В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, однократная доза включает равное или приблизительно равное количество сконструированных CD45RA⁻ CD3⁺ CD8⁺ и модифицированных CD45RA⁻ CD3⁺ CD4⁺ ТМ клеток.

[0218] Описанные в данном документе фармацевтические композиции могут быть обеспечены в контейнерах для однократной или многократной дозы, таких как запечатанные ампулы или флаконы. Такие контейнеры можно заморозить, чтобы сохранить стабильность композиции до введения пациенту.

[0219] В контексте данного документа, введение композиции относится к ее доставке субъекту, независимо от пути или способа доставки, такого как, например, внутривенный, пероральный, вагинальный, ректальный, подкожный или тому подобное. Введение может осуществляться непрерывно или периодически, а также парентерально. Введение может быть предназначено для лечения субъекта с уже подтвержденным выявленным состоянием, заболеванием или болезненным состоянием, или для лечения субъекта, подверженного риску развития такого состояния, заболевания или патологического состояния. Совместное введение с дополнительной терапией может включать одновременную и/или последовательную доставку нескольких агентов в любом

порядке и по любой схеме дозирования (например, рекомбинантные клетки-хозяева с одним или более цитокинами, иммуносупрессивная терапия, такая как ингибиторы кальциневрина, кортикостероиды, ингибиторы микротрубочек, низкая доза пролекарства микофеноловой кислоты или любая их комбинация).

[0220] Если указанную субъекту вводят парентерально, то композиция также может включать стерильный водный или масляный раствор или суспензию. Приемлемые нетоксичные разбавители или растворители, подходящие для парентерального введения, включают воду, раствор Рингера, изотонический солевой раствор, 1,3-бутандиол, этанол, пропиленгликоль или полиэтиленгликоли в смесях с водой. Водные растворы или суспензии могут дополнительно включать один или более буферных агентов, таких как ацетат натрия, цитрат натрия, борат натрия или тартрат натрия. Конечно, любой материал, применяемый для получения любой единичной дозированной формы, должен быть фармацевтически чистым и по существу нетоксичным в применяемых количествах. Кроме того, активные соединения могут быть включены в препараты и композиции с замедленным высвобождением. Единичная дозированная форма, в контексте данного документа, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве однократных доз для субъекта, подлежащего лечению, каждая единица дозы может содержать заранее определенное количество рекомбинантных клеток или активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с подходящим фармацевтическим носителем.

[0221] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят множество доз композиции, описанной в данном документе (например, рекомбинантной клетки-хозяина), которые можно вводить с интервалами между введениями от приблизительно двух до приблизительно четырех недель.

[0222] Способы лечения или предотвращения по настоящему изобретению могут быть применены к субъекту как часть курса или схемы лечения, которые могут включать дополнительные виды лечения до или после введения однократных доз, клеток или композиций по настоящему изобретению. Например, в некоторых вариантах осуществления субъект, получающий однократную дозу (например, рекомбинантная клетка-хозяин, получающая или ранее получившая трансплантат гемопоэтических клеток (НСТ, включая миелоаблативные и немиелоаблативные). Способы и режимы выполнения НСТ известны в данной области техники и могут включать трансплантацию любой подходящей донорской клетки, такой как клетка, полученная из пуповинной крови, костного мозга или периферической крови, гемопоэтическая стволовая клетка, мобилизованная стволовая клетка или клетка из околоплодных вод. Соответственно, в

некоторых вариантах осуществления рекомбинантную клетку-хозяина по настоящему изобретению можно вводить вместе с гемопоэтическими стволовыми клетками или вскоре после них в модифицированной терапии НСТ. В некоторых вариантах осуществления НСТ включает донорскую гемопоэтическую клетку, содержащую нокаут хромосомного гена, кодирующего компонент HLA, хромосомный нокаут гена, кодирующего компонент TCR, или оба таких нокаута.

[0223] Уровень иммунного ответа ЦТЛ может быть определен любым из множества иммунологических способов, описанных в данном документе и обычно применяемых в данной области техники. Уровень иммунного ответа ЦТЛ может быть определен до и после введения любого из описанных в данном документе Msln-специфических связывающих белков (или клетки-хозяина, кодирующей и/или экспрессирующей их) или иммуногенных композиций. Анализы цитотоксичности для определения активности ЦТЛ могут быть выполнены с применением любого из нескольких способов, обычно применяемых в данной области техники (см., например, Henkart, et al., "Cytotoxic T-Lymphocytes" in *Fundamental Immunology*, Paul (ed.) (2003 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA), pages 1127–50, и цитируемые в данной публикации ссылки).

[0224] Антиген-специфические Т-клеточные ответы обычно определяют сравнением наблюдаемых Т-клеточных ответов в соответствии с любыми из описанных в данном документе функциональных параметров Т-клеток (например, пролиферация, высвобождение цитокинов, активность ЦТЛ, измененный фенотип маркера клеточной поверхности и т.д.), которые могут происходить между Т-клетками, подвергаемыми действию когнатного антигена в соответствующем контексте (например, антиген для первичного воздействия или активации Т-клеток, при презентировании иммуносовместимыми антигенпрезентирующими клетками), и Т-клетками из той же исходной популяции, которые вместо этого подвергаются воздействию структурно отличного или нерелевантного контрольного антигена. Ответ на когнатный антиген статистически значимо больший, чем ответ на контрольный антиген, означает антиген-специфичность.

[0225] Биологический образец может быть получен от субъекта для определения наличия и уровня иммунного ответа на пептид Msln, как описано в данном документе. В контексте данного документа "биологический образец" может представлять собой образец крови (из которого может быть получена сыворотка или плазма), образец биопсии, биологические жидкости (например, лаваж легких, асцит, смывы со слизистой оболочки, синовиальная жидкость и т.д.), костный мозг, лимфатические узлы, тканевый эксплант,

органную культуру или любую другую ткань или препарат клеток от субъекта или биологического источника. Биологические образцы также могут быть получены от субъекта перед получением какой-либо иммуногенной композиции, и такой биологический образец можно применять в качестве контроля для установления исходных данных (т.е. до иммунизации).

[0226] В некоторых вариантах осуществления субъект, получающий композицию по настоящему изобретению, ранее получал противолимфоцитарную химиотерапию. В дополнительных вариантах осуществления противолимфоцитарная химиотерапия включает циклофосфамид, флударабин, антитимоцитарный глобулин, оксалиплатин или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления субъект, получающий композицию, ранее получал лучевую терапию, иммунотерапию, содержащую цитокин, антитело, конъюгат антитело-лекарственное средство или слитый белок Fc, антисмысловую нуклеотидную терапию, генную терапию, вакцину или хирургическое вмешательство, или любую их комбинацию.

[0227] Способы и применения по настоящему изобретению могут дополнительно включать введение одного или более дополнительных агентов для лечения заболевания или расстройства в комбинированной терапии. Например, в некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает введение композиции (например, любого одного или более из связывающих белков, модифицированных клеток-хозяев, кодирующих и/или экспрессирующих тот же полинуклеотид, вектора) с (в одно время, одновременно или последовательно) ингибитором иммунных контрольных точек. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает введение композиции согласно настоящему изобретению с агонистом агента, стимулирующего иммунную контрольную точку. В дополнительных вариантах осуществления комбинированная терапия включает введение композиции по настоящему изобретению с вторичной терапией, такой как химиотерапевтическое средство, лучевая терапия, хирургическое вмешательство, антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство, цитокин, антисмысловая терапия, генная терапия, вакцина или любая их комбинация.

[0228] В контексте данного документа термин "агент подавления иммунитета" или "агент иммуносупрессии" относится к одной или более клеткам, белкам, молекулам, соединениям или комплексам, обеспечивающим подавляющие сигналы для помощи в контроле или подавлении иммунного ответа. Например, агенты иммуносупрессии включают те молекулы, которые частично или полностью блокируют иммунную стимуляцию, уменьшают, предотвращают или откладывают активацию иммунной системы, или увеличивают, активируют или регулируют подавление иммунитета.

Примеры агентов иммуносупрессии для нацеливания (например, с ингибитором иммунных контрольных точек) включают PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG3, CTLA4, B7-H3, B7-H4, CD244/2B4, HVEM, BTLA, CD160, TIM3, GAL9, KIR, PVR1G (CD112R), PVRL2, аденозин, A2aR, иммуносупрессивные цитокины (например, IL-10, IL-4, IL-1RA, IL-35), IDO, аргиназу, VISTA, TIGIT, LAIR1, CEACAM-1, CEACAM-3, CEACAM-5, регуляторные Т-клетки или любую их комбинацию.

[0229] Ингибитор агента иммуносупрессии (также называемый ингибитором иммунной контрольной точки) может представлять собой соединение, антитело, фрагмент антитела или слитый полипептид (например, слитый Fc, такой как CTLA4-Fc или LAG3-Fc), антисмысловую молекулу, молекулу рибозима или РНКи или низкомолекулярную органическую молекулу. В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, способ может включать композицию по настоящему изобретению с одним или более ингибиторами любого из следующих иммуносупрессорных компонентов, по отдельности или в любой комбинации.

[0230] Соответственно, в определенных вариантах осуществления способы лечения по настоящему изобретению могут дополнительно включать введение субъекту ингибитора PD-1. Ингибитор PD-1 может включать ниволумаб (OPDIVO[®]), пембролизумаб (KEYTRUDA[®]), ипилимумаб + ниволумаб (YERVOY[®] + OPDIVO[®]), цемиплимаб, IBI-308, ниволумаб + релатлимаб, BCD-100, камрелизумаб, JS-001, спартализумаб, тислелизумаб, AGEN-2034, BGBA-333 + тислелизумаб, CBT-501, достарлимаб, дурвалумаб + MEDI-0680, JNJ-3283, пазопаниб гидрохлорид + пембролизумаб, пидилизумаб, REGN-1979 + цемиплимаб, ABBV-181, ADUS-100 + спартализумаб, AK-104, AK-105, AMP-224, BAT-1306, BI-754091, CC-90006, цемиплимаб + REGN-3767, CS-1003, GLS-010, LZM-009, MEDI-5752, MGD-013, PF-06801591, Sym-021, тислелизумаб + памипариб, XmAb-20717, AK-112, ALPN-202, AM-0001, антитело в качестве антагониста PD-1 при болезни Альцгеймера, BH-2922, BH-2941, BH-2950, BH-2954, биологическое лекарственное средство в качестве антагониста CTLA-4 и PD-1 при солидной опухоли, биспецифическое моноклональное антитело для нацеливания против PD-1 и LAG-3 при онкологии, BLSM-101, CB-201, CB-213, CBT-103, CBT-107, клеточную иммунотерапию + ингибитор PD-1, CX-188, HAB-21, HEISCOIII-003, IKT-202, JTX-4014, MCLA-134, MD-402, mDX-400, MGD-019, моноклональное антитело в качестве антагониста PD-1 при онкологии, моноклональное антитело в качестве антагониста PD-1 при онкологии, онколитический вирус для ингибирования PD-1 при онкологии, OT-2, антагонист PD-1 + ропегинтерферон альфа-2b, PEGMP-7, PRS-332, RXI-762, STIA-1110, TSR-075, вакцина для нацеливания против HER2 и PD-1 при онкологии, вакцина для

нацеливания против PD-1 при онкологии и аутоиммунных заболеваниях, XmAb-23104, антисмысловой олигонуклеотид для ингибирования PD-1 при онкологии, AT-16201, биспецифическое моноклональное антитело для ингибирования PD-1 при онкологии, IMM-1802, моноклональные антитела в качестве антагониста PD-1 и CTLA-4 при солидной опухоли и гематологическом новообразовании, биоаналог ниволумаба, рекомбинантный белок в качестве агониста CD278 и CD28 и антагониста PD-1 при онкологии, рекомбинантный белок в качестве агониста PD-1 при аутоиммунных и воспалительных расстройствах, SNA-01, SSI-361, YBL-006, AK-103, JY-034, AUR-012, BGB-108, лекарственное средство для ингибирования PD-1, Gal-9 и TIM-3 при солидной опухоли, ENUM-244C8, ENUM-388D4, MEDI-0680, моноклональные антитела в качестве антагониста PD-1 при метастатической меланоме и метастатическом раке легкого, моноклональное антитело для ингибирования PD-1 при онкологии, моноклональные антитела для нацеливания против CTLA-4 и PD-1 при онкологии, моноклональное антитело в качестве антагониста PD-1 при НМРЛ (немелкоклеточный рак легкого), моноклональные антитела для ингибирования PD-1 и TIM-3 при онкологии, моноклональное антитело для ингибирования PD-1 при онкологии, рекомбинантный белок для ингибирования PD-1 и VEGF-A при гематологических злокачественных новообразованиях и солидной опухоли, малая молекула в качестве антагониста PD-1 при онкологии, Sym-016, инебилизумаб + MEDI-0680, вакцина для нацеливания против PDL-1 и IDO при метастатической меланоме, моноклональное антитело против PD-1 + клеточную иммунотерапию при глиобластоме, антитело в качестве антагониста PD-1 при онкологии, моноклональные антитела для ингибирования PD-1/PD-L1 при гематологических злокачественных новообразованиях и бактериальных инфекциях, моноклональное антитело для ингибирования PD-1 при ВИЧ, и/или малую молекулу для ингибирования PD-1 при солидной опухоли.

[0231] В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором LAG3, таким как LAG525, IMP321, IMP701, 9H12, BMS-986016 или любой их комбинацией.

[0232] В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором CTLA4. В конкретных вариантах осуществления композицию применяют в комбинации со специфическим антителом к CTLA4 или его связывающим фрагментом, таким как ипилимумаб, тремелиумаб, слитые белки CTLA4-Ig (например, абатацепт, белатасепт) или любой их комбинацией.

[0233] В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации со специфическим антителом к B7-H3 или его

связывающим фрагментом, таким как эноблитузумаб (MGA271), 376,96 или обоими. Связывающий фрагмент антитела к B7-H4 может представлять собой scFv или его слитый белок, как описано, например, в Dangaj et al., Cancer Res. 73:4820, 2013, а также описано в патенте США № 9574000 и в патентах PCT № WO/201640724A1 и WO 2013/025779A1.

[0234] В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором CD244.

[0235] В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором BLTA, HVEM, CD160 или любой их комбинацией. Антитела против CD-160 описаны, например, в публикации PCT № WO 2010/084158.

[0236] В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором TIM3.

[0237] В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором Gal9.

[0238] В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором передачи аденозинового сигнала, таким как аденозиновый рецептор-ловушка.

[0239] В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором A2aR.

[0240] В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором KIR, таким как лирилумаб (BMS-986015).

[0241] В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором ингибирующего цитокина (обычно цитокина, отличного от TGFβ) или развития или активности регуляторных Т-лимфоцитов.

[0242] В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором IDO, таким как лево-1-метилтриптофан, эпакадостат (INCB024360, Liu et al., Blood 115:3520-30, 2010), эбселен (Terentis et al., Biochem. 49:591-600, 2010), индоксимод, NLG919 (Mautino et al., American Association for Cancer Research 104th Annual Meeting 2013, Apr 6-10, 2013), 1-метилтриптофан (1-MT)-тирапазамин или любой их комбинацией.

[0243] В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором аргиназы, таким как метиловый эфир N(омега)-нитро-L-аргинина (L-NAME), N-омега-гидрокси-нор-1-аргинин (нор-

НОНА), L-НОНА, 2(S)-амино-6-бороногексановая кислота (ABH), S-(2-бороноэтил)-L-цистеин (BEC) или любой их комбинацией.

[0244] В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором VISTA, таким как CA-170 (Curis, Лексингтон, Массачусетс).

[0245] В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором TIGIT, таким как, например, COM902 (Compugen, Торонто, Онтарио, Канада), ингибитором CD155, таким как, например, COM701 (Compugen) или и тем, и другим.

[0246] В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором PVRIG, PVRL2 или с обоими. Антитела против PVRIG описаны, например, в публикации PCT № WO 2016/134333. Антитела против PVRL2 описаны, например, в публикации PCT № WO 2017/021526.

[0247] В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором LAIR1.

[0248] В определенных вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором CEACAM-1, CEACAM-3, CEACAM-5 или любой их комбинацией.

[0249] В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с агентом, увеличивающим активность (т.е. представляющим собой агонист) молекулы стимулятора иммунной контрольной точки. Например, композицию можно применять в комбинации с агонистом CD137 (4-1BB) (таким как, например, урелумаб), агонистом CD134 (OX-40) (таким как, например, MEDI6469, MEDI6383 или MEDI0562), леналидомидом, помалидомидом, агонистом CD27 (таким как, например, CDX-1127), агонистом CD28 (таким как, например, TGN1412, CD80 или CD86), агонистом CD40 (таким как, например, CP- 870,893, rhuCD40L или SGN-40), агонистом CD122 (таким как, например, IL-2), агонистом GITR (таким как, например, гуманизированные моноклональные антитела, описанные в патенте PCT № WO 2016/054638), агонистом ICOS (CD278) (таким как, например, GSK3359609, mAb 88.2, JTX-2011, Icos 145-1, Icos 314-8 или любой их комбинацией). В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, способ может включать введение композиции по настоящему изобретению с одним или более агонистами молекулы стимулятора иммунной контрольной точки, включая любой из вышеперечисленных, по отдельности или в любой комбинации.

[0250] В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает композицию по настоящему изобретению и вторичную терапию, включающую одно или более из следующего: антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфические для ракового антигена, экспрессируемого солидной опухолью без воспаления, лучевого лечения, хирургического вмешательства, химиотерапевтического агента, цитокина, РНКи или любой их комбинации.

[0251] В некоторых вариантах осуществления способ комбинированной терапии включает введение композиции по настоящему изобретению и дополнительное проведение лучевого лечения или хирургического вмешательства. Лучевая терапия хорошо известна в данной области техники и включает терапию рентгеновским излучением, такую как гамма-облучение, и радиофармацевтическую терапию. Операции и хирургические способы, подходящие для лечения данного рака у субъекта, хорошо известны специалистам в данной области техники.

[0252] Цитокины, применимые для стимуляции иммунного противоопухолевого или противоопухолевого ответа, включают, например, IFN- α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-24, и GM-CSF, отдельно или в любой комбинации с композицией по настоящему изобретению. В дополнительных вариантах осуществления цитокин вводят последовательно при условии, что субъекту вводили Msln-специфическую композицию по меньшей мере три или четыре раза перед введением цитокина. В некоторых вариантах осуществления цитокин вводят подкожно. В некоторых вариантах осуществления субъект мог получать или дополнительно получает иммуносупрессивную терапию, такую как ингибиторы кальциневрина, кортикостероиды, ингибиторы микротрубочек, низкую дозу пролекарства микофеноловой кислоты или любую их комбинацию. В других вариантах осуществления субъект, получающий лечение, получил трансплантат немиелоаблативных или миелоаблативных гематopoэтических клеток, при этом лечение можно проводить через по меньшей мере от двух до трех месяцев после трансплантации немиелоаблативных гематopoэтических клеток.

[0253] В некоторых вариантах осуществления способ комбинированной терапии включает введение композиции по настоящему изобретению и дополнительное введение химиотерапевтического агента. Химиотерапевтический агент включает, но не ограничивается ими, ингибитор функции хроматина, ингибитор топоизомеразы, лекарственное средство, ингибирующее микротрубочки, агент, повреждающий ДНК, антиметаболит (например, антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и аналоги с модифицированным сахаром), ингибитор синтеза ДНК, агент,

взаимодействующий с ДНК (такой как интеркалирующий агент) и ингибитор репарации ДНК. Иллюстративные химиотерапевтические агенты включают, но не ограничиваются ими, следующие группы: антиметаболиты/противораковые агенты, такие как аналоги пириимидина (5-фторурацил, флуксуридин, капецитабин, гемцитабин и цитарабин) и аналоги пурина, антагонисты фолиевой кислоты и родственные ингибиторы (меркаптопурин, тиогуанин, пентостатин и 2-хлордезоксиаденозин (кладрибин)), антипролиферативные/антимитотические агенты, включая натуральные продукты, такие как алкалоиды барвинка (винбластин, винкристин и винорелбин), разрушители микротрубочек, такие как таксан (паклитаксел, доцетаксел), винкристин, винбластин, нокодазол, эпотилоны и навелбин, эпидиподофиллотоксины (этопозид, тенипозид), вещества, повреждающие ДНК (актиномицин, амсакрин, антрациклины, блеомицин, бусульфан, камптотецин, карбоплатин, хлорамбуцил, цисплатин, циклофосфамид, цитоксан, дактиномицин, даунорубин, доксорубин, эпирубин, гексаметилмеламиноксалиплатин, ифосфамид, мелфалан, мерхлорэтамин, митомицин, митоксантрон, нитрозомочевина, пликамицин, прокарбазин, таксол, таксотер, темозоламид, тенипозид, триэтилентифосфорамида и этопозид (VP 16)), антибиотики, такие как дактиномицин (актиномицин D), даунорубин, доксорубин (адриамицин), идарубин, антрациклины, митоксантрон, блеомицины, пликамицин (митрамицин) и митомицин, ферменты (L-аспарагиназа, системно метаболизирующая L-аспарагин и удаляющая клетки, не способные синтезировать собственный аспарагин), антиагрегантные агенты, антипролиферативные/антимитотические алкилирующие агенты, такие как азотистые иприты (мехлорэтамин, циклофосфамид и его аналоги, мелфалан, хлорамбуцил), этиленимины и метилмеламины (гексаметилмеламин и тиотепа), алкилсульфонаты-бусульфан, нитрозомочевины (кармустин (BCNU) и аналоги, стрептозоцин), тразен-дакарбазин (DTIC), антипролиферативные/антимитотические антиметаболиты, такие как аналоги фолиевой кислоты (метотрексат), координационные комплексы платины (цисплатин, карбоплатин), прокарбазин, гидроксимочевина, митотан, аминоксантидин, гормоны, аналоги гормонов (эстроген, тамоксифен, гозерелин, бикалутамид, нилутамид) и ингибиторы ароматазы (летрозол, анастрозол), антикоагулянты (гепарин, синтетические соли гепарина и другие ингибиторы тромбина), фибринолитические агенты (такие как тканевой активатор плазминогена, стрептокиназа и урокиназа), аспирин, дипиридамол, тиклопидин, клопидогрель, абциксимаб, антимиграционные агенты, антисекреторные средства (бравелдин), иммуносупрессоры (циклоспорин, такролимус (FK-506), сиролимус (рапамицин), азатиоприн, микофенолят мофетил), антиангиогенные соединения (TNP470, генистеин) и ингибиторы фактора роста

(ингибиторы фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), ингибиторы фактора роста фибробластов (FGF)), блокатор рецепторов ангиотензина, доноры оксида азота, антисмысловые олигонуклеотиды, антитела (трастузумаб, ритуксимаб), химерные антигенные рецепторы, ингибиторы клеточного цикла и индукторы дифференцировки (третиноин), ингибиторы mTOR, ингибиторы топоизомеразы (доксорубицин (адриамицин), амсакрин, камптотецин, даунорубицин, дактиномицин, энипозид, эпирубицин, этопозид, идарубицин, иринотекан (CPT-11) и митоксантрон, топотекан, иринотекан), кортикостероиды (кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизон и пренизолон), ингибиторы киназы передачи сигнала фактора роста, индукторы митохондриальной дисфункции, токсины, такие как холера, рицин, экзотоксин *Pseudomonas*, токсин аденилатциклазы *Bordetella pertussis* или токсин дифтерии, и активаторы каспаз, и разрушители хроматина.

