

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 041672

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.21

(21) Номер заявки
201991186

(22) Дата подачи заявки
2017.11.17

(51) Int. Cl. C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)

(54) ПРЕОБРАЗОВАТЕЛЬ СИГНАЛА TGFB

(31) 62/423,565; 62/467,496

(32) 2016.11.17; 2017.03.06

(33) US

(43) 2019.10.31

(86) PCT/US2017/062358

(87) WO 2018/094244 2018.05.24

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
2СЭВЭНТИ БИО, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Бойеринас Бенджамин (US)

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) US-A1-20160075755
WO-A2-2016164089
WO-A1-2012006635
WO-A1-2016122738
US-A1-20090222936

(57) В изобретении предложены улучшенные композиции для адоптивной Т-клеточной терапии для лечения, предотвращения или уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома рака, инфекционного заболевания, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания и иммунодефицита или связанного с ними состояния.

041672

B1

041672

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет в соответствии с § 119(е) раздела 35 Кодекса США предварительной патентной заявки США № 62/467496, поданной 6 марта 2017 г., и предварительной патентной заявки США № 62/423565, поданной 17 ноября 2016 г., обе из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Заявление относительно перечня последовательностей

Перечень последовательностей, связанный с данной заявкой, представлен в текстовом формате вместо бумажной копии и включен в описание посредством ссылки. Текстовый файл, содержащий перечень последовательностей, назван BLBD_080_02WO_ST25.txt. Текстовый файл имеет размер 215 КБ, был создан 17 ноября 2017 г. и подается в электронном виде через EFS-Web одновременно с подачей описания.

Уровень техники

Область техники

Настоящее изобретение относится к улучшенным адоптивным клеточным терапиям. Более конкретно, изобретение относится к улучшенным сигнальным молекулам, клеткам и способам их применения.

Описание предшествующего уровня техники

Уровень заболеваемости раком в мире удвоился в период между 1975 и 2000 гг. Рак является второй по частоте причиной тяжелых состояний и смертности во всем мире: в 2012 г. было зарегистрировано около 14,1 млн новых случаев заболевания и 8,2 млн случаев смерти от рака. Наиболее распространенными видами рака являются рак молочной железы, рак легкого и бронхов, рак предстательной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак мочевого пузыря, меланома кожи, неходжкинская лимфома, рак щитовидной железы, рак почки и почечной лоханки, рак эндометрия, лейкоз и рак поджелудочной железы. Прогнозируется увеличение числа новых случаев заболевания раком до 22 млн в течение следующих двух десятилетий.

Иммунная система играет ключевую роль в распознавании раковых заболеваний человека и борьбе с ними. Большая часть трансформированных клеток быстро обнаруживается "сторожевыми" элементами иммунной системы и уничтожается за счет активации антигенспецифических Т-клеток через клонально экспрессируемые Т-клеточные рецепторы (TCR). Соответственно, рак можно считать иммунологическим нарушением, неспособностью иммунной системы создать необходимый противоопухолевый ответ для устойчивого подавления и устранения заболевания. Для более эффективной борьбы с раком в последние несколько десятилетий было разработано несколько иммунотерапевтических подходов, направленных конкретно на повышение Т-клеточного иммунитета. С помощью этих методов лечения удалось добиться только отдельных случаев ремиссии заболевания, и в целом не было достигнуто значительного успеха. Более поздние методы лечения, в которых используются моноклональные антитела, нацеленные на молекулы, ингибирующие активацию Т-клеток, такие как CTLA-4 или PD-1, показали более существенное противоопухолевое действие; однако эти методы лечения также связаны со значительной токсичностью из-за системной иммунной активации.

Ближе к настоящему моменту стратегии адоптивной клеточной иммунотерапии, основанные на выделении, модификации, размножении и повторной инфузии Т-клеток, были изучены и испытаны на ранних стадиях клинических исследований. Т-клетки часто выбирают в качестве эффекторных клеток для иммунотерапии рака благодаря их избирательному распознаванию и мощным эффекторным механизмам. Эти методы лечения применялись с переменным успехом, но у небольшого числа пациентов наблюдалась устойчивая ремиссия, что подчеркивает пока еще не реализованный потенциал иммунотерапии на основе Т-клеток.

Успешное распознавание цитолитическими Т-клетками антигенов, ассоциированных с опухолевыми клетками, инициирует направленный лизис опухоли и лежит в основе любого эффективного подхода к иммунотерапии рака. Опухоль-инфильтрирующие Т-клетки (TIL) экспрессируют TCR, избирательно направленные на опухолеассоциированные антигены; тем не менее, значительное количество TIL ограничено только несколькими видами раковых заболеваний человека. Вероятно, сконструированные Т-клеточные рецепторы (TCR) и химерные антигенные рецепторы (CAR) могут расширить сферу применения иммунотерапии на основе Т-клеток до лечения многих раковых заболеваний и других иммунных нарушений.

Кроме того, современные сконструированные (модифицированные) Т-клетки по-прежнему регулируются сложным микроокружением опухоли, состоящим из раковых клеток, клеток очага воспаления, стромальных клеток и цитокинов. Среди этих компонентов раковые клетки, клетки очага воспаления и супрессорные цитокины отрицательно влияют на фенотип и функцию Т-клеток. Сообща микроокружение опухоли вызывает терминальную дифференцировку Т-клеток в истощенные Т-клетки.