[0254] В некоторых вариантах осуществления, терапия дополнительно включает введение вакцины на основе Т-лимфоцитов (см., например, публикацию PCT № WO 2017/192924, где Т-клеточные вакцины, усилители иммуногенности, конструкции экспрессии транспозонов и родственные способы полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления композиция вакцины содержит композицию липосомальной РНК (см., например, Kreiter, et al., Nature 520:692, 2015, где композиции и способы их получения полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления композицию вакцины применяют для получения дендритной клетки, активированной воздействием пептида или другой антигенпрезентирующей клетки, что может быть выполнено *ex vivo*, *in vitro* или *in vivo*.

[0255] Настоящее изобретение также относится к способу получения унипотенциальных после контакта с антигеном антигенпрезентирующих клеток. В некоторых вариантах осуществления способы включают взаимодействие *in vitro* в условиях и в течение времени, достаточных для процессинга и презентации антигена антигенпрезентирующими клетками для создания (i) популяции антигенпрезентирующих клеток, иммуносовместимых с субъектом, и (ii) полинуклеотида, пептида, иммуногенной композиции и/или вектора экспрессии, как описано в данном документе, с получением, таким образом, унипотенциальных после контакта с антигеном антигенпрезентирующих клеток, способных вызывать антиген-специфический Т-клеточный ответ на пептид Msln, как описано в данном документе. Способ может дополнительно включать взаимодействие унипотенциальных после контакта с антигеном антигенпрезентирующих клеток с одним

или более иммуносовместимыми Т-клетками в условиях и в течение времени, достаточных для образования Msln-специфических Т-клетках.

[0256] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает трансфекцию или трансдукцию популяции иммунных клеток *in vitro* или *ex vivo* полинуклеотидом, содержащим определенную таким образом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую связывающий белок, с получением таким образом популяции сконструированных Msln-специфических иммунных клеток, необязательно в количестве, эффективном для адоптивного переноса или придания антиген-специфического Т-клеточного ответа на антиген Msln, когда клетки вводят субъекту.

[0257] В некоторых вариантах осуществления могут быть созданы линии иммунных клеток, как описано Но, et al. (см. 2006 J Immunol Methods 310 (1-2):40-52)). Например, дендритные клетки (ДК) могут быть получены из пластик-адгезивной фракции МКПК путем культивирования в течение двух дней (дни от -2 до 0) в среде DC (CELLGENIX™, Фрайбург, Германия) с добавлением GM-CSF (800 ед/мл) и IL-4 (1000 Ед/мл). В день -1 могут быть добавлены цитокины созревания TNF α (1100 ед/мл), IL-1 β (2000 ед/мл), IL-6 (1000 ед/мл) и PGE2 (1 мкг/мл). В день 0 ДК можно собирать, промывать и вводить пептид (отдельные пептиды 10 мкг/мл или пулы пептидов 2 мкг/мл) в течение от 2 до 4 часов в бессывороточной среде DC. CD8 Т-клетки могут быть выделены из МКПК с применением микрогранул против CD8 (MILTENYI BIOTECH™, Оберн, Калифорния) и стимулированы с помощью ДК при соотношении эффекторных мишеней (Е:Т) от 1:5 до 1:10 в присутствии IL-21 (30 нг/мл). На 3 день могут быть добавлены IL-2 (12,5 тд/мл), IL-7 (5 нг/мл) и IL-15 (5 нг/мл). Клетки можно рестимулировать в дни с 10 по 14, применяя пластик-адгезивную фракцию облученных аутологичных МКПК в качестве антигенпрезентирующих клеток (АПК) после активирования пептидом в течение двух часов и в присутствии IL-21. После рестимуляции клетки могут быть дополнены с 1 дня IL-2 (25 ед/мл), IL-7 (5 нг/мл) и IL-15 (5 нг/мл). Клоны Т-клеток могут быть получены путем посева клеток при ограниченном разведении и наращивании ТМ-LCL, покрытых ОКТ3 (ORTHO BIOTECH™, Бриджуотер, Нью-Джерси) и аллогенными МКПК в качестве слоя поддерживающих клеток (протокол REP), как описано (см. Но, et al., 2006 J Immunol Methods 310 (1-2):40-52).

[0258] Настоящее изобретение обеспечивает, среди других вариантов осуществления, следующие варианты осуществления.

[0259] В одном варианте осуществления обеспечен связывающий белок, содержащий переменный домен α -цепи (V_α) Т-клеточного рецептора (TCR) и переменный домен β -цепи (V_β) TCR, где: (а) V_α содержит аминокислотную

последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 39 или 37, и V_{β} необязательно содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 101 или 99, (b) V_{β} содержит аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 38, и V_{α} необязательно содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 102 или 100, и/или (c) V_{α} содержит аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 39 или 37, и V_{β} содержит аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 40 или 38, где связывающий белок способен специфически связываться с комплексом пептид мезотелин (Msln):HLA. В одном варианте осуществления, (i) V_{α} из (a), (b) и/или (c) связывающего белка, как описано в настоящем документе, содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 102 или 100, при условии, что по меньшей мере три или четыре из CDR не имеют изменений в последовательности, при этом CDR, которые действительно имеют изменения последовательности, имеют только до двух аминокислотных замен, до пяти смежных делеций аминокислот или их комбинацию, и/или (ii) V_{β} из (a), (b) и/или (c) связывающего белка, как описано в настоящем документе, содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 101 или 99, при условии, что по меньшей мере три или четыре CDR не имеют изменений в последовательности, при этом CDR, которые действительно имеют изменения последовательности, имеют только до двух аминокислотных замен, до пяти смежных делеций аминокислот или их комбинацию. Кроме того, связывающий белок, соответствующий варианту осуществления, может содержать: (a) аминокислотную последовательность CDR1 α , указанную в SEQ ID NO: 93, (b) аминокислотную последовательность CDR2 α , указанную в SEQ ID NO: 94, (c) аминокислотную последовательность CDR3 α , указанную в SEQ ID NO: 39, (d) аминокислотную последовательность CDR1 β , указанную в SEQ ID NO: 83, необязательно указанную в SEQ ID NO: 84, дополнительно необязательно указанную в SEQ ID NO: 91, (e) аминокислотную последовательность CDR2 β , указанную в SEQ ID NO: 92, и (f) аминокислотную последовательность CDR3 β , указанную в SEQ ID NO: 40. Кроме того, связывающий белок, соответствующий варианту осуществления, может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой: (a) TRBJ2-3*01, (b)

TRAV21*01 или TRAV21*02, (c) TRBV5-4*01, (d) TRAJ57*01, и/или (e) TRBD1*01 или TRBD2*02. Более того, связывающий белок, соответствующий варианту осуществления, может содержать V_α , содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85% идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 102, и V_β , содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 101. В некоторых случаях вариант осуществления может включать связывающий белок, где V_α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 102, и где V_β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 101. Кроме того, связывающий белок в одном варианте осуществления может содержать α -цепь TCR ($TCR\alpha$) и β -цепь TCR ($TCR\beta$), где $TCR\alpha$ содержит или состоит из аминокислотной последовательности по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 110 или 29, и/или где $TCR\beta$ содержит или состоит из аминокислотной последовательности по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 109 или 28. Некоторые варианты осуществления могут содержать связывающий белок, где $TCR\alpha$ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 110 или 29, и где $TCR\beta$ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 109 или 28. В дополнительных вариантах осуществления связывающий белок содержит: (a) аминокислотную последовательность CDR1 α , как указано в SEQ ID NO: 89, (b) аминокислотную последовательность CDR2 α , как указано в SEQ ID NO: 90, (c) аминокислотную последовательность CDR3 α , как указано в SEQ ID NO: 37, (d) аминокислотную последовательность CDR1 β , как указано в SEQ ID NO: 83, необязательно как указано в SEQ ID NO: 87, (e) аминокислотную последовательность CDR2 β , представленная в SEQ ID NO: 88, и (f) аминокислотную последовательность CDR3 β , как указано в SEQ ID NO: 38. В одном из вариантов осуществления связывающий белок может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой: (a) TRBJ1-1*01 или TRBJ2-3*01, (b) TRAV4-1*01, (c) TRAJ18*01, и/или (d) TRBD1*01 или TRBD2*02. В одном варианте осуществления связывающий белок может содержать V_α , содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 100, и V_β , содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на

85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 99. В одном из вариантов осуществления связывающий белок может содержать V_α , содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 100, и где V_β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 99. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит α -цепь TCR ($TCR\alpha$) и β -цепь TCR ($TCR\beta$), где $TCR\alpha$ содержит или состоит из аминокислотной последовательности по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 108 или 23, и/или где $TCR\beta$ содержит или состоит из аминокислотной последовательности по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 107 или 22. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит $TCR\alpha$, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 108 или 23, и где $TCR\beta$ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 107 или 22. В некоторых вариантах осуществления, связывающий белок включает связывающий белок, который способен специфически связываться с комплексом SEQ ID NO: 32:человеческий лейкоцитарный антиген (HLA), и в некоторых таких случаях HLA включает HLA-A*201. В некоторых вариантах осуществления аланиновый мутагенез любого одного или более остатков 3, 5, 6 или 9 SEQ ID NO: 32 не подавляет или по существу не ухудшает связывание связывающего белка с комплексом пептид Msln:HLA. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок способен связываться с комплексом пептид:HLA, где пептид содержит или состоит из консенсусной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления аланиновый мутагенез любого одного или более остатков 1, 5 или 9 SEQ ID NO: 32 не подавляет или по существу не ухудшает связывание связывающего белка с комплексом пептид Msln:HLA. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок способен связываться с комплексом пептид:HLA, где пептид содержит или состоит из консенсусной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок не связывается или специфически не связывается с комплексом пептид:HLA, где пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой одной или более из SEQ ID NO: 63-77, и где HLA необязательно представляет собой HLA-A:02*01.

[0260] В одном из вариантов осуществления связывающий белок содержит переменный домен α -цепи (V_α) Т-клеточного рецептора (TCR) и переменный домен β -цепи (V_β) TCR, где: (a) V_α содержит аминокислотную последовательность CDR3,

указанную в SEQ ID NO: 33 или 35, и V_{β} необязательно содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 95 или 97, (b) V_{β} содержит аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 34 или 36, и V_{α} необязательно содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 96 или 98, и/или (c) V_{α} содержит аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 33 или 35, и V_{β} содержит аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 40 или 38, где связывающий белок способен специфически связываться с комплексом пептид мезотелин (Msln):HLA. В варианте осуществления (i) V_{α} из (a), (b) и/или (c) содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 96 или 98, при условии, что по меньшей мере три или четыре из CDR не имеют изменений в последовательности, при этом CDR, которые действительно имеют изменения последовательности, имеют только до двух аминокислотных замен, до пяти смежных делеций аминокислот или их комбинацию, и/или (ii) V_{β} из (a), (b) и/или (c) содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 95 или 97, при условии, что по меньшей мере три или четыре из CDR не имеют изменений в последовательности, при этом CDR, которые действительно имеют изменения последовательности, имеют только до двух аминокислотных замен, до пяти смежных делеций аминокислот или их комбинацию. В одном из вариантов связывающий белок содержит: (a) аминокислотную последовательность CDR1 α , указанную в SEQ ID NO: 80, (b) аминокислотную последовательность CDR2 α , указанную в SEQ ID NO: 81 или 118, (c) аминокислотную последовательность CDR3 α , указанную в SEQ ID NO: 33, (d) аминокислотную последовательность CDR1 β , указанную в SEQ ID NO: 83, необязательно указанную в SEQ ID NO: 84, дополнительно необязательно указанную в SEQ ID NO: 78, (e) аминокислотную последовательность CDR2 β , указанную в SEQ ID NO: 79, и (f) аминокислотную последовательность CDR3 β , указанную в SEQ ID NO: 34. В одном из вариантов осуществления связывающий белок содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой: (a) TRBJ2-7*01 или TRBJ2-3*01, (b) TRAV1-1*01, (c) TRBV12-4*01, (d) TRAJ3*01, и/или (e) TRBD1*01 или TRBD2*02. В одном из вариантов осуществления связывающий белок содержит V_{α} , содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на

85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 96, и V_{β} , содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 95. В одном из вариантов осуществления связывающий белок содержит V_{α} , содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 96, и V_{β} , содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 95. В одном из вариантов осуществления связывающий белок содержит α -цепь TCR ($TCR\alpha$) и β -цепь TCR ($TCR\beta$), где $TCR\alpha$ содержит или состоит из аминокислотной последовательности по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 104 или 7, и/или где $TCR\beta$ содержит или состоит из аминокислотной последовательности по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 103 или 6. В одном из вариантов осуществления связывающий белок содержит $TCR\alpha$, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 104 или 7, и где $TCR\beta$ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 103 или 106. В одном из вариантов осуществления связывающий белок содержит: (a) аминокислотную последовательность $CDR1\alpha$, указанную в SEQ ID NO: 85, (b) аминокислотную последовательность $CDR2\alpha$, указанную в SEQ ID NO: 86 или 119, (c) аминокислотную последовательность $CDR3\alpha$, указанную в SEQ ID NO: 35, (d) аминокислотную последовательность $CDR1\beta$, указанную в SEQ ID NO: 83, необязательно указанную в SEQ ID NO: 84, дополнительно необязательно указанную в SEQ ID NO: 82, (e) аминокислотную последовательность $CDR2\beta$, указанную в SEQ ID NO: 79, и (f) аминокислотную последовательность $CDR3\beta$, указанную в SEQ ID NO: 36. В одном из вариантов осуществления связывающий белок содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой: (a) $TRBJ2-3*01$, (b) $TRAV12-3*01$, (c) $TRBV12-3*01$, (d) $TRAJ29*01$, и/или (e) $TRBD1*01$ или $TRBD2*02$. В одном из вариантов осуществления связывающий белок содержит V_{α} , содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 98, и V_{β} , содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 97. В одном из вариантов осуществления связывающий белок содержит V_{α} , содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 98, и V_{β} , содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID

NO: 97. В одном из вариантов осуществления связывающий белок содержит α -цепь TCR ($TCR\alpha$) и β -цепь TCR ($TCR\beta$), где $TCR\alpha$ содержит или состоит из аминокислотной последовательности по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 106 или 15, и/или где $TCR\beta$ содержит или состоит из аминокислотной последовательности по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 105 или 14. В одном из вариантов осуществления связывающий белок содержит $TCR\alpha$, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 106 или 15, и $TCR\beta$, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 105 или 14. В одном из вариантов осуществления связывающий белок способен специфически связываться с комплексом SEQ ID NO: 31:человеческий лейкоцитарный антиген (HLA), и где HLA необязательно представляет собой HLA-A*201. В одном из вариантов осуществления связывающий белок представляет собой или содержит TCR, где TCR необязательно растворим, антигенсвязывающий фрагмент TCR, scTCR или CAR. В одном из вариантов связывающий белок является человеческим, гуманизированным или химерным. В одном из вариантов связывающий белок способен связываться с комплексом мезотелин:HLA в отсутствие CD8или независимо от него.

[0261] В одном из вариантов осуществления связывающий белок имеет значение EC50 пептида Msln приблизительно 9 мкМ, приблизительно 8 мкМ, приблизительно 7 мкМ, приблизительно 6 мкМ, приблизительно 5 мкМ, приблизительно 4 мкМ, приблизительно 3 мкМ, приблизительно 2 мкМ, приблизительно 1 мкМ, приблизительно 0,9 мкМ, приблизительно 0,8 мкМ, приблизительно 0,7 мкМ, приблизительно 0,6 мкМ, приблизительно 0,5 мкМ, приблизительно 0,4 мкМ, приблизительно 0,3 мкМ, приблизительно 0,2 мкМ или менее.

[0262] В одном из вариантов осуществления обеспечена композиция, содержащая связывающий белок, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

[0263] В одном из вариантов осуществления полинуклеотид кодирует связывающий белок, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в клетке-хозяине, где клетка-хозяин необязательно представляет собой клетку иммунной системы человека, предпочтительно Т-клетку. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет последовательность по меньшей мере приблизительно на 50 % идентичную полинуклеотидной последовательности, указанной в

любой из SEQ ID NO: 1-4, 9-12, 17-20, 25 и 26. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид включает полинуклеотид, кодирующий цепь TCR α , и полинуклеотид, кодирующий цепь TCR β , имеющие последовательность по меньшей мере приблизительно на 50 % идентичную полинуклеотидным последовательностям, указанным в SEQ ID NO: (i) 1 и 3, соответственно, (ii) 2 и 4 соответственно, (iii) 9 и 11 соответственно, (iv) 10 и 12 соответственно, (v) 17 и 19, соответственно, (vi) 18 и 20 соответственно, или (vii) 25 и 26 соответственно. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, расположенный между полинуклеотидом, кодирующим цепь TCR β , и полинуклеотидом, кодирующим цепь TCR α . В некоторых вариантах осуществления кодируемый полипептид содержит аминокислотную последовательность, как указано в любой из SEQ ID NO: 8, 16, 24 и 30. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, имеет последовательность по меньшей мере приблизительно на 50 % идентичную полинуклеотидной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 5, 13, 21, 27 и 120. В конкретных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 120.

[0264] В некоторых вариантах осуществления обеспечен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, как описано в настоящем документе, функционально связанный с последовательностью контроля экспрессии. В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии способен доставлять полинуклеотид в клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой гематopoэтическую клетку-предшественника или клетку иммунной системы человека. В некоторых вариантах осуществления клетка иммунной системы представляет собой CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку, CD4- CD8- двойную отрицательную Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, натуральную клетку-киллер, натуральную Т-клетку-киллер, макрофаг, дендритную клетку или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления клетка иммунной системы представляет собой наивную Т-клетку, центральную Т-клетку памяти, стволовую Т-клетку памяти, эффекторную Т-клетку памяти или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор или γ -ретровирусный вектор.

[0265] В одном из вариантов осуществления рекомбинантная клетка-хозяин содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, как описано в данном документе, и/или вектор экспрессии, как описано в данном документе, где

рекомбинантная клетка-хозяин способна экспрессировать на своей клеточной поверхности кодируемый связывающий белок. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой гематопозитическую клетку-предшественника или клетку иммунной системы человека. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, CD4⁻ CD8⁻ двойную отрицательную Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, натуральную клетку-киллер, натуральную Т-клетку-киллер, макрофаг, дендритную клетку или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой наивную Т-клетку, центральную Т-клетку памяти, стволовую Т-клетку памяти, эффекторную Т-клетку памяти или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой Т-клетку или НК-Т-клетку, кодирующую эндогенный TCR, и где мезотелин-специфический связывающий белок, кодируемый гетерологичным полинуклеотидом, способен более эффективно связываться с белком CD3 по сравнению с эндогенным TCR. В некоторых вариантах осуществления экспрессия Nur77 увеличивается в рекомбинантной клетке-хозяине, когда клетка-хозяин находится в присутствии пептида Msln, связанного кодируемым связывающим белком, в концентрации приблизительно 10^{-2} мкМ пептида, приблизительно 10^{-1} мкМ пептида, приблизительно 1 мкМ пептида или приблизительно 10^1 мкМ пептида, где пептид необязательно презентируется клетке-хозяину антигенпрезентирующей клеткой. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку, где рекомбинантная клетка-хозяин не продуцирует IFN- γ и/или не проявляет активации и/или цитотоксической активности при контакте с клеткой, экспрессирующей: (i) HLA-C6:02:01, (ii) HLA-B13:01:01 без HLA-B13:02:01, (iii) HLA-A3, (iv) HLA-A29, (v) HLA-B40, (vi) HLA-B44, (vii) HLA-C3, (viii) HLA-C16, (ix) HLA-A1, (x) HLA-24, (xi) HLA-B7, (xii) HLA-B57, (xiii) HLA-C7, (xiv) HLA-A11, (xv) HLA-B15, (xvi) HLA-C4, (xvii) HLA-C12, (xviii) HLA-B8, (xix) HLA-B49, (xx) HLA-B51, (xxi) HLA-C15, (xxii) HLA-A30, (xxiii) HLA-A68, (xxiv) HLA-C2, (xxv) HLA-A32, (xxvi) HLA-A33, (xxvii) HLA-B55, (xxviii) HLA-C1, (xxvix) HLA-C5, (xxix) HLA-B8, (xxx) HLA-B35, или (xxxi) любую комбинацию с (i) по (xxx) при условии, что пептид мезотелина, связанный кодируемым связывающим белком, отсутствует. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой Т-клетку или НК-Т-клетку, кодирующую эндогенный TCR, где связывающий белок, кодируемый гетерологичным полинуклеотидом, имеет более высокую экспрессию на клеточной поверхности по сравнению с эндогенным TCR.

[0266] В одном из вариантов осуществления обеспечена клеточная композиция, содержащая рекомбинантную клетку-хозяина, описанную в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

[0267] В одном из вариантов осуществления обеспечена однократная доза, содержащая эффективное количество рекомбинантной клетки-хозяина или клеточной композиции, описанной в данном документе.

[0268] В одном из вариантов осуществления обеспечен способ лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией и/или активностью мезотелина у субъекта, включающий: введение субъекту эффективного количества связывающего белка, описанного в данном документе, рекомбинантной клетки-хозяина, описанной в данном документе, композиции, описанной в данном документе, или однократной дозы, описанной в данном документе. В одном из вариантов осуществления способ включает способ лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией и/или активностью мезотелина, у субъекта, где заболевание или расстройство представляет собой гиперпролиферативное заболевание или пролиферативное заболевание. В одном из вариантов осуществления способ включает способ лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией и/или активностью мезотелина, у субъекта, где заболевание или расстройство представляет собой рак и, необязательно, рак представляет собой солидный рак или гематологическое злокачественное новообразование. В одном из вариантов осуществления способ включает способ лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией и/или активностью мезотелина, у субъекта, где заболевание или нарушение представляет собой одно из следующих заболеваний: рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, карциному костей и мягких тканей, опухоль головного мозга, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, колоректальную аденокарциному, колоректальный рак, десмоидную опухоль, эмбриональный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, аденокарциному желудка, мультиформную глиобластому, гинекологическую опухоль, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак печени, рак легких, мезотелиому, злокачественную меланому, остеосаркому, рак яичников, рак поджелудочной железы, аденокарциному протоков поджелудочной железы, первичную астроцитарную опухоль, первичный рак щитовидной железы, рак предстательной железы, рак почек, почечно-клеточную карциному, рабдомиосаркому, рак кожи, саркому мягких тканей, опухоль половых клеток яичка, уротелиальный рак, саркому матки или рак матки. В одном из вариантов осуществления способ включает способ лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией и/или активностью мезотелина, у субъекта, где заболевание или расстройство представляет

собой одно из следующих: рак поджелудочной железы, рак яичников, рак молочной железы, рак желудка, колоректальный рак, мезотелиому или рак легких. В одном из вариантов осуществления связывающий белок, клетку-хозяина, композицию или однократную дозу вводят парентерально или внутривенно. В одном из вариантов осуществления способ включает введение субъекту множества доз связывающего белка, клетки-хозяина, композиции или однократной дозы и, необязательно, множество доз вводят с интервалами между введениями от приблизительно двух до приблизительно четырех недель. В одном из вариантов осуществления способ дополнительно включает введение субъекту цитокина. В одном из вариантов осуществления способ включает введение IL-2, IL-15, IL-21 или любой их комбинации. В одном из вариантов осуществления способ включает субъекта, который дополнительно получает или получал ингибитор иммунных контрольных точек, агонист агента, стимулирующего иммунную контрольную точку, лучевую терапию, антитело, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок Fc, антисмысловую нуклеотидную терапию, генную терапию, вакцину, хирургическое вмешательство, химиотерапию или любую их комбинацию.

[0269] В одном из вариантов осуществления, описанный в данном документе связывающий белок, описанная в данном документе композиция, описанный в данном документе полинуклеотид, описанный в данном документе вектор экспрессии, описанная в данном документе рекомбинантная клетка-хозяин, описанная в данном документе клеточная композиция или описанная в данном документе однократная доза для применения для лечения заболевания или расстройства, характеризующегося экспрессией и/или активностью мезотелина.

[0270] В одном варианте осуществления описанный в данном документе связывающий белок, описанная в данном документе композиция, описанный в данном документе полинуклеотид, описанный в данном документе вектор экспрессии, описанная в данном документе рекомбинантная клетка-хозяин, описанная в данном документе клеточная композиция или описанная в данном документе однократная доза для применения в адоптивной иммунотерапии заболевания или расстройства, характеризующегося экспрессией и/или активностью мезотелина.

[0271] В одном варианте осуществления, описанный в данном документе связывающий белок, описанная в данном документе композиция, описанный в данном документе полинуклеотид, описанный в данном документе вектор экспрессии, описанная в данном документе рекомбинантная клетка-хозяин, описанная в данном документе клеточная композиция или описанная в данном документе однократная доза для

применения для получения лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, характеризующегося экспрессией и/или активностью мезотелина.

[0272] В одном варианте осуществления связывающий белок, композиция, полинуклеотид, вектор экспрессии, рекомбинантная клетка-хозяин, клеточная композиция или однократная доза для применения, как описано в настоящем документе, где заболевание или расстройство, характеризующееся экспрессией и/или активностью мезотелина, представляет собой мезотелиому, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак легких, рак, при котором пептид Msln₂₀₋₂₈ экспрессируется на опухолевой клетке указанного злокачественного образования, или рак, при котором пептид Msln₅₃₀₋₅₃₈ экспрессируется на опухолевой клетке указанного злокачественного образования.

[0273] В одном из вариантов осуществления связывающий белок, композиция, полинуклеотид, вектор экспрессии, рекомбинантная клетка-хозяин, клеточная композиция или однократная доза для применения, как описано в настоящем документе, где заболевание или расстройство, характеризующееся экспрессией и/или активностью мезотелина, представляет собой рак поджелудочной железы, рак яичников, рак молочной железы, рак желудка, колоректальный рак, мезотелиому или рак легких.

[0274] В одном из вариантов осуществления обеспечен выделенный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, способный специфически связываться с комплексом SEQ ID NO: 32:HLA-A:02*01, где полинуклеотид содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 120. В одном из вариантов осуществления обеспечен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, который кодирует связывающий белок, который способен специфически связываться с комплексом SEQ ID NO: 32:HLA-A:02*01, где полинуклеотид содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 120, функционально связанный с последовательностью контроля экспрессии. В данном варианте осуществления, вектор экспрессии, вектор экспрессии способен доставлять полинуклеотид в клетку-хозяина. В данном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой гематопозитическую клетку-предшественника или клетку иммунной системы человека. В данном варианте осуществления клетка иммунной системы вектора экспрессии представляет собой CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, CD4⁻ CD8⁻ двойную отрицательную Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, натуральную клетку-киллер, натуральную Т-клетку-киллер, макрофаг, дендритную клетку или любую их комбинацию. В данном варианте осуществления клетка иммунной системы вектора экспрессии представляет собой наивную Т-клетку, центральную Т-клетку памяти, стволовую Т-клетку памяти, эффекторную Т-клетку памяти или любую их комбинацию. Вектор экспрессии по любому

из пп. 86-90, где вектор экспрессии представляет собой вирусный вектор. В данном варианте осуществления вектор экспрессии представляет собой вирусный вектор, который представляет собой лентивирусный вектор или γ -ретровирусный вектор.

[0275] В одном из вариантов осуществления обеспечена рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид, описанный в данном документе, и/или вектор экспрессии, описанный в данном документе, где рекомбинантная клетка-хозяин способна экспрессировать на своей клеточной поверхности кодируемый связывающий белок. В данном варианте осуществления рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой гематопозитическую клетку-предшественника или клетку иммунной системы человека. В данном варианте осуществления рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку иммунной системы, которая представляет собой CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, CD4⁻ CD8⁻ двойную отрицательную Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, натуральную клетку-киллер, натуральную Т-клетку-киллер, макрофаг, дендритную клетку или любую их комбинацию. В данном варианте рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой Т-клетку. В данном варианте осуществления рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой наивную Т-клетку, центральную Т-клетку памяти, стволовую Т-клетку памяти, эффекторную Т-клетку памяти или любую их комбинацию.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Идентификация и выбор TCR, специфических для MSLN₂₀ или MSLN₅₃₀.

[0276] Типичные клоны TCR, специфические для Msln₂₀ или Msln₅₃₀, показаны на фиг. 1А и 1В, соответственно, и оценка обогащения каждого клонотипа TCR в способе на основе секвенирования следующего поколения для выделения TCR, как описано в настоящем документе, сравнивается с частотой Т-лимфоцитов. Оценка обогащения на оси у коррелирует с величиной связывания с тетрамером пептид:HLA. Все TCR были получены и протестированы на функцию при экспрессии в репортерных линиях Т-клеток и первичных CD8⁺ МКПК. TCR с наивысшей функциональной авидностью при переносе в CD8⁺ Т-клетки реципиенты обведены кружком. Эти данные показывают, что TCR, идентифицированные как обладающие наивысшей функциональной активностью, не имели наивысшего уровня связывания тетрамера и были редкими в популяциях Т-клеток, наращивающих пептиды. Не ограничиваясь теорией, полагают, что это может быть частично связано со снижением поверхностной экспрессии TCR этими высокоавидными клонотипами. Было синтезировано и оценено более 100 конструкций TCR (для Msln₂₀ синтезировано 60 TCR, для Msln₅₃₀ синтезировано 42 TCR). Мезотелин-специфические Т-

клеточные линии были получены от 18 доноров. Клетки окрашивали титрованными концентрациями тетрамера, сортировали и анализировали одноклеточным секвенированием TCR (всего приблизительно 8 экспериментов по сортировке).

Пример 2

Связывание тетрамера TCR MSLN₅₃₀

[0277] Msln₅₃₀-специфические кодирующие конструкции TCR трансдуцировали с помощью лентивируса в CD8⁺ Юркат Т-клетки, в которых отсутствуют эндогенные цепи TCR α/β (Юркат76 - темно-серые участки), или клетки Юркат76, трансдуцированные для экспрессии CD8 $\alpha\beta$ (Jurkat76-CD8 $\alpha\beta$ - светло-серые участки) (см. фиг. 2). В отсутствие цепей TCR α/β CD3 не может экспрессироваться на поверхности клетки. Следовательно, экспрессия CD3 представляет собой заменитель для поверхностной экспрессии TCR в указанных клетках, позволяя оценить связывание тетрамера относительно поверхностной экспрессии TCR. Со ссылкой на фиг. 2, TCR представлены в порядке связывания тетрамеров относительно экспрессии CD3, а TCR выше указанной линии считаются CD8-независимыми, характеризующимися высокой аффинностью.

Пример 3

Оценка антиген-специфического ответа Т-клеток

[0278] Четыре TCR, которые продемонстрировали наивысший уровень связывания тетрамера, оценивали на антиген-специфическую функцию с применением репортерной линии Т-клеток Юркат, которая несет трансген tdTomato, помещенный локус Nur77 путем нокина. Т2 клетки-мишени, которые активировали титруемыми концентрациями пептида, и Т-клетки, экспрессирующие TCR, оценивали на экспрессию tdTomato, как показано на фиг. 3А. Процент tdTomato-положительных клеток, обнаруженных для каждой концентрации пептида, наносили на график и подгоняли к кривой доза-ответ с помощью нелинейной регрессии (фиг. 3В). Расчетное значение EC50 для каждого TCR наносили на график, и TCR B11 (также обозначаемый как 11В) идентифицировали как наиболее avidный TCR (см. стрелки на фиг. 3В и 3С). Обнаружено, что два TCR с наивысшим уровнем связывания тетрамера (A16 и A3, также обозначаемые как 16А и 3А соответственно) имеют более низкую чувствительность к антигену и также обозначены стрелками на фиг. 3В.

Пример 4

Функциональная оценка MSLN₅₃₀-специфических TCR

[0279] Поскольку функция не коррелировала со связыванием тетрамера для четырех верхних связывающих тетрамеры белков, все выбранные Msln₅₃₀-специфические TCR оценивали на экспрессию tdTomato в ответ на более низкую концентрацию пептида

(0,1 мкм) в качестве показателя чувствительности к антигену (см. Фиг. 4). Обнаружено, что два TCR, которые связывают тетрамер на более низких уровнях (B9 и A11), опосредуют высокий уровень экспрессии tdTomato в ответ на антиген. Данные этих и других TCR показаны в прямоугольниках на фиг. 4, они были включены в набор TCR для дальнейшего изучения. Некоторые TCR, включая B9 и A11, обладают высокой антиген-специфической активностью, несмотря на более низкое связывание тетрамера. На фиг. 4 TCR представлены в порядке связывания тетрамера.

Пример 5

Функциональная оценка выбранных TCR

[0280] Со ссылкой на фиг. 5A-5C, CD8⁺ Т-клетки получали из МКПК доноров и трансдуцировали с помощью лентивируса с TCR, специфическими для Msln₅₃₀ или Msln₂₀ (которые отобрали с помощью аналогичного процесса, описанного в примерах 3 и 4). Через 8 дней клетки тетрамер^{hi} сортировали и дополнительно наращивали в течение от 8 до 10 дней. Трансдуцированные Т-клетки окрашивали тетрамером и CD8 для подтверждения чистоты и однородного высокого уровня экспрессии CD8.

[0281] Как показано на фиг. 6A-6C, TCR-трансдуцированные эффекторные CD8⁺ Т-клетки, специфические для Msln₂₀ (A) или Msln₅₃₀ (B), инкубировали с Т2-клетками-мишенями, активированными пептидами, и оценивали дозозависимую продукцию IFN-γ путем анализа внутриклеточного IFN-γ с помощью проточной цитометрии (эффекторные клетки = первичные CD8⁺ Т-клетки, трансдуцированные TCR (отсортированные), мишени = Т2-клетки, активированные пептидами). Процент IFN-γ-положительных клеток, обнаруженных для каждой концентрации пептида, наносили на график и подгоняли к кривой доза-ответ с помощью нелинейной регрессии. На график наносили рассчитанное значение EC50 для каждого TCR. На фиг. 6C, наиболее авидный TCR, специфический для каждого эпитопа ("20-B3" и "530-B11", соответственно), указан стрелкой.

Пример 6

Уничтожение опухолевых клеток CD8⁺ Т-клетками, трансдуцированными TCR

[0282] Две линии опухолевых клеток, которые экспрессируют Msln, MDA-MB-231 и MDA-MB-468, были направлены на титруемые соотношения очищенных сортировкой Msln-специфических TCR-трансдуцированных CD8⁺ Т-клеток с применением анализа высвобождения хрома, измеряющего лизис специфических опухолевых клеток (см. фиг. 7A-7C). Результаты для TCR Msln₅₃₀-B11, TCR с наивысшей выявленной авидностью, указаны стрелкой.

Пример 7

Анализ эпитопа с помощью аланинового сканирования пептидов MSLN₂₀ и MSLN₅₃₀

[0283] На фиг. 8 представлены результаты анализа эпитопов, в котором каждая последующая аминокислота в последовательности пептида-мишени Mlsn была заменена аланином, и Т-клетки, трансдуцированные TCR, инкубировали с клетками-мишенями HLA-A2⁺, активированными вариантом пептида. Иллюстративные данные по продукции IFN- γ в ответ на каждый вариант пептида Msln₂₀-специфическим TCR показаны в нижней части рисунка.

[0284] Результаты анализа аланинового сканирования, показывающие процент IFN- γ Т-клеток в ответ на каждый аланин-замещенный пептид для каждого из четырех протестированных TCR, показаны на фиг. 9A-9D. Существенные остатки идентифицированы по их однобуквенному аминокислотному коду, а несущественные остатки обозначены знаком X.

Пример 8

Анализ эпитопов, гомологичных MSLN₅₃₀ в протеоме человека

[0285] Пептиды человека, обладающие потенциальной кросс-реактивностью с Msln-специфическими TCR, идентифицировали с помощью инструмента ScanProsite путем поиска в протеоме человека указанного консенсусного эпитопного мотива каждого из указанных Msln₅₃₀-специфических TCR (A11 и B11), как показано на фиг. 10. Полученные пептиды анализировали на связывание HLA-A2 с применением трех различных алгоритмов прогнозирования: SITHPATHI, PanMHCnet и IEDB. Рекомендованное пороговое значение для каждого подхода указано в скобках рядом с названием алгоритма. Возможные кросс-реактивные пептиды указаны как основной показатель и их синтезировали для дальнейшего анализа.

Пример 9

Анализ синтезированных пептидов с потенциальной гомологией к MSLN₅₃₀ в протеоме человека

[0286] T2 клетки-мишени активировали пептидами с потенциалом кросс-реактивности с TCR Msln₅₃₀-A11 и -B11 и инкубировали с Т-клетками, которые трансдуцировали для экспрессии таких TCR, и сортировали для очистки (см. Фиг. 11A-11B, эффекторные Т-клетки = TCR-трансдуцированные CD8⁺ Т-клетки, отсортированные по тетрамерам, клетки-мишени = Т2-клетки, активированные 10 мкМ пептида). Для определения потенциальной реактивности применяли высокую дозу пептида (10 мкМ). Процент IFN- γ -положительных TCR-трансдуцированных Т-клеток показан на фиг. 11A для Msln₅₃₀-11A и Msln₅₃₀-11B. Ответ, полученный при воздействии 10 мкМ пептида

Msln₅₃₀ дикого типа и максимальный ответ, полученный при воздействии коктейля для активации неспецифических Т-клеток, показаны в правой части графика. Только один пептид (№ 10) вызвал низкий уровень (менее 20 %) ответа Т-клеток, трансдуцированных TCR Msln₅₃₀-11B, при концентрации пептида 10 мкМ. График на фиг. 11B показывает кривую доза-ответ для реактивности Т-клеток, трансдуцированных Msln₅₃₀-11B, к пептиду Msln₅₃₀ в сравнении с несколькими потенциально кросс-реактивными пептидами, включая пептид № 10, для определения реактивности на физиологических уровнях. Данные о процентном содержании IFN- γ соответствовали кривым доза-ответ с помощью нелинейной регрессии, и значения EC50 были рассчитаны и показаны под графиком. Эти данные показывают, что значение EC50 Msln₅₃₀-11B для пептида № 10 более чем в 3000 раз выше, чем для Msln₅₃₀, следовательно, Msln₅₃₀-11B имеет гораздо большую специфичность к Msln₅₃₀, чем к пептиду № 10.

Пример 10

Анализ аллореактивности путем направленного воздействия на различные донорские лимфобластные клеточные линии (LCL)

[0287] Для определения потенциальной аллореактивности Т-клеток, экспрессирующих Msln₂₀-3B или Msln₅₃₀-11A или -11B, Т-клетки, трансдуцированные TCR, культивировали с аллогенными LCL, которые естественным образом экспрессируют различные аллели HLA, включая многие из наиболее распространенных аллелей. Линии LCL и соответствующая экспрессия аллеля HLA перечислены в таблице на фиг. 12A. Для каждой клеточной линии (фиг. 12B-12I) показан процент экспрессии IFN- γ , когда Т-клетки и клетки LCL совместно культивировали в присутствии или в отсутствие добавленного пептида Msln₅₃₀ (который представлен трансдуцированными Т-клетками, когда в клеточной линии LCL отсутствует экспрессия HLA-A2).

[0288] Дальнейший анализ направленного воздействия Т-клеток на различные клеточные линии LCL показан на фиг. 13A-13H. Для определения потенциальной аллореактивности Т-клеток, экспрессирующих Msln₂₀-3B или Msln₅₃₀-11A или -11B, Т-клетки, трансдуцированные TCR, культивировали с аллогенными LCL, которые естественным образом экспрессируют различные аллели HLA, включая многие из наиболее распространенных аллелей. Линии LCL и соответствующая экспрессия аллеля HLA перечислены в таблице на фиг. 13A. Для каждой клеточной линии процент экспрессии IFN- γ показан после совместного культивирования клеток-мишеней и эффекторных клеток в присутствии или в отсутствие добавленного пептида Msln₅₃₀ (который представлен трансдуцированными Т-клетками, когда в клеточных линиях LCL отсутствует экспрессия HLA-A2). Указанный второй набор LCL включает несколько

линий, которые экспрессируют HLA-C6 и HLA-B13, которые демонстрируют неравновесное сцепление и обычно встречаются вместе. Некоторые из этих LCL вызывали ответ Т-лимфоцитов, трансдуцированных Msln_{530-11B}. Эти данные показывают, что HLA-B13:02:01 является аллореактивным аллелем, поскольку только клетки, экспрессирующие HLA-B13:02:01, вызывают ответ, тогда как клетки, экспрессирующие HLA-C6:02:01 или HLA-B13:01:01 без HLA-B13:02:01 не вызывают ответа.

[0289] В таблице 1 показана частота коэкспрессии HLA-B13:02:01 и HLA-A2:01:01 в различных популяциях. Обнаружена некоторая аллореактивность, специфичная для HLA-B13:02:01. Однако, учитывая небольшую частоту гаплотипов в популяции, у пациента редко можно обнаружить кросс-реактивный аллель.

Таблица 1: Частоты гаплотипов HLA A2:01/B13:02

Американцы европейского происхождения	0,845 % (B13:02)	(29,6 % A2:01)
Афроамериканцы	0,177 % (B13:02)	(12,5 % A2:01)
Выходцы из азиатско-тихоокеанского региона	0,110 % (B13:02)	(9,5 % A2:01)
Латиноамериканцы	0,129 % (B13:02)	(19,4 % A2:01)

[0290] Различные варианты осуществления, описанные выше, могут быть объединены для обеспечения дополнительных вариантов осуществления. Содержание всех патентов США, публикаций патентных заявок США, заявок на патенты США, иностранных патентов, иностранных патентных заявок и непатентных публикаций, упомянутых в данном описании и/или перечисленных в информационном перечне заявки, включая предварительную заявку на патент № 62/758397, поданную 9 ноября 2018 г., полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Варианты осуществления могут быть изменены, если необходимо применять концепции различных патентов, заявок и публикаций для обеспечения дополнительных вариантов осуществления.

Эти и другие изменения могут быть внесены в варианты осуществления в свете приведенного выше подробного описания. Подразумевают, что в нижеследующей формуле изобретения термины не ограничивают формулу изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в описании и формуле изобретения, но включают все возможные варианты осуществления вместе с полным объемом эквивалентов, на которые формула настоящего изобретения распространена. Соответственно, формула изобретения не ограничена настоящим изобретением.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Связывающий белок, содержащий вариабельный домен α -цепи (V_α) Т-клеточного рецептора (TCR) и вариабельный домен β -цепи (V_β) TCR, где:

(a) V_α содержит аминокислотную последовательность CDR3 (область, определяющая комплементарность), указанную в SEQ ID NO: 39 или 37, и V_β необязательно содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 101 или 99,

(b) V_β содержит аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 38, и V_α необязательно содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 102 или 100, и/или

(c) V_α содержит аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 39 или 37, и V_β содержит аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 40 или 38,

где связывающий белок способен специфически связываться с комплексом пептид мезотелин (Msln):HLA (человеческий лейкоцитарный антиген).

2. Связывающий белок по п. 1, где:

(i) V_α из (a), (b) и/или (c) содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 102 или 100, при условии, что по меньшей мере три или четыре из CDR не имеют изменений в последовательности, где те CDR, которые имеют изменения последовательности, имеют только не более двух аминокислотных замен, не более пяти смежных делеций аминокислот или их комбинацию, и/или

(ii) V_β из (a), (b) и/или (c) содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 101 или 99, при условии, что по меньшей мере три или четыре CDR не имеют изменений в последовательности, где те CDR, которые имеют изменения последовательности, имеют только не более двух аминокислотных замен, не более пяти смежных делеций аминокислот или их комбинацию.

3. Связывающий белок по п. 1 или п. 2, содержащий:

(a) аминокислотную последовательность CDR1 α , указанную в SEQ ID NO: 93,

(b) аминокислотную последовательность CDR2 α , указанную в SEQ ID NO: 94,

(c) аминокислотную последовательность CDR3 α , указанную в SEQ ID NO: 39,

(d) аминокислотную последовательность CDR1 β , указанную в SEQ ID NO: 83, необязательно указанную в SEQ ID NO: 84, дополнительно необязательно указанную в SEQ ID NO: 91,

(e) аминокислотную последовательность CDR2 β , указанную в SEQ ID NO: 92, и

(f) аминокислотную последовательность CDR3 β , указанную в SEQ ID NO: 40.

4. Связывающий белок по любому из пп. 1-3, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой:

(a) TRBJ2-3*01,

(b) TRAV21*01 или TRAV21*02,

(c) TRBV5-4*01,

(d) TRAJ57*01, и/или

(e) TRBD1*01 или TRBD2*02.

5. Связывающий белок по любому из пп. 1-4, где V α содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 102, и где V β содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 101.

6. Связывающий белок по п. 5, где V α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 102, и где V β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 101.

7. Связывающий белок по любому из пп. 1-6, содержащий α -цепь TCR (TCR α) и β -цепь TCR (TCR β), где TCR α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 110 или 29, и/или где TCR β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 109 или 28.

8. Связывающий белок по п. 7, где TCR α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 110 или 29, и где TCR β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 109 или 28.

9. Связывающий белок по п. 1 или п. 2, содержащий:

(a) аминокислотную последовательность CDR1 α , как указано в SEQ ID NO: 89,

(b) аминокислотную последовательность CDR2 α , как указано в SEQ ID NO: 90,

(c) аминокислотную последовательность CDR3 α , как указано в SEQ ID NO: 37,

(d) аминокислотную последовательность CDR1 β , как указано в SEQ ID NO: 83, необязательно как указано в SEQ ID NO: 87,

(e) аминокислотную последовательность CDR2 β , как указано в SEQ ID NO: 88, и

(f) аминокислотную последовательность CDR3 β , как указано в SEQ ID NO: 38.

10. Связывающий белок по любому из пп. 1, 2 или 9, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой:

(a) TRBJ1-1*01 или TRBJ2-3*01,

(b) TRAV4-1*01,

(c) TRAJ18*01, и/или

(d) TRBD1*01 или TRBD2*02.

11. Связывающий белок по любому из пп. 1, 2, 9 или 10, где V α содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 100, и V β содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 99.

12. Связывающий белок по п. 11, где V α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 100, и где V β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 99.

13. Связывающий белок по любому из пп. 1, 2 или 9-12, содержащий α -цепь TCR (TCR α) и β -цепь TCR (TCR β), где TCR α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 108 или 23, и/или где TCR β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 107 или 22.

14. Связывающий белок по п. 13, где TCR α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 108 или 23, и где TCR β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 107 или 22.

15. Связывающий белок по любому из пп. 1-14, способный специфически связываться с комплексом SEQ ID NO: 32:HLA.

16. Связывающий белок по любому из пп. 1-15, где HLA включает HLA-A*201.

17. Связывающий белок по п. 15 или п. 16, где аланиновый мутагенез любого одного или более остатков 3, 5, 6 или 9 SEQ ID NO: 32 не подавляет или по существу не ухудшает связывание связывающего белка с комплексом пептид Msln:HLA.

18. Связывающий белок по любому из пп. 15-17, способный связываться с комплексом пептид:HLA, где пептид содержит или состоит из консенсусной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 61.

19. Связывающий белок по любому из пп. 15-18, где аланиновый мутагенез любого одного или более остатков 1, 5 или 9 SEQ ID NO: 32 не подавляет или по существу не ухудшает связывание связывающего белка с комплексом пептид Msln:HLA.

20. Связывающий белок по любому из пп. 15-19, способный связываться с комплексом пептид:HLA, где пептид содержит или состоит из консенсусной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 62.

21. Связывающий белок по любому из пп. 1-20, не связывающийся или специфически не связывающийся с комплексом пептид:HLA, где пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой одной или более из SEQ ID NO: 63-77, и где HLA необязательно представляет собой HLA-A:02*01.

22. Связывающий белок, содержащий переменный домен α -цепи (V_α) T-клеточного рецептора (TCR) и переменный домен β -цепи (V_β) TCR, где:

(a) V_α содержит аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 33 или 35, и V_β необязательно содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 95 или 97,

(b) V_β содержит аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 34 или 36, и V_α необязательно содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 96 или 98, и/или

(c) V_α содержит аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 33 или 35, и V_β содержит аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 40 или 38,

где связывающий белок способен специфически связываться с комплексом пептид мезотелин (Msln):HLA.

23. Связывающий белок по п. 22, где:

(i) V_α из (a), (b) и/или (c) содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 96 или 98, при условии, что по меньшей мере три или четыре из

CDR не имеют изменений в последовательности, где те CDR, которые имеют изменения последовательности, имеют только не более двух аминокислотных замен, не более пяти смежных делеций аминокислот или их комбинацию, и/или

(ii) V_{β} из (a), (b) и/или (c) содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 95 или 97, при условии, что по меньшей мере три или четыре из CDR не имеют изменений в последовательности, где те CDR, которые имеют изменения последовательности, имеют только не более двух аминокислотных замен, не более пяти смежных делеций аминокислот или их комбинацию.

24. Связывающий белок по п. 22 или п. 23, содержащий:

- (a) аминокислотную последовательность CDR1 α , указанную в SEQ ID NO: 80,
- (b) аминокислотную последовательность CDR2 α , указанную в SEQ ID NO: 81 или 118,
- (c) аминокислотную последовательность CDR3 α , указанную в SEQ ID NO: 33,
- (d) аминокислотную последовательность CDR1 β , указанную в SEQ ID NO: 83, необязательно указанную в SEQ ID NO: 84, дополнительно необязательно указанную в SEQ ID NO: 78,
- (e) аминокислотную последовательность CDR2 β , указанную в SEQ ID NO: 79, и
- (f) аминокислотную последовательность CDR3 β , указанную в SEQ ID NO: 34.

25. Связывающий белок по любому из пп. 22-24, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой:

- (a) TRBJ2-7*01 или TRBJ2-3*01,
- (b) TRAV1-1*01,
- (c) TRBV12-4*01,
- (d) TRAJ3*01, и/или
- (e) TRBD1*01 или TRBD2*02.

26. Связывающий белок по любому из пп. 22-25, где V_{α} содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 96, и где V_{β} содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 95.

27. Связывающий белок по п. 26, где V_{α} содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 96, и где V_{β} содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 95.

28. Связывающий белок по любому из пп. 22-27, содержащий α -цепь TCR (TCR α) и β -цепь TCR (TCR β), где TCR α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 104 или 7, и/или где TCR β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 103 или 6.

29. Связывающий белок по п. 28, где TCR α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 104 или 7, и где TCR β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 103 или 106.

30. Связывающий белок по п. 22 или п. 23, содержащий:

- (a) аминокислотную последовательность CDR1 α , указанную в SEQ ID NO: 85,
- (b) аминокислотную последовательность CDR2 α , указанную в SEQ ID NO: 86 или 119,
- (c) аминокислотную последовательность CDR3 α , указанную в SEQ ID NO: 35,
- (d) аминокислотную последовательность CDR1 β , указанную в SEQ ID NO: 83, необязательно указанную в SEQ ID NO: 84, дополнительно необязательно указанную в SEQ ID NO: 82,
- (e) аминокислотную последовательность CDR2 β , указанную в SEQ ID NO: 79, и
- (f) аминокислотную последовательность CDR3 β , указанную в SEQ ID NO: 36.

31. Связывающий белок по любому из пп. 22, 23 или 30, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой:

- (a) TRBJ2-3*01,
- (b) TRAV12-3*01,
- (c) TRBV12-3*01,
- (d) TRAJ29*01, и/или
- (e) TRBD1*01 или TRBD2*02.

32. Связывающий белок по любому из пп. 22, 23, 30 или 31, где V α содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 98, и V β , содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичную аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 97.

33. Связывающий белок по п. 32, где V_{α} содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 98, и где V_{β} содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 97.

34. Связывающий белок по любому из пп. 22, 23 или 30-33, содержащий α -цепь TCR ($TCR\alpha$) и β -цепь TCR ($TCR\beta$), где $TCR\alpha$ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 106 или 15, и/или где $TCR\beta$ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно на 85 % идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 105 или 14.

35. Связывающий белок по п. 34, где $TCR\alpha$ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 106 или 15, и где $TCR\beta$ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 105 или 14.

36. Связывающий белок по любому из пп. 22-35, способный специфически связываться с комплексом SEQ ID NO: 31:HLA.

37. Связывающий белок по любому из пп. 22-35, где HLA включает HLA-A*201.

38. Связывающий белок по любому из пп. 1-35, представляющий собой или содержащий TCR, где TCR необязательно растворим, антигенсвязывающий фрагмент TCR, scTCR (одноцепочечный TCR) или CAR (химерный рецептор антигена).

39. Связывающий белок по любому из пп. 1-38, являющийся человеческим, гуманизированным или химерным.

40. Связывающий белок по любому из пп. 1-38, способный связываться с комплексом мезотелин:HLA в отсутствие CD8 или независимо от него.

41. Связывающий белок по любому из пп. 1-40, имеющий значение EC_{50} пептида Msln приблизительно 9 мкМ, приблизительно 8 мкМ, приблизительно 7 мкМ, приблизительно 6 мкМ, приблизительно 5 мкМ, приблизительно 4 мкМ, приблизительно 3 мкМ, приблизительно 2 мкМ, приблизительно 1 мкМ, приблизительно 0,9 мкМ, приблизительно 0,8 мкМ, приблизительно 0,7 мкМ, приблизительно 0,6 мкМ, приблизительно 0,5 мкМ, приблизительно 0,4 мкМ, приблизительно 0,3 мкМ, приблизительно 0,2 мкМ или менее.

42. Композиция, содержащая связывающий белок по любому из пп. 1-41 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

43. Полинуклеотид, кодирующий связывающий белок по любому из пп. 1-41.

44. Полинуклеотид по п. 43, представляющий собой кодон, оптимизированный для экспрессии в клетке-хозяине, где клетка-хозяин необязательно представляет собой клетку иммунной системы человека, предпочтительно Т-клетку.

45. Полинуклеотид по п. 43 или п. 44, включающий полинуклеотид, имеющий последовательность, по меньшей мере приблизительно на 50 % идентичную полинуклеотидной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 1-4, 9-12, 17-20, 25 и 26.

46. Полинуклеотид по любому из пп. 43-45, включающий полинуклеотид, кодирующий цепь TCR α , и полинуклеотид, кодирующий цепь TCR β , имеющие последовательность, по меньшей мере приблизительно на 50 % идентичную полинуклеотидным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:

- (i) 1 и 3 соответственно,
- (ii) 2 и 4 соответственно,
- (iii) 9 и 11 соответственно,
- (iv) 10 и 12 соответственно,
- (v) 17 и 19 соответственно,
- (vi) 18 и 20 соответственно, или
- (vii) 25 и 26 соответственно.

47. Полинуклеотид по любому из пп. 43-46, включающий полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, расположенный между полинуклеотидом, кодирующим цепь TCR β , и полинуклеотидом, кодирующим цепь TCR α .

48. Полинуклеотид по п. 47, где кодируемый полипептид содержит аминокислотную последовательность, как указано в любой из SEQ ID NO: 8, 16, 24 и 30.

49. Полинуклеотид по п. 47 или п. 48, где полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, имеет последовательность, по меньшей мере приблизительно на 50 % идентичную полинуклеотидной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 5, 13, 21, 27 и 120.

50. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 43-49, функционально связанный с последовательностью контроля экспрессии.

51. Вектор экспрессии по п. 50, способный доставлять полинуклеотид в клетку-хозяина.

52. Вектор экспрессии по п. 51, где клетка-хозяин представляет собой гематопозитическую клетку-предшественник или клетку иммунной системы человека.

53. Вектор экспрессии по п. 52, где клетка иммунной системы представляет собой CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, CD4⁻ CD8⁻ двойную отрицательную Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-

клетку, натуральную клетку-киллер, натуральную Т-клетку-киллер, макрофаг, дендритную клетку или любую их комбинацию.

54. Вектор экспрессии по п. 53, где Т-клетка представляет собой наивную Т-клетку, центральную Т-клетку памяти, стволовую Т-клетку памяти, эффекторную Т-клетку памяти или любую их комбинацию.

55. Вектор экспрессии по любому из пп. 50-54, представляющий собой вирусный вектор.

56. Вектор экспрессии по п. 55, где вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор или γ -ретровирусный вектор.

57. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая гетерологичный полинуклеотид по любому из пп. 43-49 и/или вектор экспрессии по любому из пп. 50-56, где рекомбинантная клетка-хозяин способна экспрессировать на своей клеточной поверхности кодируемый связывающий белок.

58. Рекомбинантная клетка-хозяин по п. 57, представляющая собой гематопозитическую клетку-предшественник или клетку иммунной системы человека.

59. Рекомбинантная клетка-хозяин по п. 58, где клетка иммунной системы представляет собой CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, CD4⁻ CD8⁻ двойную отрицательную Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, натуральную клетку-киллер, натуральную Т-клетку-киллер, макрофаг, дендритную клетку или любую их комбинацию.

60. Рекомбинантная клетка-хозяин по п. 58 или п. 59, где клетка иммунной системы представляет собой Т-клетку.

61. Рекомбинантная клетка-хозяин по п. 60, где Т-клетка представляет собой наивную Т-клетку, центральную Т-клетку памяти, стволовую Т-клетку памяти, эффекторную Т-клетку памяти или любую их комбинацию.

62. Рекомбинантная клетка-хозяин по любому из пп. 57-61, представляющая собой Т-клетку или НК-Т-клетку (НК - натуральный киллер), которая кодирует эндогенный TCR, где связывающий белок способен более эффективно связываться с белком CD3 по сравнению с эндогенным TCR.

63. Рекомбинантная клетка-хозяин по любому из пп. 57-62, где экспрессия Nur77 в клетке-хозяине увеличивается, когда клетка-хозяин находится в присутствии пептида Msln, связанного связывающим белком, в концентрации приблизительно 10^{-2} мкМ пептида, приблизительно 10^{-1} мкМ пептида, приблизительно 1 мкМ пептида или приблизительно 10^1 мкМ пептида, где пептид необязательно презентируван клетке-хозяину антигенпрезентирующей клеткой.

64. Рекомбинантная клетка-хозяин по любому из пп. 57-63, не продуцирующая IFN- γ и/или которая не проявляет активацию и/или цитотоксическую активность при контакте с клеткой, которая экспрессирует:

- (i) HLA-C6:02:01,
- (ii) HLA-B13:01:01 без HLA-B13:02:01,
- (iii) HLA-A3,
- (iv) HLA-A29,
- (v) HLA-B40,
- (vi) HLA-B44,
- (vii) HLA-C3,
- (viii) HLA-C16,
- (ix) HLA-A1,
- (x) HLA-24,
- (xi) HLA-B7,
- (xii) HLA-B57,
- (xiii) HLA-C7,
- (xiv) HLA-A11,
- (xv) HLA-B15,
- (xvi) HLA-C4,
- (xvii) HLA-C12,
- (xviii) HLA-B8,
- (xix) HLA-B49,
- (xx) HLA-B51,
- (xxi) HLA-C15,
- (xxii) HLA-A30,
- (xxiii) HLA-A68,
- (xxiv) HLA-C2,
- (xxv) HLA-A32,
- (xxvi) HLA-A33,
- (xxvii) HLA-B55,
- (xxviii) HLA-C1,
- (xxvix) HLA-C5,
- (xxix) HLA-B8,
- (xxx) HLA-B35, или
- (xxxi) любую комбинацию (i)-(xxx),

при условии, что пептид мезотелина, связанный кодируемым связывающим белком, отсутствует.

65. Рекомбинантная клетка-хозяин по любому из пп. 57-64, представляющая собой Т-клетку или НК-Т-клетку, которая кодирует эндогенный TCR, где связывающий белок, кодируемый гетерологичным полинуклеотидом, имеет более высокую экспрессию на клеточной поверхности по сравнению с эндогенным TCR.

66. Клеточная композиция, содержащая рекомбинантную клетку-хозяина по любому из пп. 57-65 и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

67. Однократная доза, содержащая рекомбинантную клетку-хозяина по любому из пп. 57-65 или композицию по п. 66.

68. Способ лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией и/или активностью мезотелина, у субъекта, включающий:

введение субъекту эффективного количества связывающего белка по любому из пп. 1-41, рекомбинантной клетки-хозяина по любому из пп. 57-65, композиции по п. 66 или однократной дозы по п. 67.

69. Способ по п. 68, где заболевание или расстройство, связанное с экспрессией и/или активностью мезотелина, представляет собой гиперпролиферативное заболевание или пролиферативное заболевание.

70. Способ по п. 68 или п. 69, где заболевание или расстройство, связанное с экспрессией и/или активностью мезотелина, представляет собой рак.

71. Способ по п. 70, где рак представляет собой солидный рак или гематологическое злокачественное новообразование.

72. Способ по п. 70 или п. 71, где рак включает рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, карциному костей и мягких тканей, опухоль головного мозга, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, колоректальную аденокарциному, колоректальный рак, десмоидную опухоль, эмбриональный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, аденокарциному желудка, мультиформную глиобластому, гинекологическую опухоль, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак печени, рак легких, мезотелиому, злокачественную меланому, остеосаркому, рак яичников, рак поджелудочной железы, аденокарциному протоков поджелудочной железы, первичную астроцитарную опухоль, первичный рак щитовидной железы, рак предстательной железы, рак почек, почечно-клеточную карциному, рабдомиосаркому, рак кожи, саркому мягких тканей, опухоль половых клеток яичка, уротелиальный рак, саркому матки или рак матки.

73. Способ по п. 70 или п. 71, где рак включает рак поджелудочной железы, рак яичников, рак молочной железы, рак желудка, колоректальный рак, мезотелиому или рак легких.

74. Способ по любому из пп. 68-73, где связывающий белок, клетку-хозяина, композицию или однократную дозу вводят парентерально или внутривенно.

75. Способ по любому из пп. 68-74, включающий введение субъекту множества доз связывающего белка, клетки-хозяина, композиции или однократной дозы.

76. Способ по п. 75, где множество доз вводят с интервалами между введениями от приблизительно двух до приблизительно четырех недель.

77. Способ по любому из пп. 68-76, дополнительно включающий введение цитокина субъекту.

78. Способ по п. 77, где цитокин включает IL-2, IL-15, IL-21 или любую их комбинацию.

79. Способ по п. 78, где субъект дополнительно получает или получал ингибитор иммунных контрольных точек, агонист агента, стимулирующего иммунную контрольную точку, лучевую терапию, антитело, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок Fc, антисмысловую нуклеотидную терапию, генную терапию, вакцину, хирургическое вмешательство, химиотерапию или любую их комбинацию.

80. Связывающий белок по любому из пп. 1-41, композиция по п. 42, полинуклеотид по любому из пп. 43-49, вектор экспрессии по любому из пп. 50-56, рекомбинантная клетка-хозяин по любому из пп. 57-65, клеточная композиция по п. 66 или однократная доза по п. 67 для применения для лечения заболевания или расстройства, характеризующегося экспрессией и/или активностью мезотелина.

81. Связывающий белок по любому из пп. 1-41, композиция по п. 42, полинуклеотид по любому из пп. 43-49, вектор экспрессии по любому из пп. 50-56, рекомбинантная клетка-хозяин по любому из пп. 57-65, клеточная композиция по п. 66 или однократная доза по п. 67 для применения в адоптивной иммунотерапии заболевания или расстройства, характеризующегося экспрессией и/или активностью мезотелина.

82. Связывающий белок по любому из пп. 1-41, композиция по п. 42, полинуклеотид по любому из пп. 43-49, вектор экспрессии по любому из пп. 50-56, рекомбинантная клетка-хозяин по любому из пп. 57-65, клеточная композиция по п. 66 или однократная доза по п. 67 для применения для получения лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, характеризующегося экспрессией и/или активностью мезотелина.

83. Связывающий белок, композиция, полинуклеотид, вектор экспрессии, рекомбинантная клетка-хозяин, клеточная композиция или однократная доза для применения по любому из пп. 80-82, где заболевание или расстройство, характеризующееся экспрессией и/или активностью мезотелина, представляет собой мезотелиому, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак легких, рак, при котором пептид Msln₂₀₋₂₈ экспрессируется на опухолевой клетке указанного злокачественного образования, или рак, при котором пептид Msln₅₃₀₋₅₃₈ экспрессируется на опухолевой клетке указанного злокачественного образования.

84. Связывающий белок, композиция, полинуклеотид, вектор экспрессии, рекомбинантная клетка-хозяин, клеточная композиция или однократная доза для применения по любому из пп. 80-83, где заболевание или расстройство, характеризующееся экспрессией и/или активностью мезотелина, представляет собой рак поджелудочной железы, рак яичников, рак молочной железы, рак желудка, колоректальный рак, мезотелиому или рак легких.

85. Выделенный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, способный специфически связываться с комплексом SEQ ID NO: 32:HLA-A:02*01, где полинуклеотид содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 120.

86. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п. 85, функционально связанный с последовательностью контроля экспрессии.

87. Вектор экспрессии по п. 86, способный доставлять полинуклеотид в клетку-хозяина.

88. Вектор экспрессии по п. 87, где клетка-хозяин представляет собой гематопозитическую клетку-предшественник или клетку иммунной системы человека.

89. Вектор экспрессии по п. 88, где клетка иммунной системы представляет собой CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, CD4⁻ CD8⁻ двойную отрицательную Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, натуральную клетку-киллер, натуральную Т-клетку-киллер, макрофаг, дендритную клетку или любую их комбинацию.

90. Вектор экспрессии по п. 89, где Т-клетка представляет собой наивную Т-клетку, центральную Т-клетку памяти, стволовую Т-клетку памяти, эффекторную Т-клетку памяти или любую их комбинацию.

91. Вектор экспрессии по любому из пп. 86-90, представляющий собой вирусный вектор.

92. Вектор экспрессии по п. 91, где вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор или γ -ретровирусный вектор.

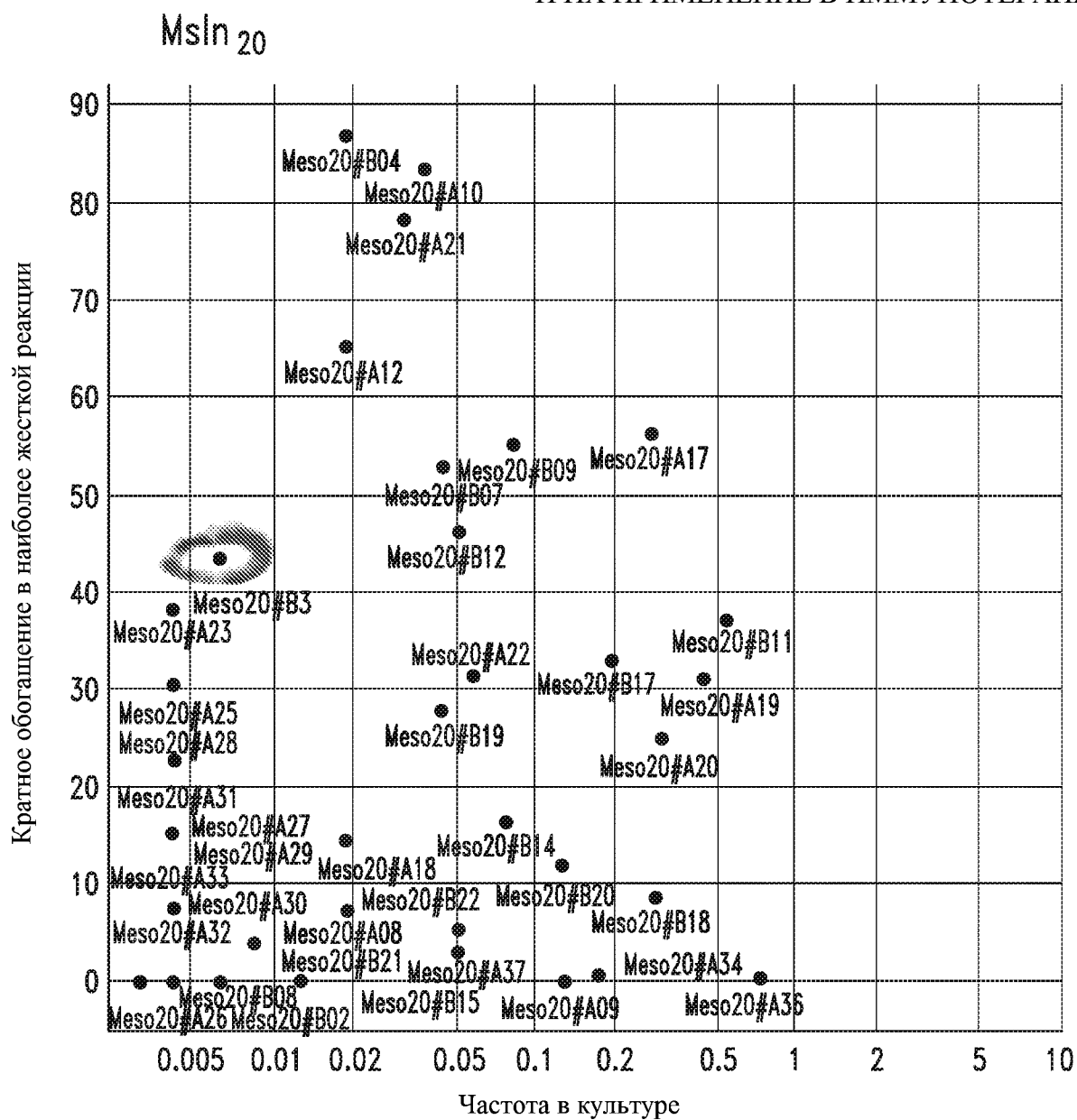
93. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 85 и/или вектор экспрессии по любому из пп. 86-92, которая способна экспрессировать на своей клеточной поверхности кодируемый связывающий белок.

94. Рекомбинантная клетка-хозяин по п. 83, представляющая собой гематопозитическую клетку-предшественник или клетку иммунной системы человека.

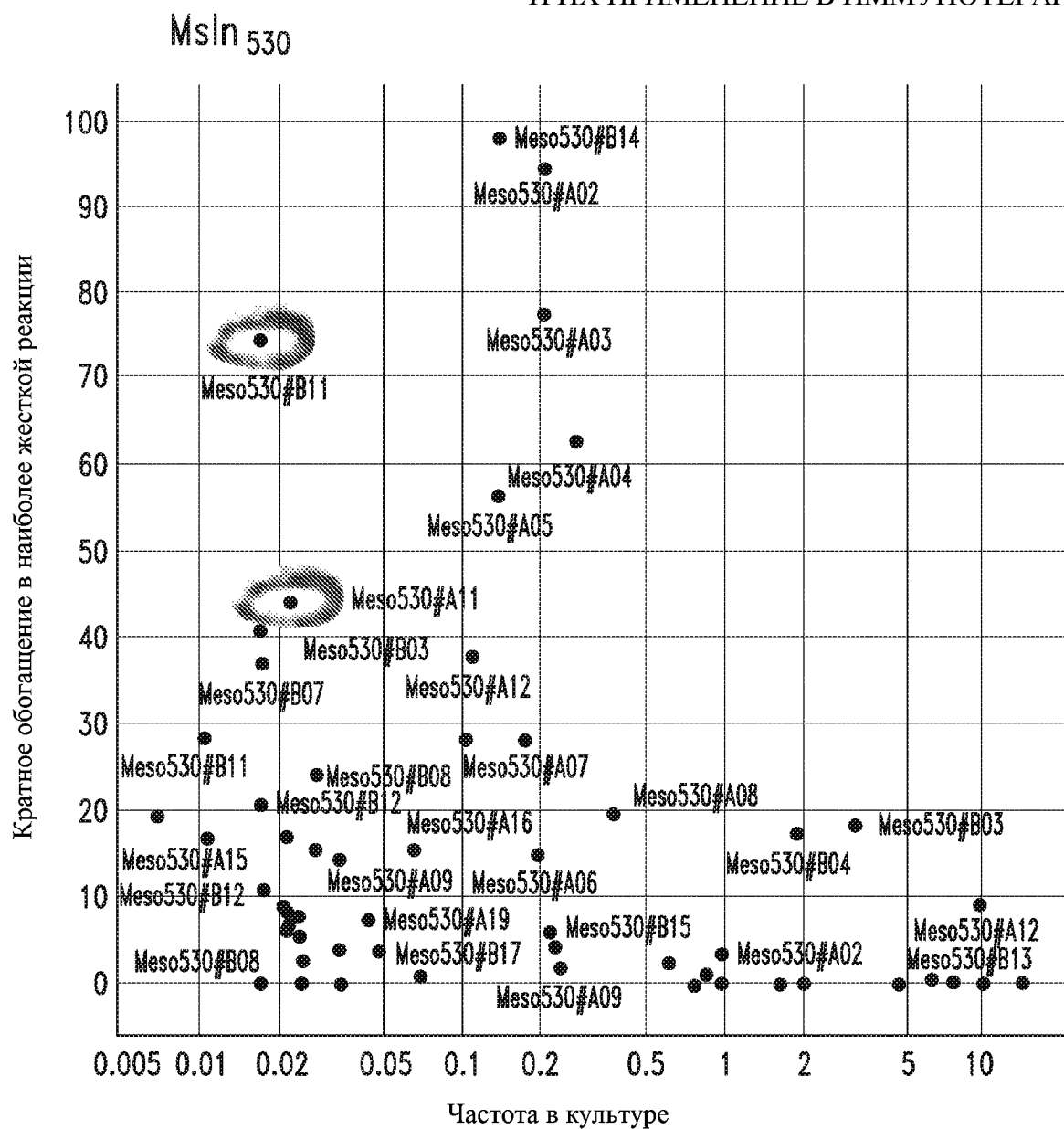
95. Рекомбинантная клетка-хозяин по п. 94, где клетка иммунной системы представляет собой CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, CD4⁻ CD8⁻ двойную отрицательную Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, натуральную клетку-киллер, натуральную Т-клетку-киллер, макрофаг, дендритную клетку или любую их комбинацию.

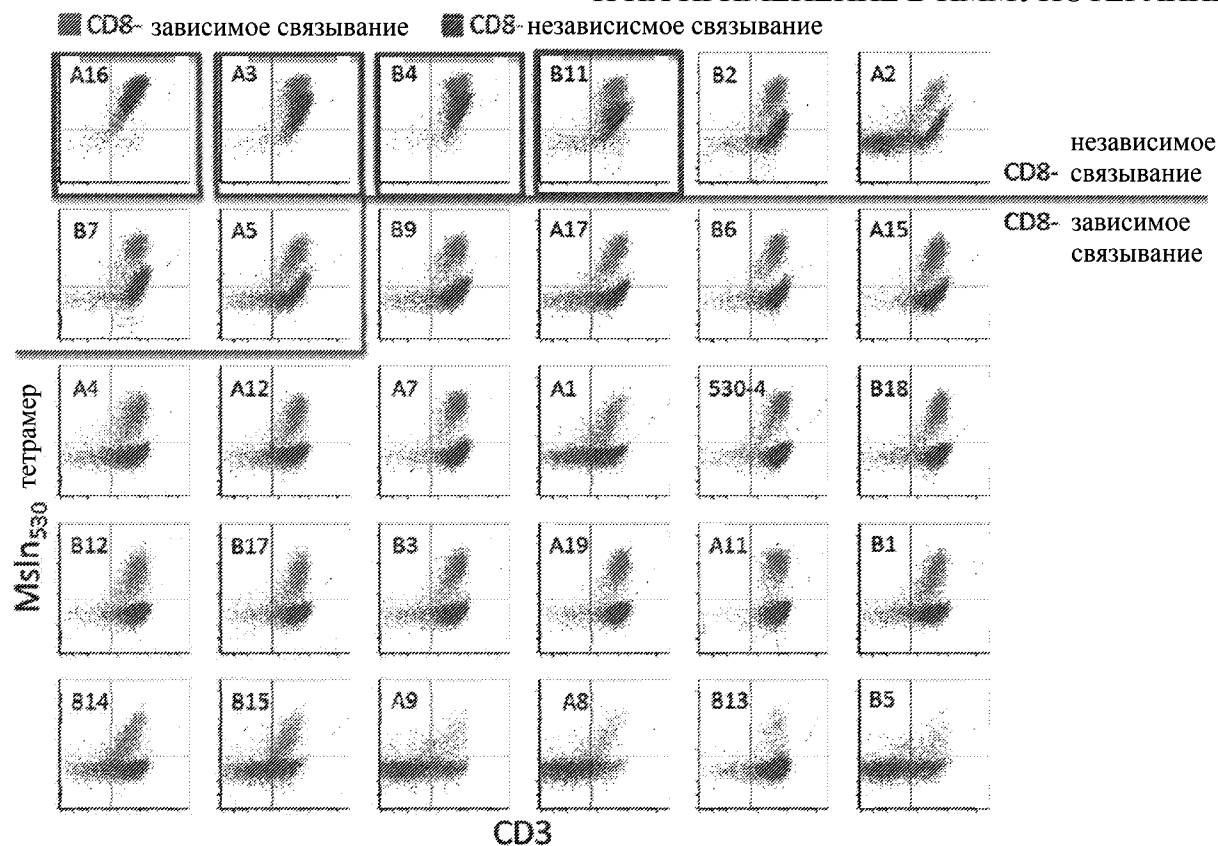
96. Рекомбинантная клетка-хозяин по п. 94 или п. 95, где клетка иммунной системы представляет собой Т-клетку.

97. Рекомбинантная клетка-хозяин по п. 96, где Т-клетка представляет собой наивную Т-клетку, центральную Т-клетку памяти, стволовую Т-клетку памяти, эффекторную Т-клетку памяти или любую их комбинацию.



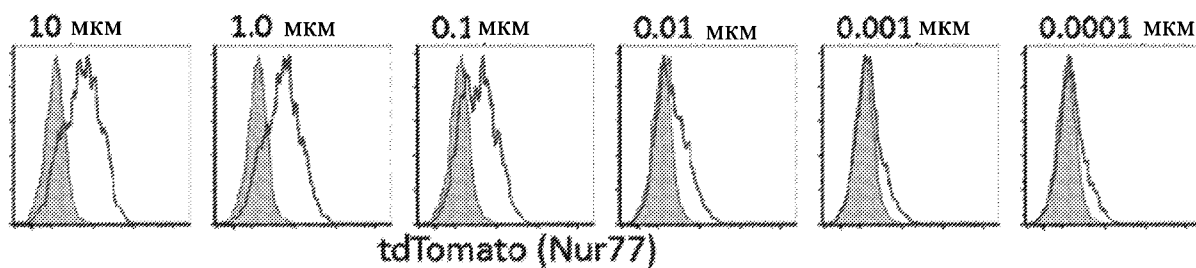
Фиг. 1А



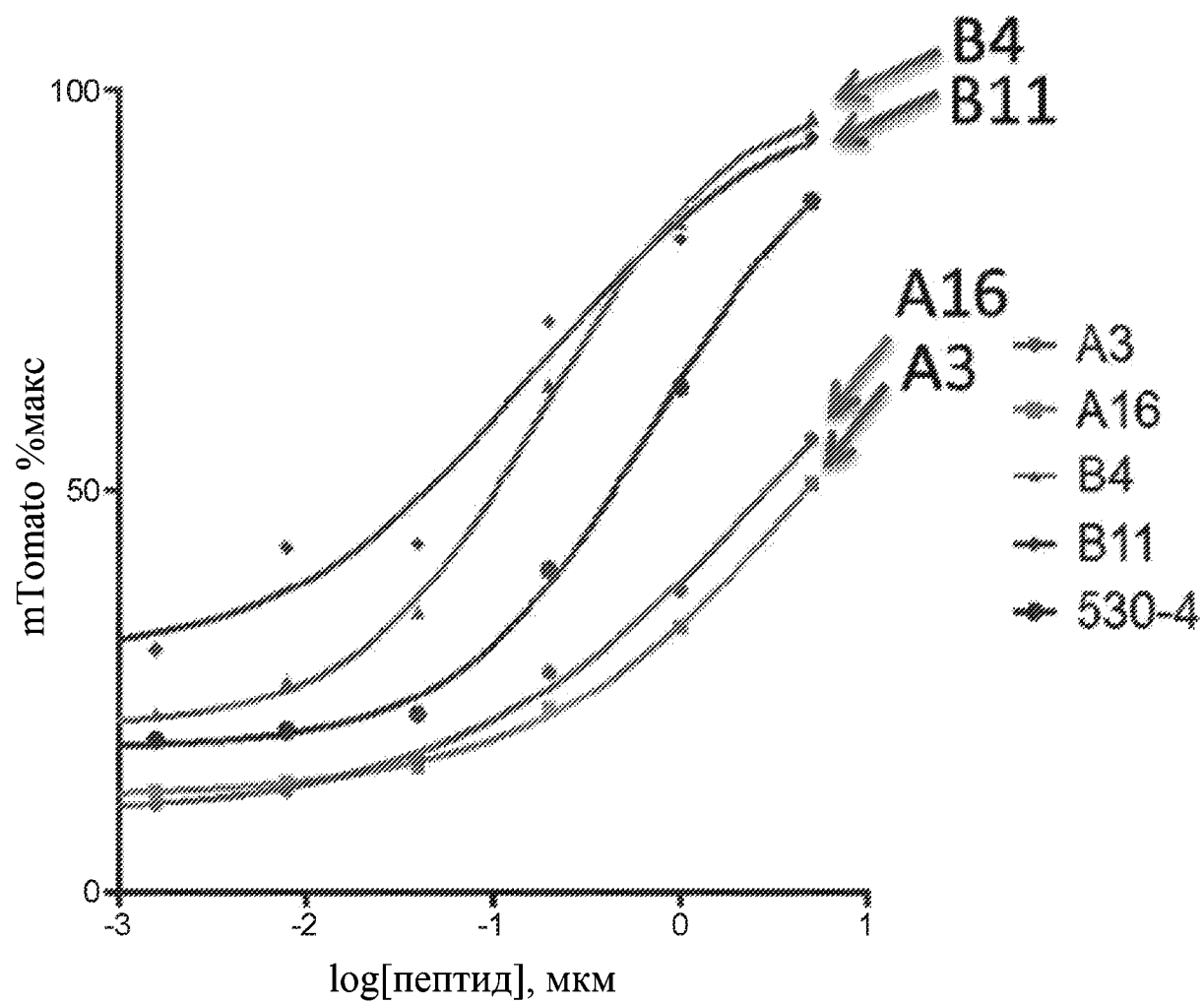


Фиг. 2

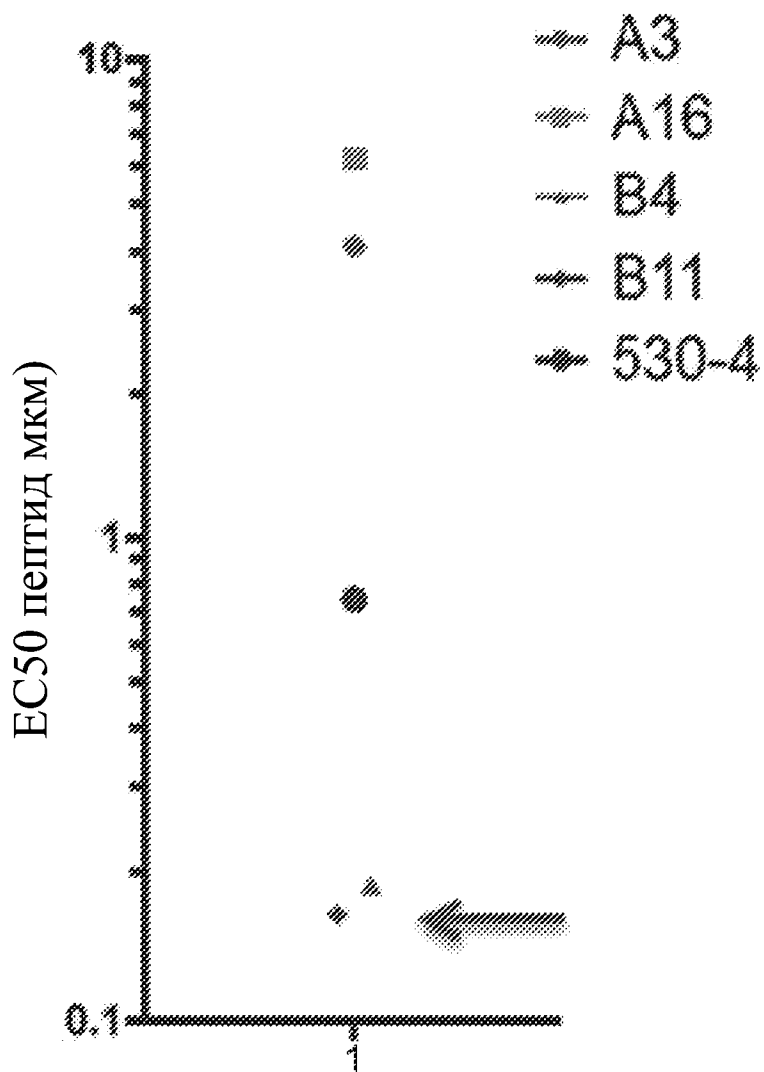
Концентрация пептида, активирующего T2 клетки-мишени



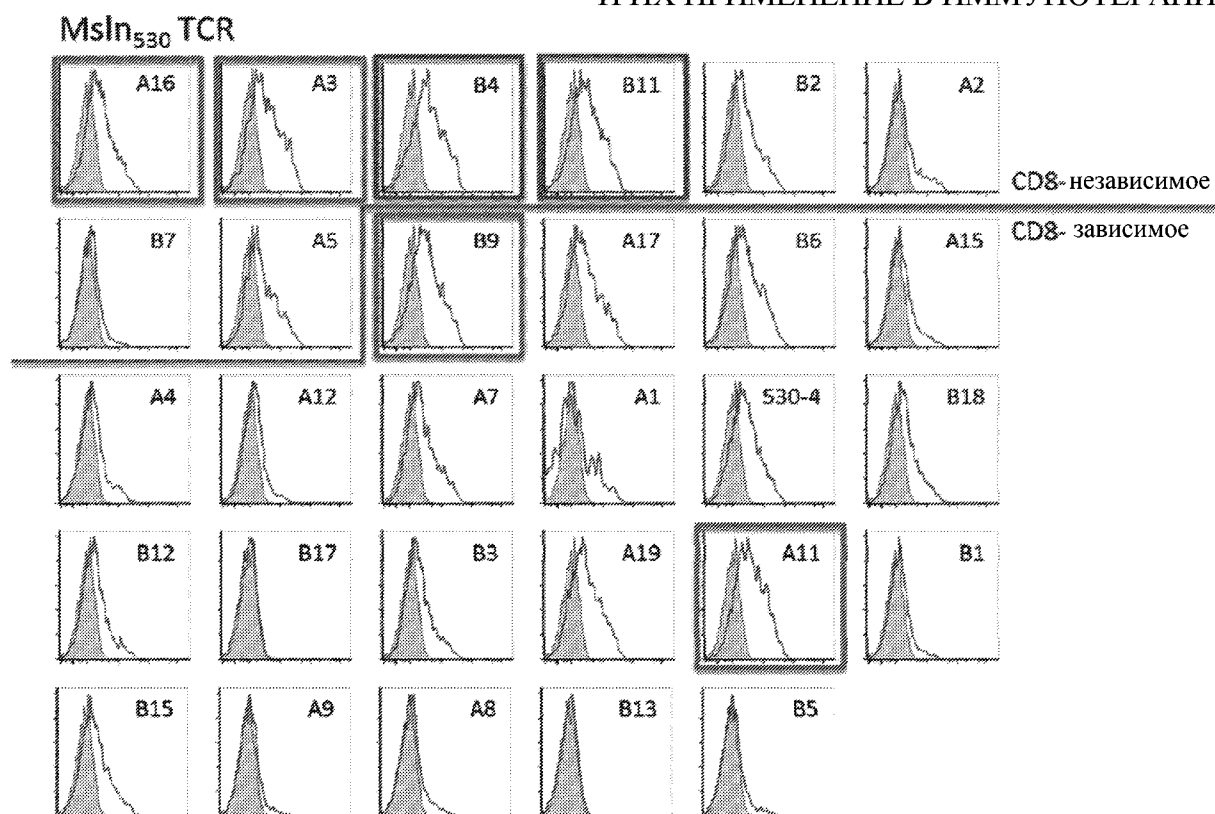
Фиг.3А



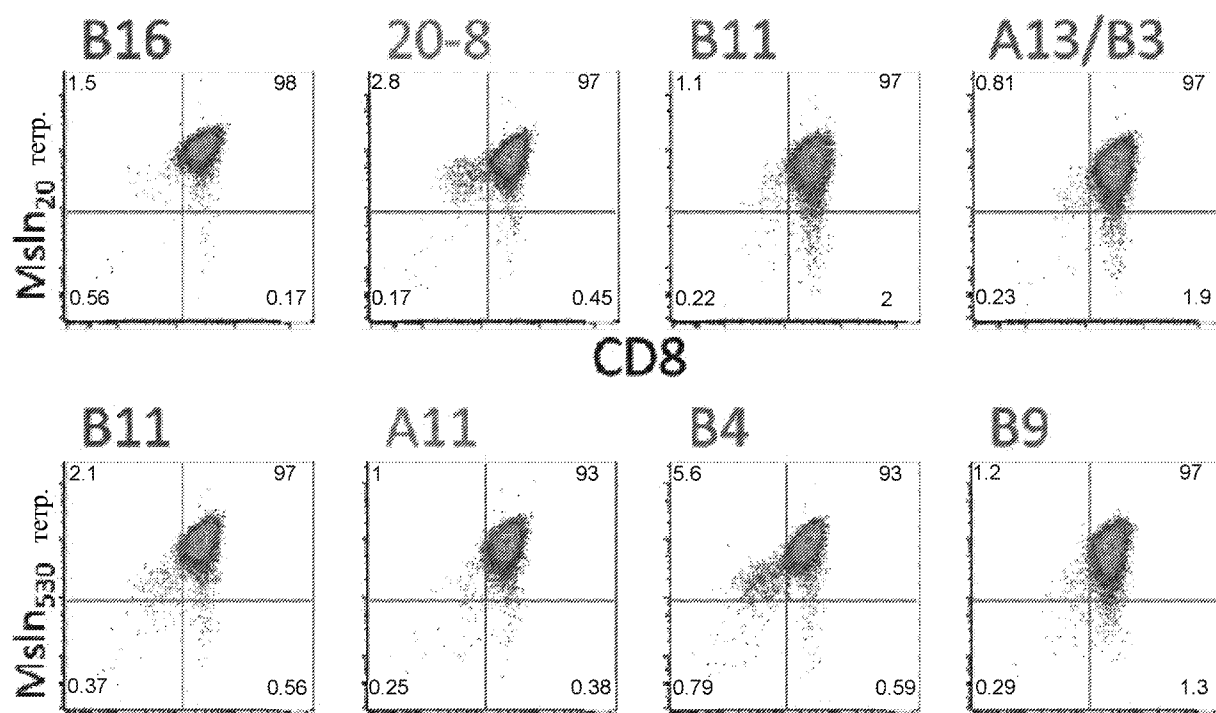
Фиг. 3В



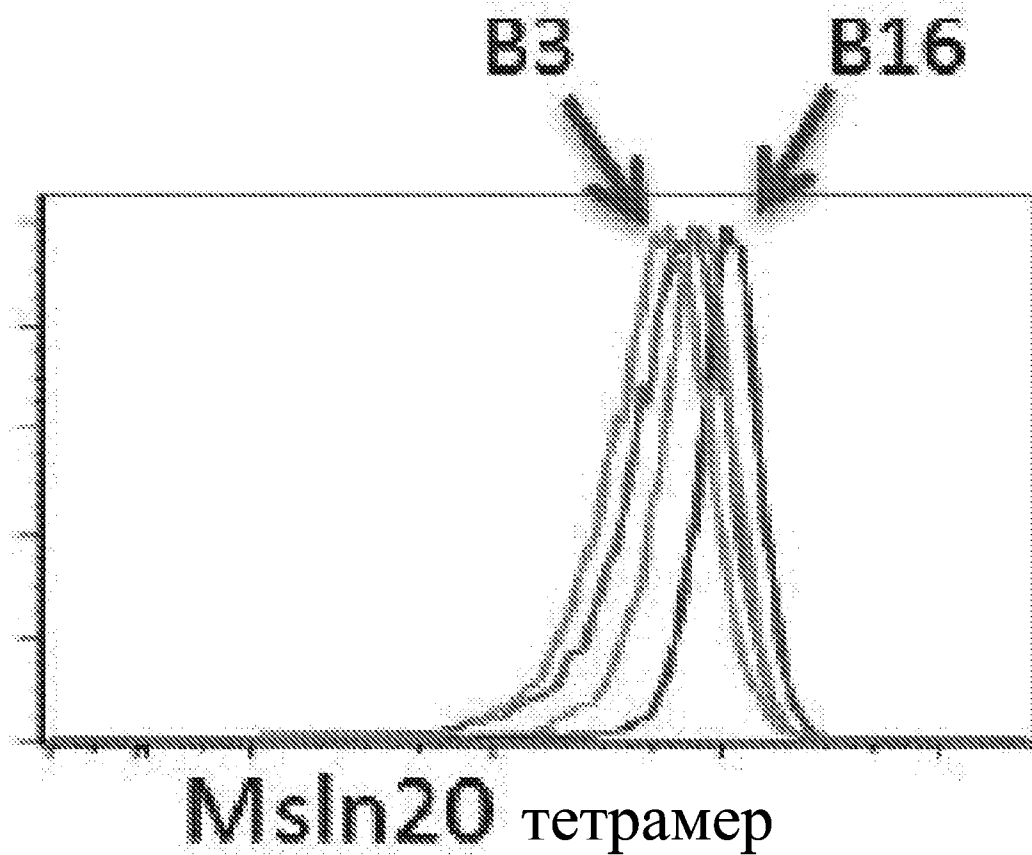
Фиг. 3С



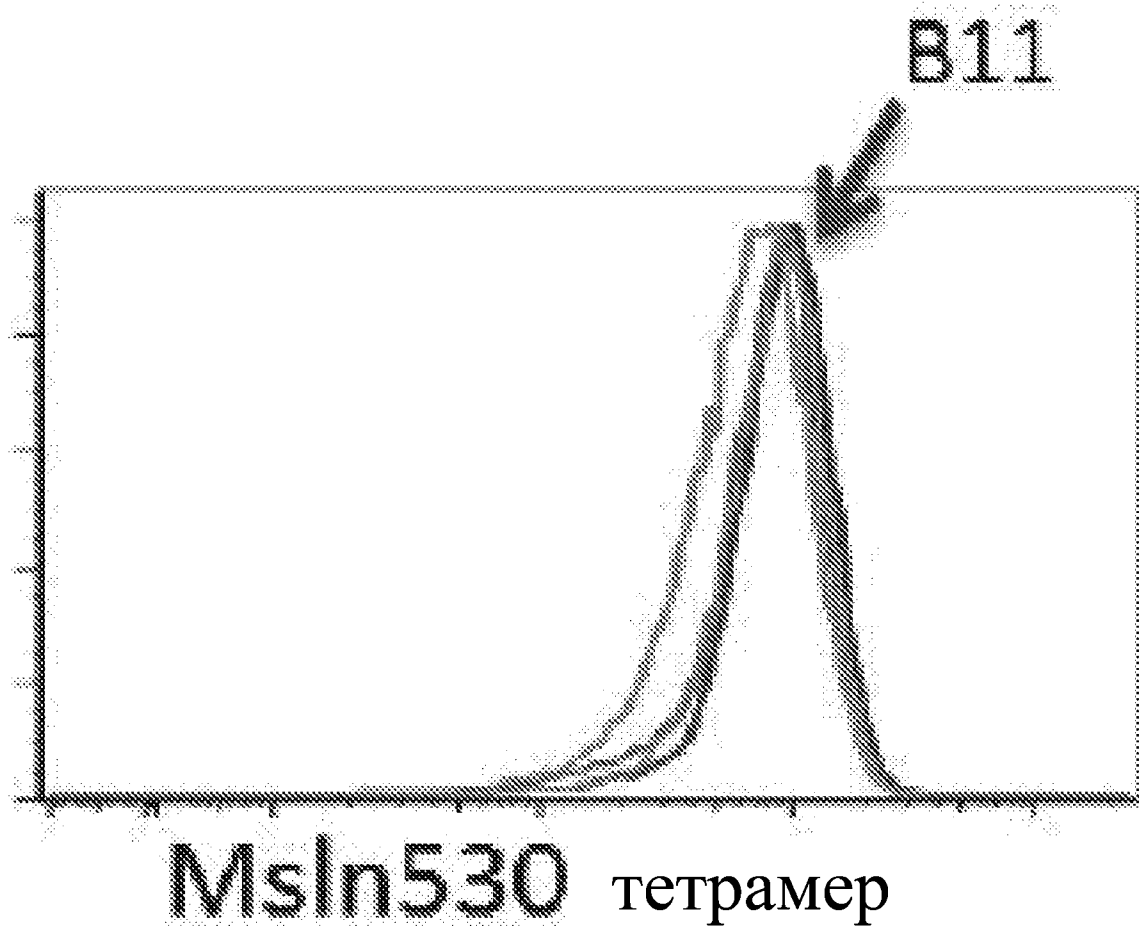
Фиг. 4



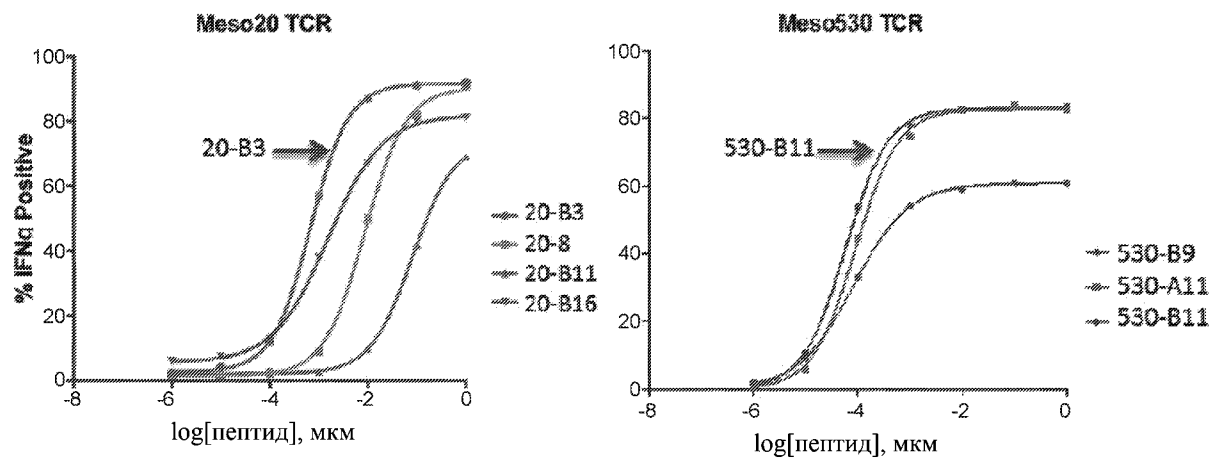
Фиг. 5А



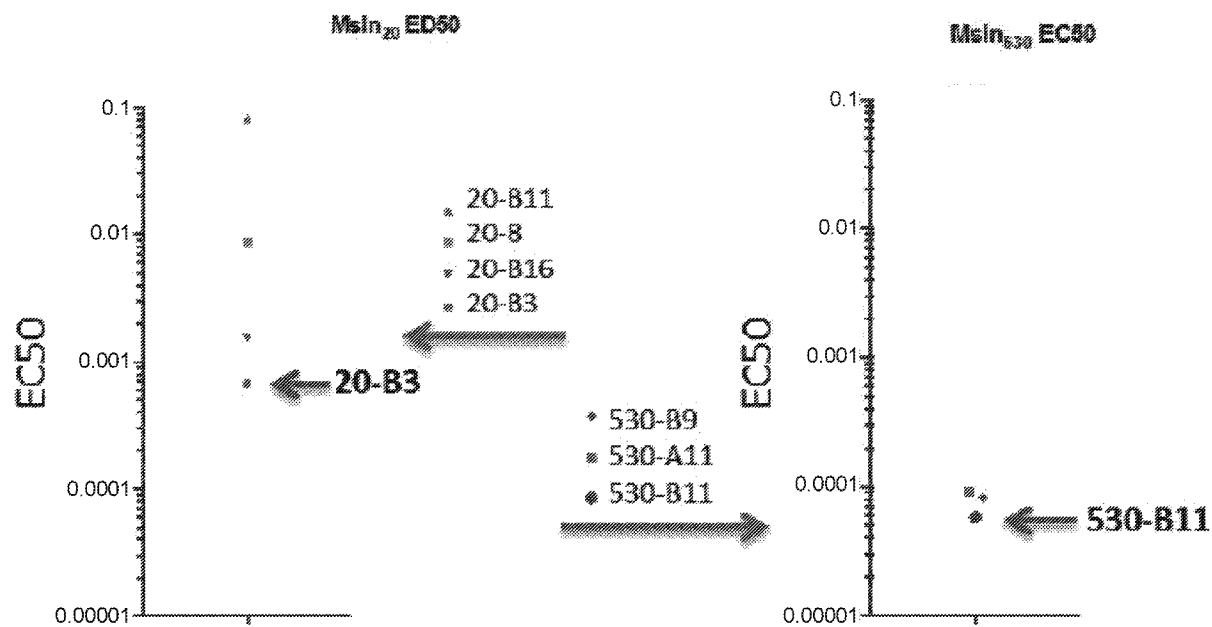
Фиг. 5В



Фиг. 5С

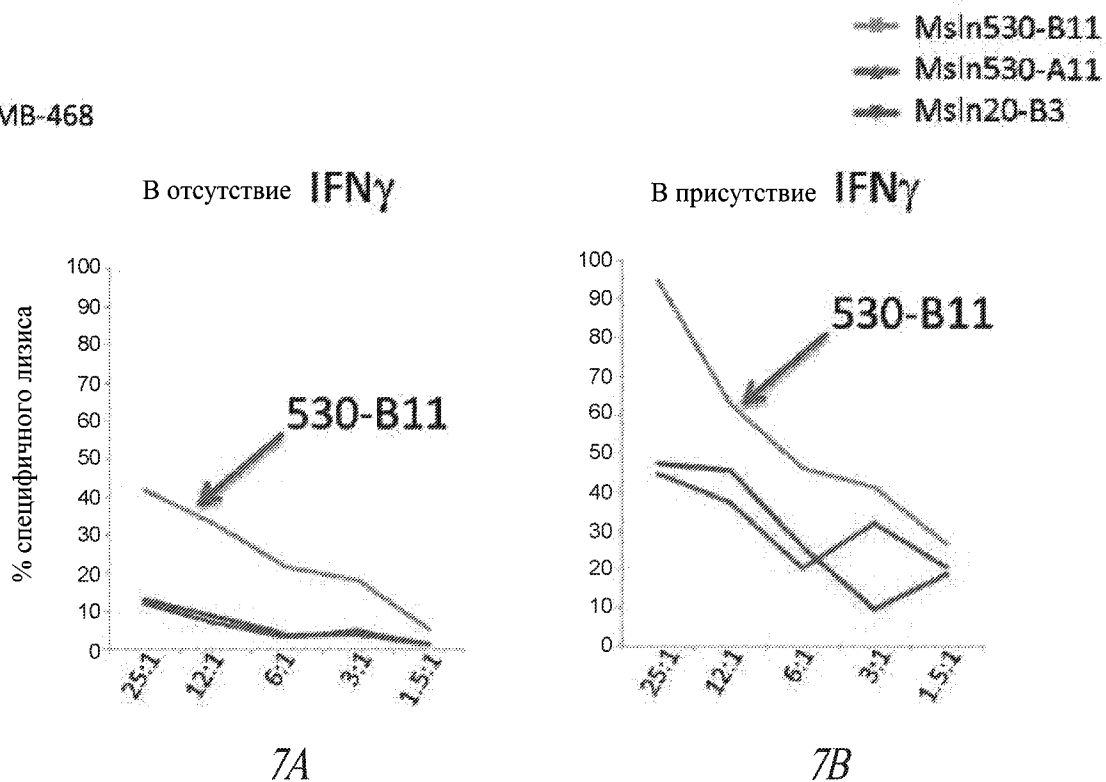


Фиг. 6А-6В



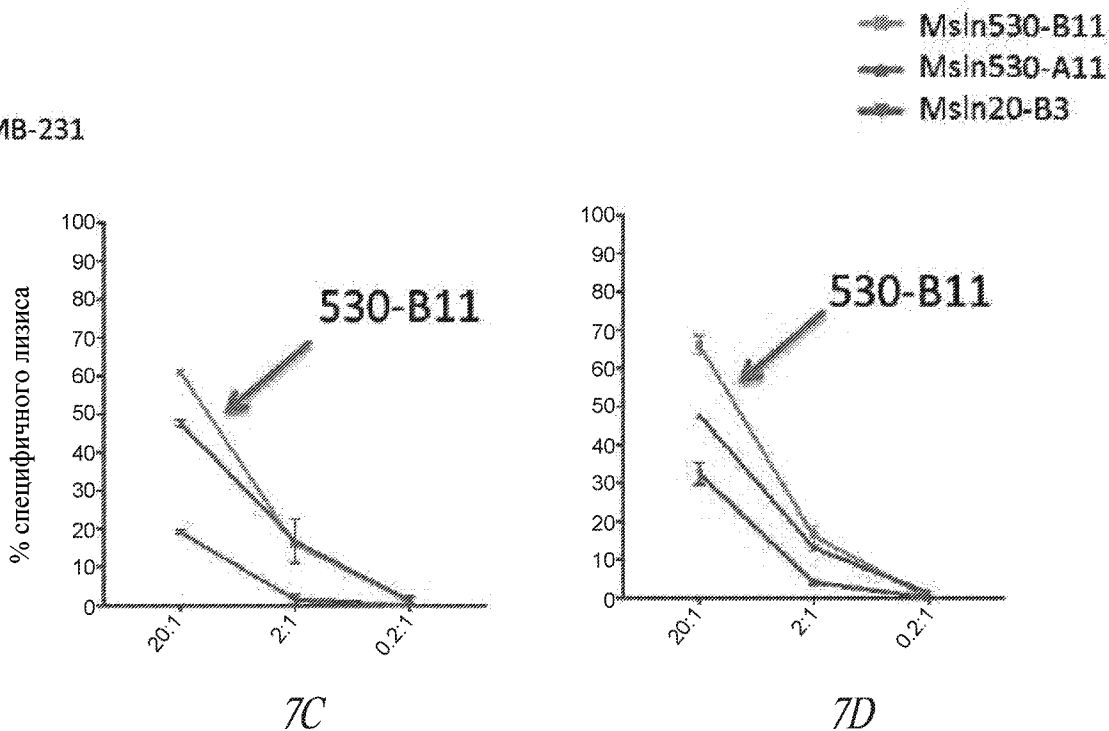
Фиг. 6С

MDA-MB-468

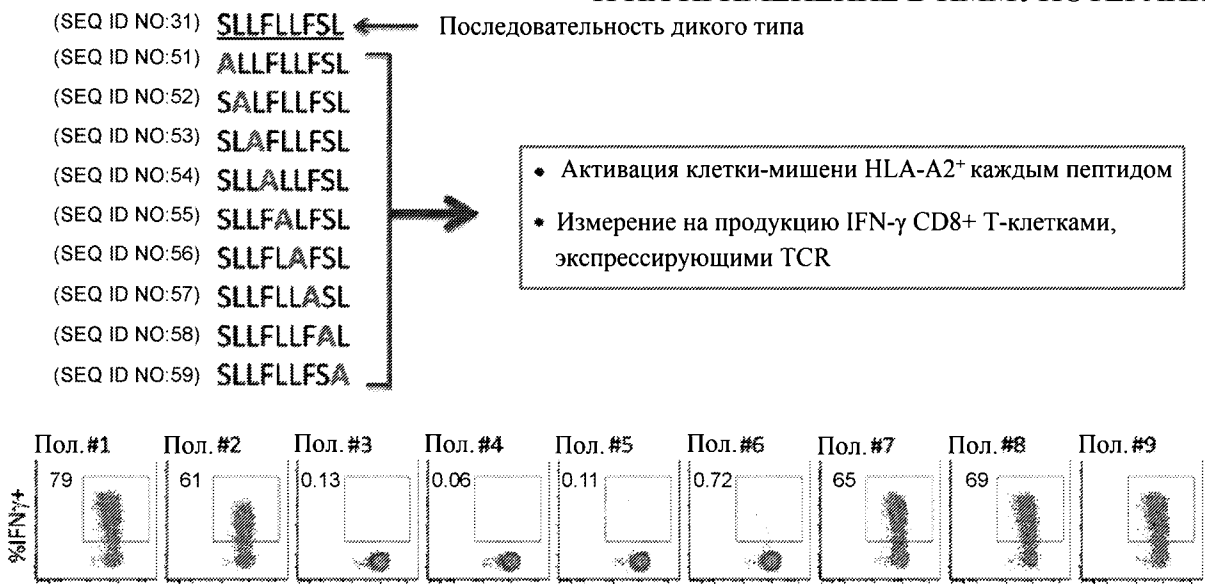


Фиг. 7A-7B

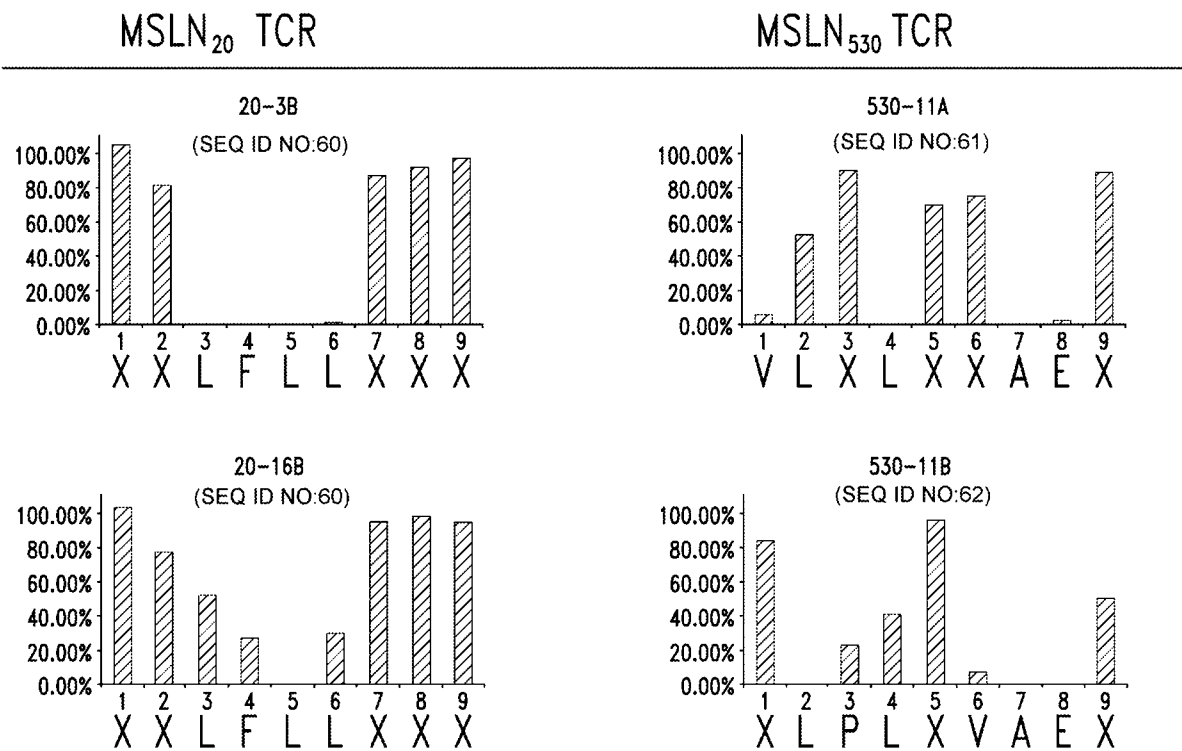
MDA-MB-231

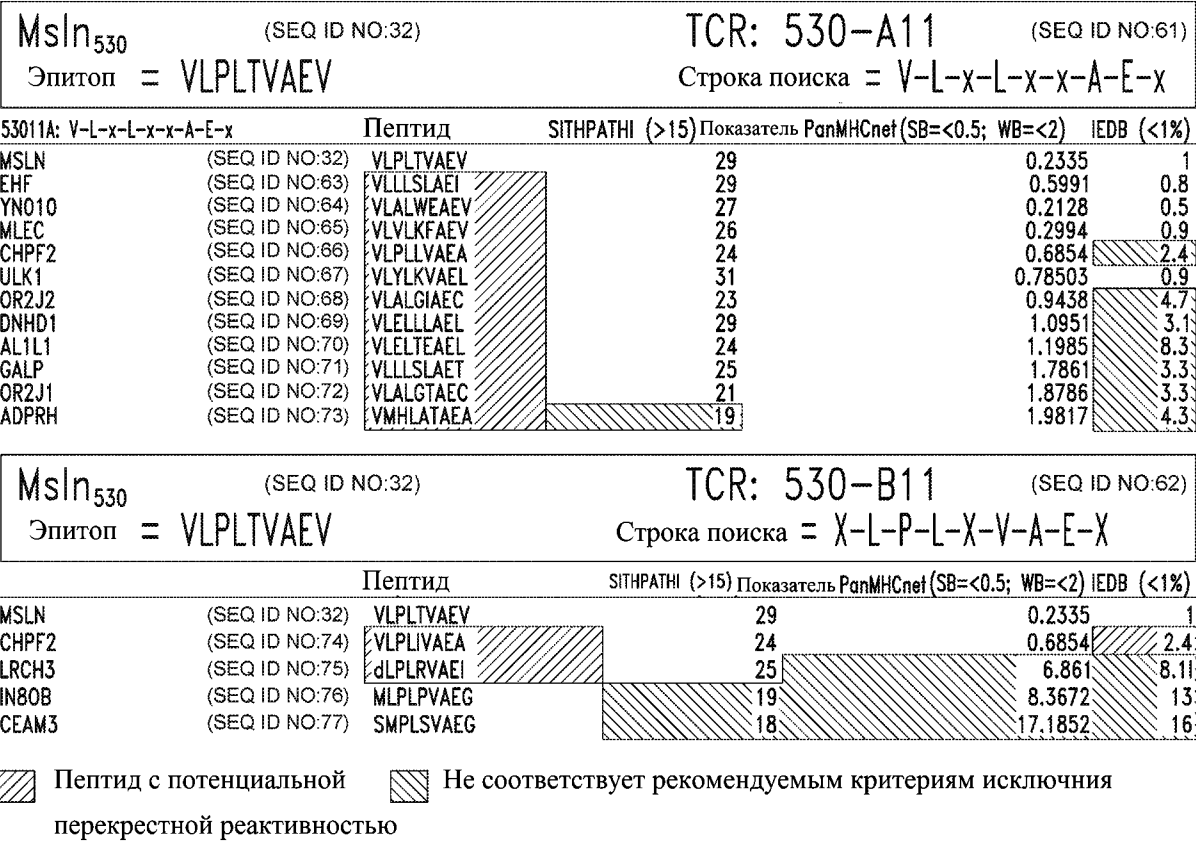


Фиг. 7C-7D

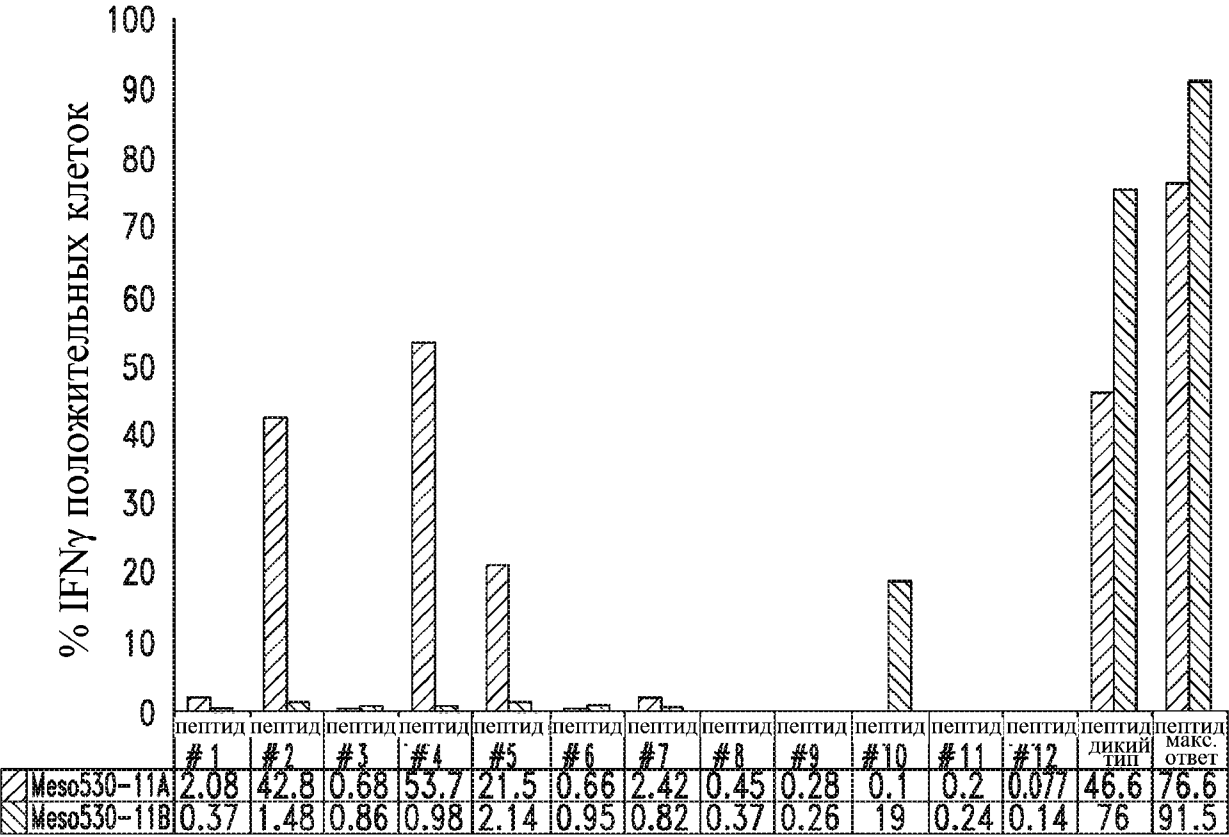


Фиг. 8

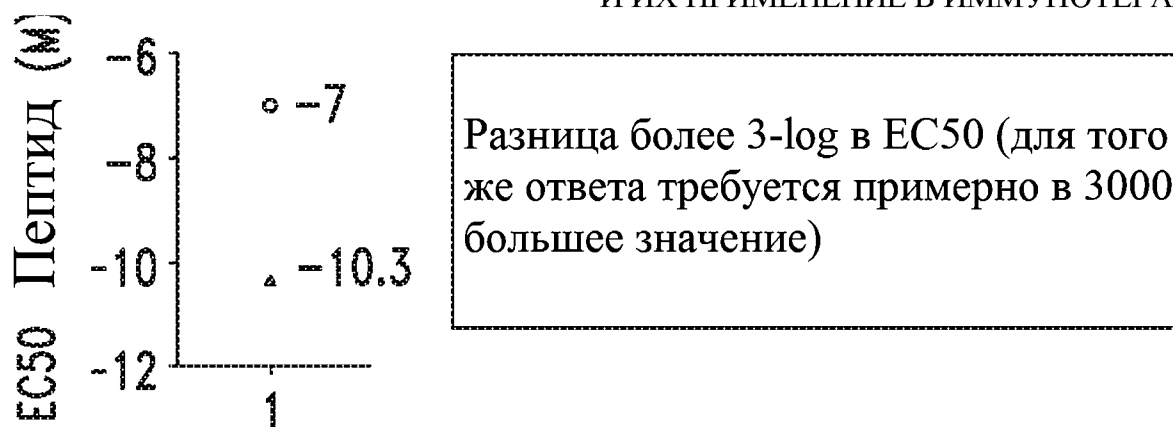




Фиг. 10



Фиг. 11A

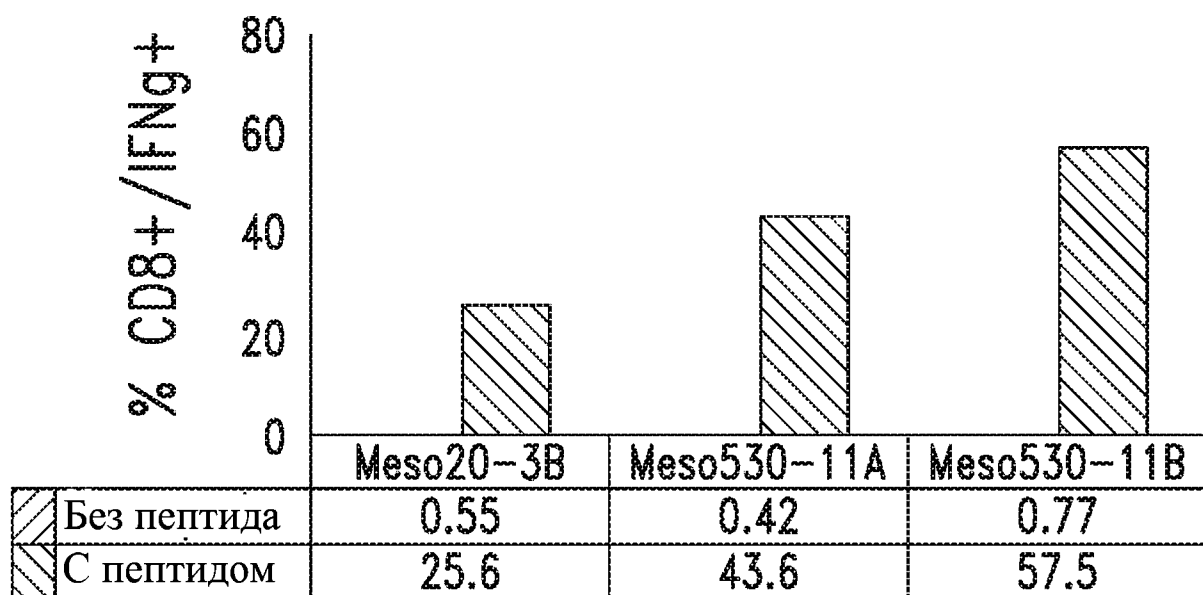


Фиг. 11 В

Обозн. (Бел.)	HLA-A	HLA-B	HLA-Cw
DAH #2 (956)	A1,A2	B7,B15	C1,C7
DMJ (1334)	A2,A2	B44,B44	C5,C7
FGA (1334)	A2,A30	B7,B44	C7,C7
GWB (956)	A2,A11	B15,B44	C3,C5
JAS (956)	A1,A68	B44,B55	C3,C5
JRL #2 (956)	A1,A2	B8,B55	C3,C7
JWP (TN)	A2,A33	B7,B15	C3,C7
SING (ND)	A24,A32	B35,B40	C2,C4

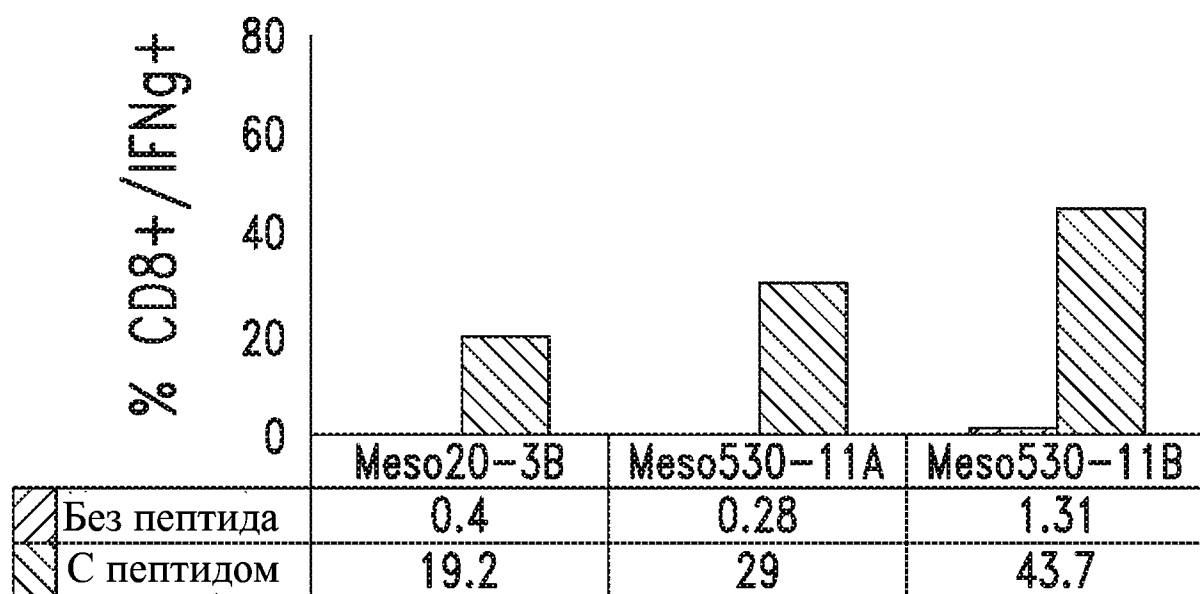
Фиг. 12А

Клеточная линия LCL JWP (TN)



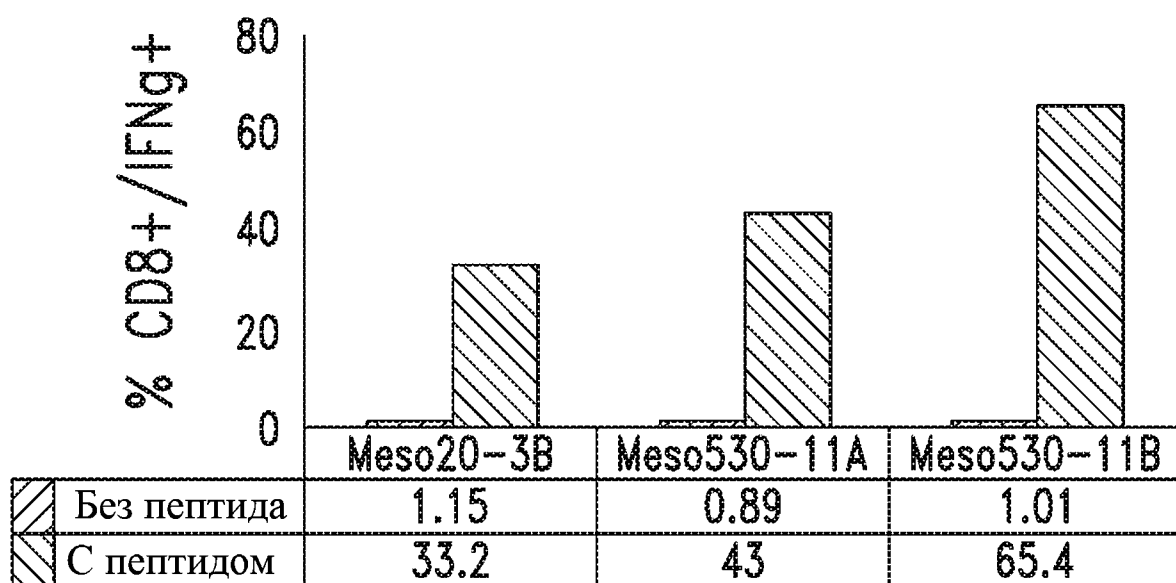
Фиг. 12В

Клеточная линия LCL SING (ND)



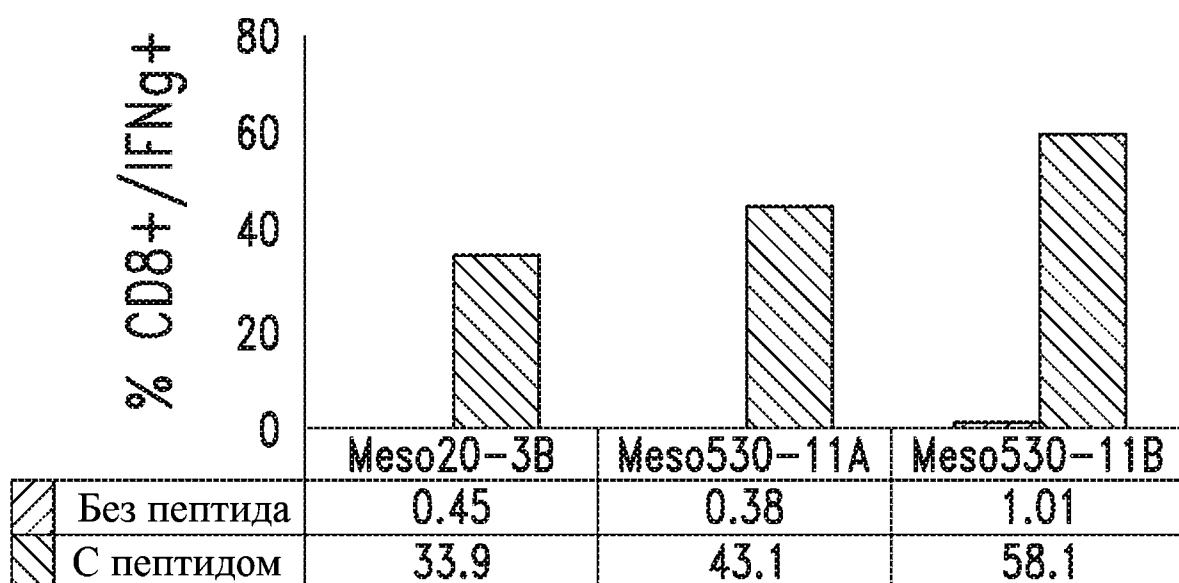
Фиг. 12С

Клеточная линия LCL ДАН#2 (956)



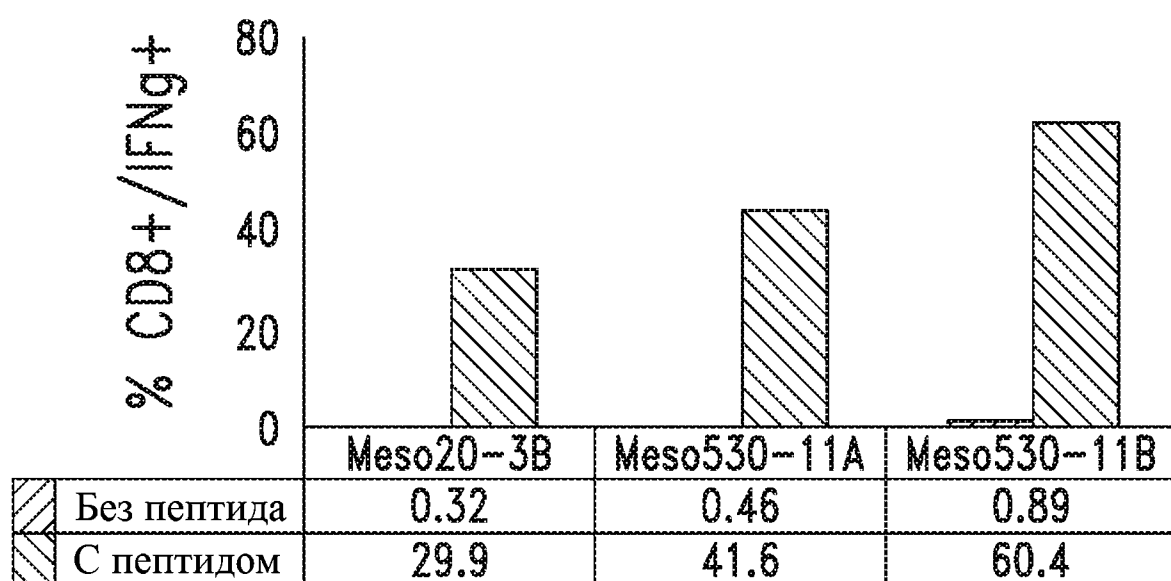
Фиг. 12D

Клеточная линия LCL DMJ (1334)



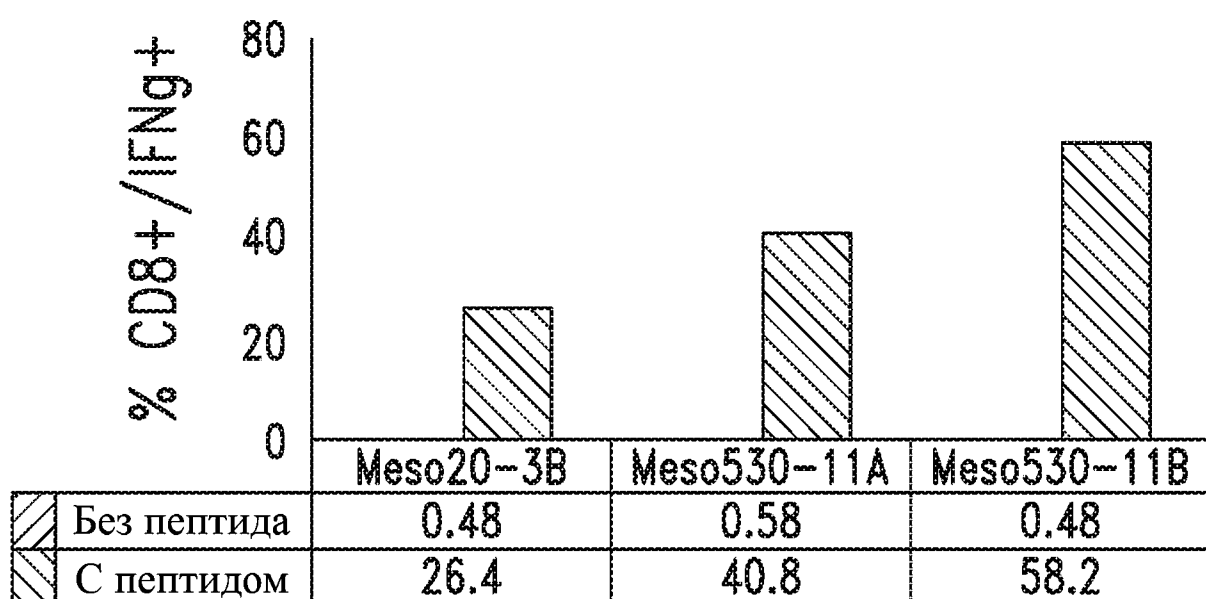
Фиг. 12E

Клеточная линия LCL FGA (1334)



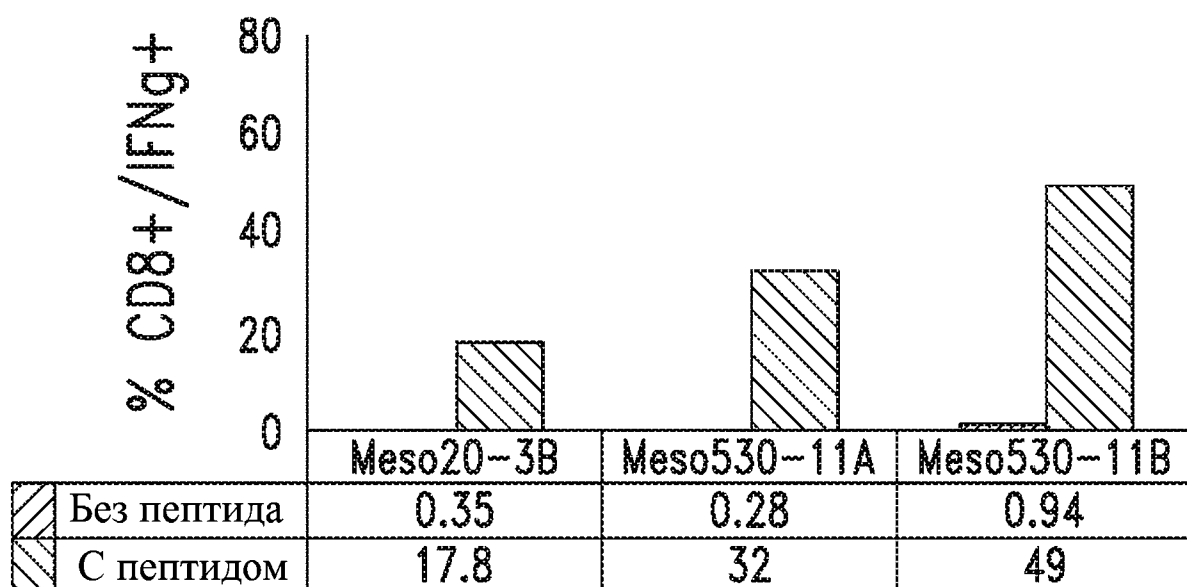
Фиг. 12F

Клеточная линия LCL GWB (956)



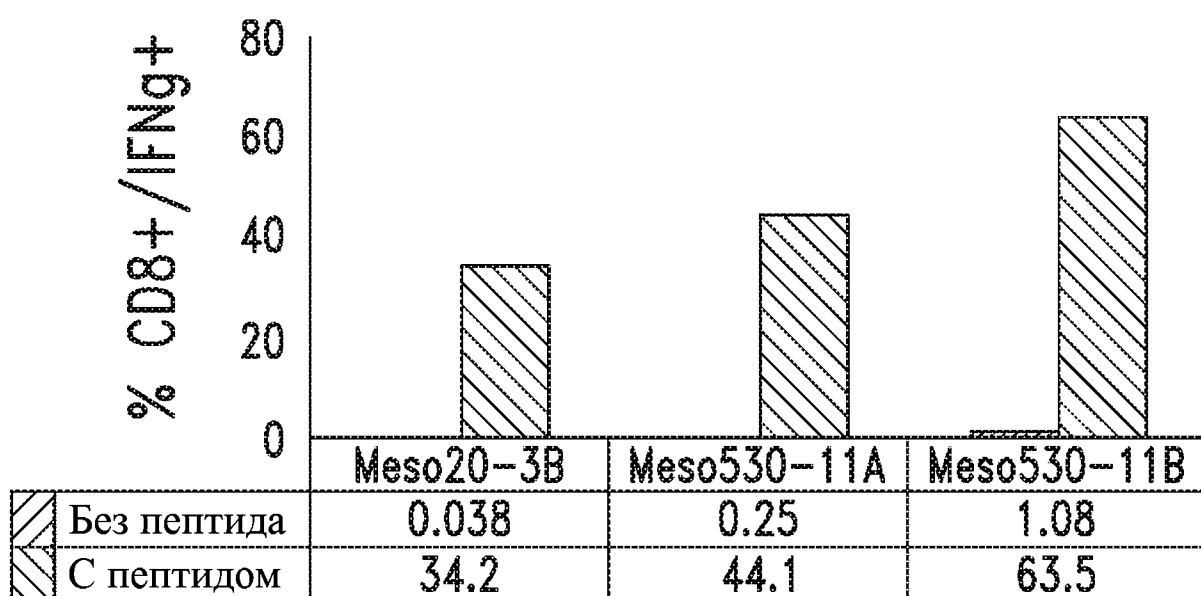
Фиг. 12G

Клеточная линия LCL JAS (956)



Фиг. 12H

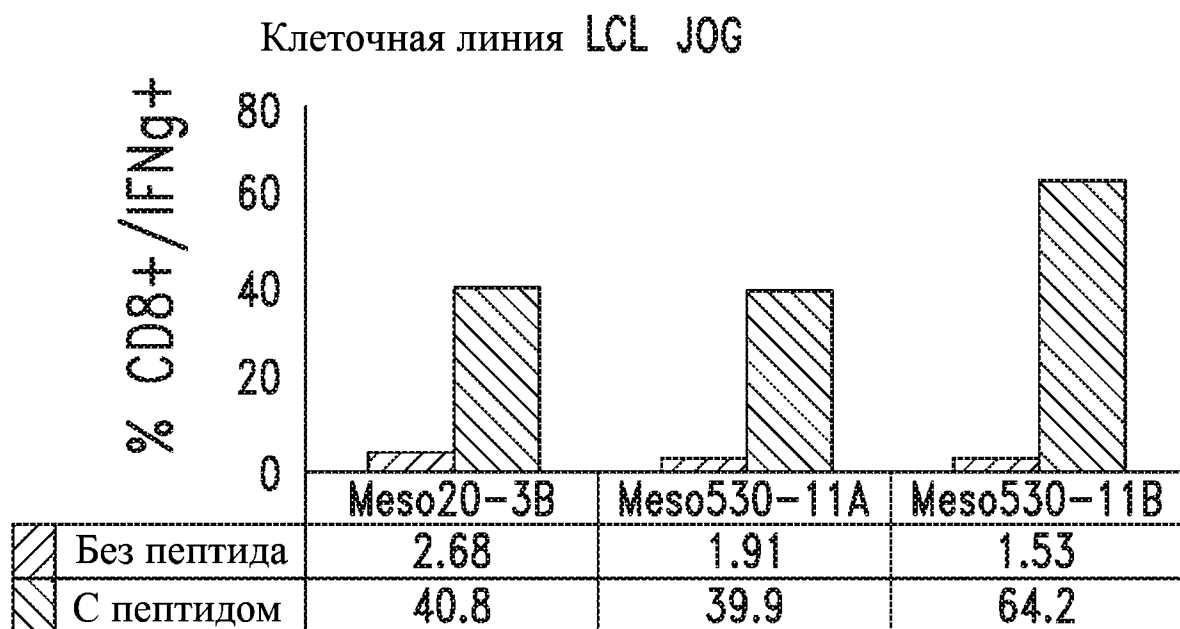
Клеточная линия LCL JRL#2 (956)



Фиг. 12I

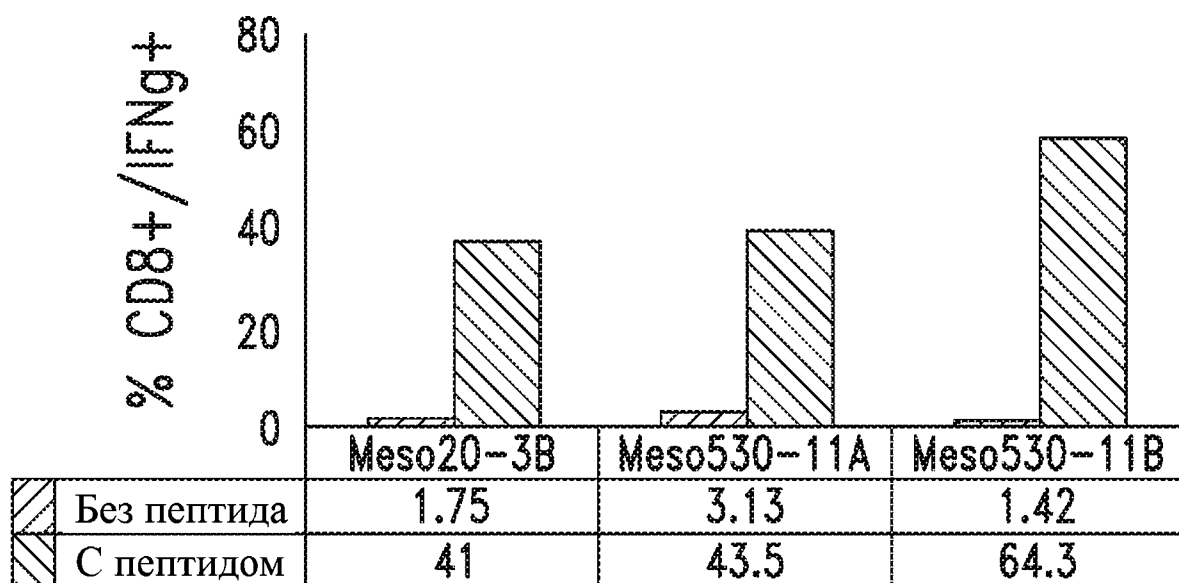
Обозн. (Бел.)	HLA-A	HLA-B	HLA-Cw
→ FAN	A3, A68	B13:02:01, B40	C2, C6:02:01
CLP	A2, A3	B40, B51	C3, C15
JOG	A3, A29	B40, B44	C3, C16
MS	A11, A11	B13:01:01, B15	C4, C12
→ GIM	A2, A30	B7, B13:02:01	C6:02:01, C7
MDS	A1, A24	B7, B57	C6:02:01, C7
PAJ	A1, A3	B8, B49	C7, C7

Фиг. 13А



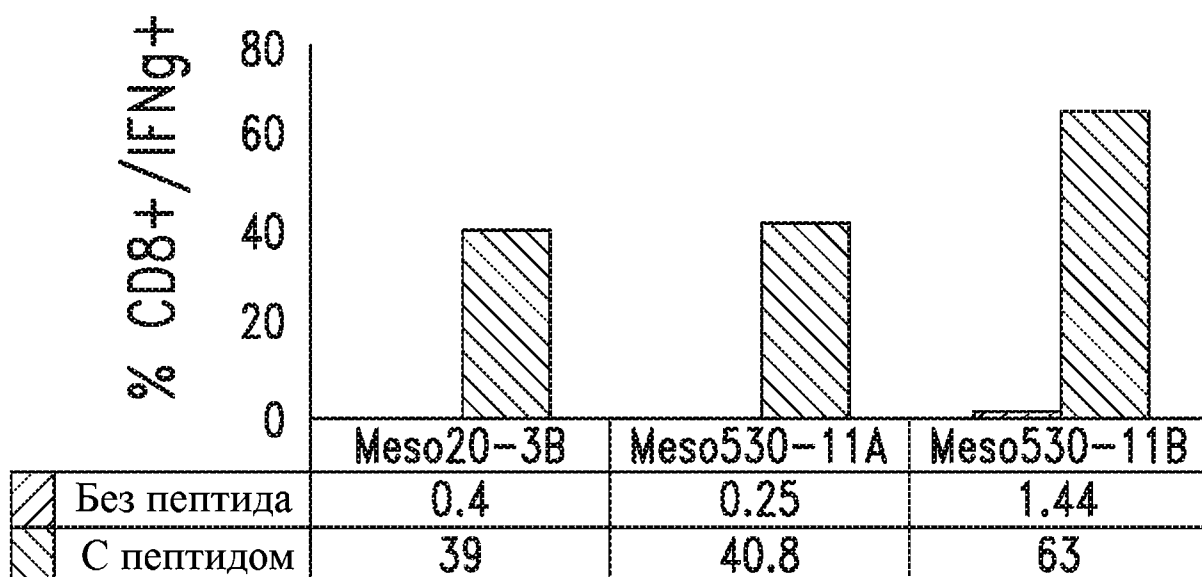
Фиг. 13В

Клеточная линия LCL MDS



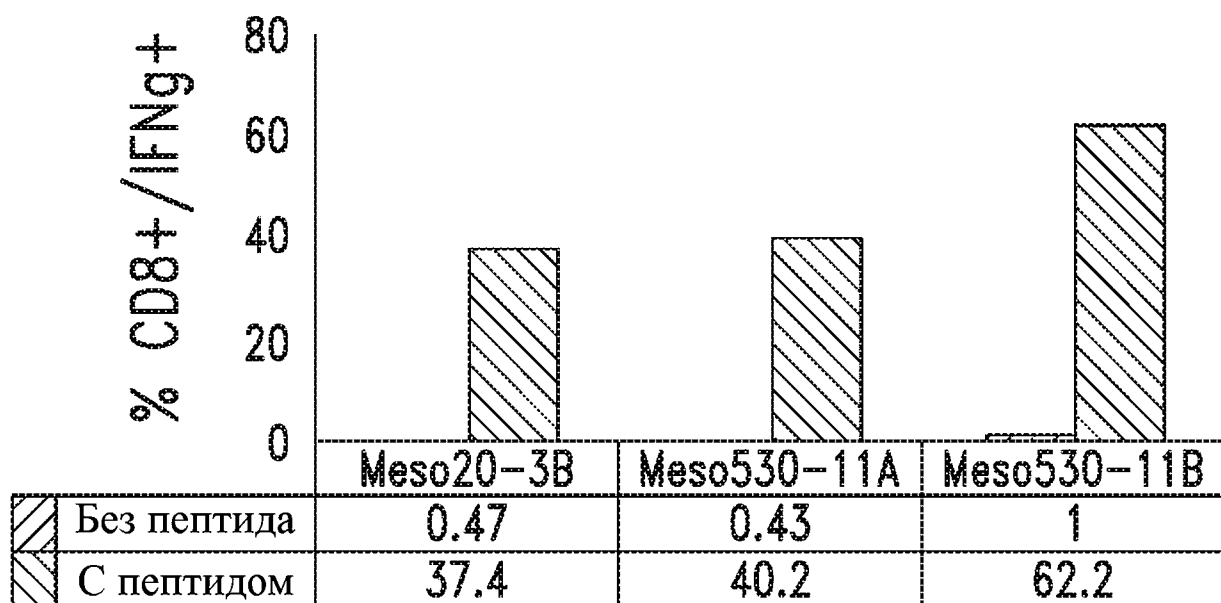
Фиг. 13C

Клеточная линия MS LCL



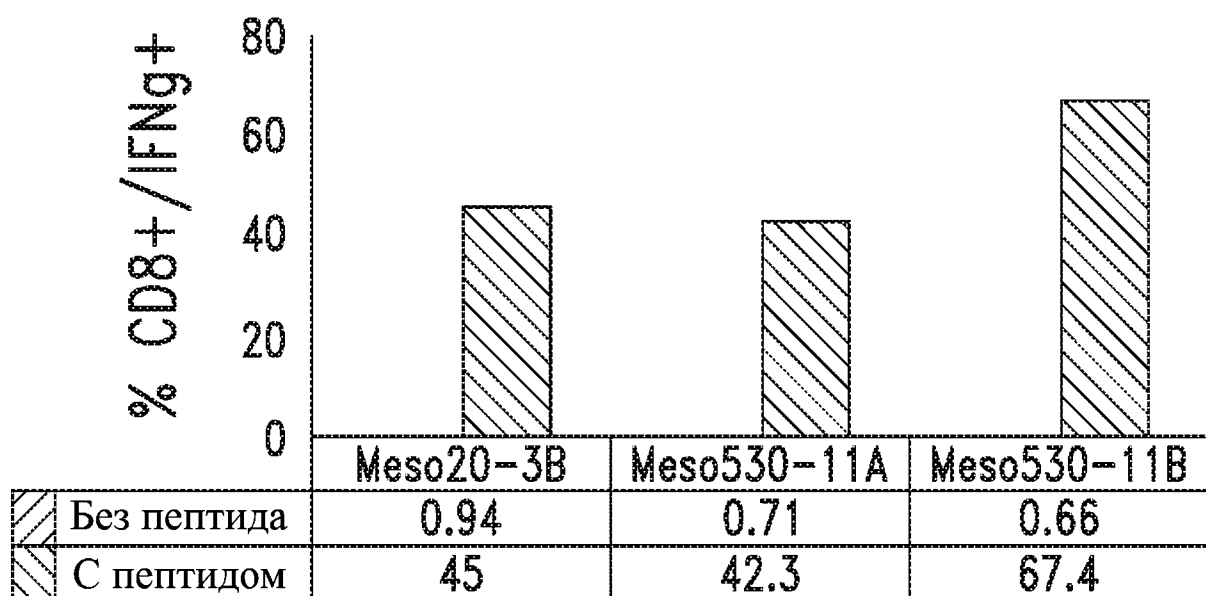
Фиг. 13D

Клеточная линия PAJ LCL



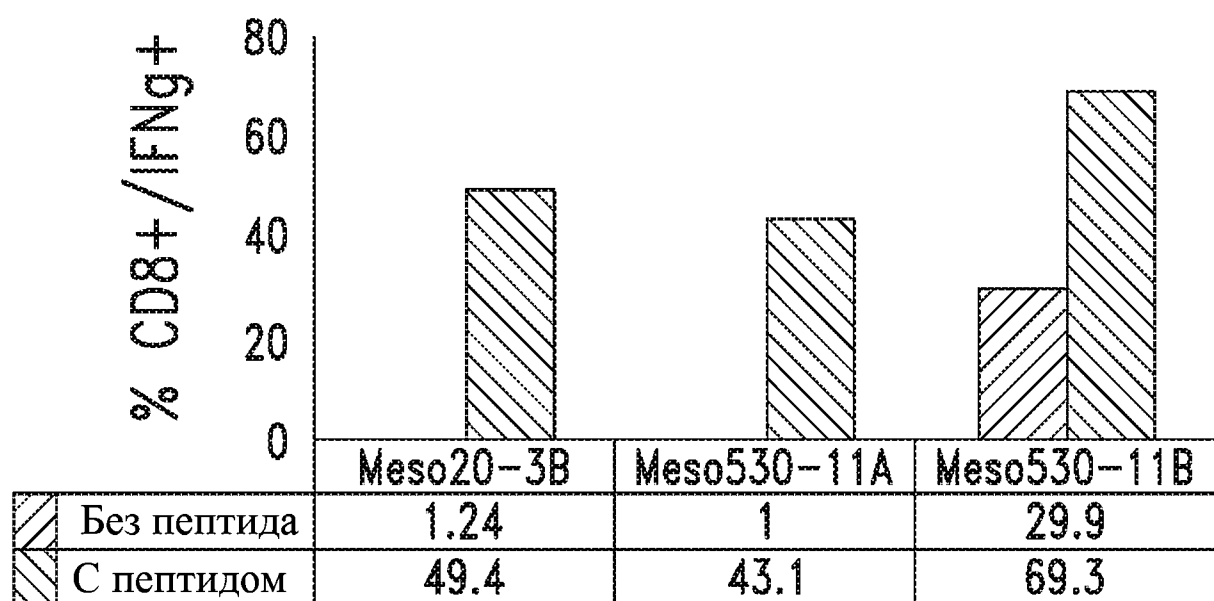
Фиг. 13E

Клеточная линия CLP LCL



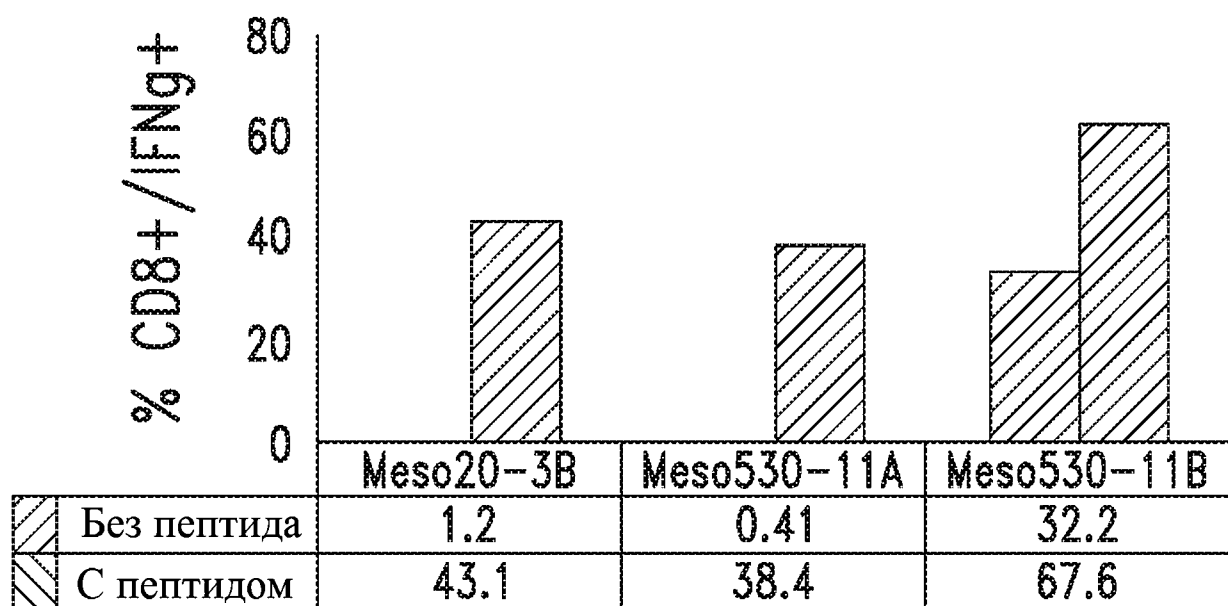
Фиг. 13F

Клеточная линия GIM LCL



Фиг. 13G

Клеточная линия FAN (1334) LCL



Фиг. 13H