Истощение Т-клеток - это состояние дисфункции Т-клеток в хроническом окружении, которое характеризуется повышенной экспрессией или усилением передачи сигналов ингибирующими рецепторами; снижением продукции эффекторных цитокинов; и сниженной способностью к продолжению существования и устранению рака. Истощенные Т-клетки также демонстрируют многоуровневую потерю

функции: сниженная продукция IL-2 и сниженная способность к уничтожению *ex vivo* теряются на ранней стадии истощения, продукция TNF- α теряется на промежуточной стадии, а продукция IFN- γ и GzmB теряются на поздней стадии истощения. Большинство Т-клеток в микроокружении опухоли дифференцируются в истощенные Т-клетки и теряют способность устранять раковые клетки, и в конечном итоге устраняются.

Трансформирующий фактор роста бета (TGF β) представляет собой плеiotропный цитокин, который, как считают, играет в микроокружении опухоли роль иммуносупрессивной сигнальной молекулы. TGF β связывается с комплексами рецепторов серин/треонинкиназы TGF β R1 и TGF β R2, что приводит к рецептор-опосредованному фосфорилированию нижестоящих факторов транскрипции Smad2 и Smad3. Многие опухоли избегают цитостатического и антипролиферативного действия TGF β путем приобретения мутаций в рецепторах TGF β R2 и/или нижестоящих сигнальных белках Smad. TGF β подавляет ключевые молекулы, участвующие в эффекторной и питолитической активности Т-клеток *in vitro*, включая секрецию IFN γ .

На сегодняшний день клинические исследования, направленные на ингибирование передачи сигналов TGF β с использованием нейтрализующих антител или ингибиторов киназы, приносят неутешительные результаты, и о достижении значительных терапевтических результатов пока не сообщалось.

Краткое описание

Настоящее описание в целом относится, частично, к улучшенным преобразователям сигналов TGF β (химерным рецепторам TGF β или CTBR), генетически модифицированным клеткам, композициям и способам их применения.

В различных вариантах осуществления рассматривается слитый полипептид, содержащий: первый полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и иммунорецепторный внутриклеточный сигнальный домен; сигнал расщепления полипептида; и второй полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и иммунорецепторный внутриклеточный сигнальный домен.

В дополнительных вариантах осуществления иммунорецепторный внутриклеточный сигнальный домен первого полипептида выделен из цитокинового рецептора, рецептора интерлейкина, образ-распознающего рецептора (рецептора распознавания паттернов) или толл(toll)-подобного рецептора.

В частных вариантах осуществления иммунорецепторный внутриклеточный сигнальный домен второго полипептида выделен из цитокинового рецептора, рецептора интерлейкина, образ-распознающего рецептора или толл-подобного рецептора.

В некоторых вариантах осуществления иммунорецепторный внутриклеточный сигнальный домен первого полипептида представляет собой внутриклеточный сигнальный домен IL-12RP2, а иммунорецепторный внутриклеточный сигнальный домен второго полипептида представляет собой внутриклеточный сигнальный домен IL-12RP1. В различных вариантах осуществления трансмембранный домен первого полипептида содержит трансмембранный домен IL-12RP2. В частных вариантах осуществления трансмембранный домен второго полипептида содержит трансмембранный домен IL-12RP1. В частных вариантах осуществления слитый белок называют CTBR12 или преобразователем сигналов CTBR12.

В отдельных вариантах осуществления иммунорецепторный внутриклеточный сигнальный домен первого полипептида представляет собой внутриклеточный сигнальный домен IL-12RP1, а иммунорецепторный внутриклеточный сигнальный домен второго полипептида представляет собой внутриклеточный сигнальный домен IL-12RP2. В дополнительных вариантах осуществления трансмембранный домен первого полипептида содержит трансмембранный домен IL-12R β 1. В частных вариантах осуществления трансмембранный домен второго полипептида содержит трансмембранный домен IL-12RP2. В частных вариантах осуществления слитый белок называют CTBR12 или преобразователем сигналов CTBR12.

В дополнительных вариантах осуществления иммунорецепторный внутриклеточный сигнальный домен первого полипептида представляет собой внутриклеточный сигнальный домен IL-7R α , а иммунорецепторный внутриклеточный сигнальный домен второго полипептида представляет собой внутриклеточный сигнальный домен IL-2R γ . В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен первого полипептида содержит трансмембранный домен IL-7R α . В частных вариантах осуществления трансмембранный домен второго полипептида содержит трансмембранный домен IL-2R γ . В частных вариантах осуществления слитый белок называют CTBR7 или преобразователем сигналов CTBR7.

В различных вариантах осуществления иммунорецепторный внутриклеточный сигнальный домен первого полипептида представляет собой внутриклеточный сигнальный домен IL-2R γ , а иммунорецепторный внутриклеточный сигнальный домен второго полипептида представляет собой внутриклеточный сигнальный домен IL-7R α . В дополнительных вариантах осуществления трансмембранный домен первого полипептида содержит трансмембранный домен IL-2R γ . В отдельных вариантах осуществления трансмембранный домен второго полипептида содержит трансмембранный домен IL-7R α . В частных вариантах осуществления слитый белок называют CTBR7 или преобразователем сигналов CTBR7.

В дополнительных вариантах осуществления иммунорецепторный внутриклеточный сигнальный

TLR9 и внутриклеточный сигнальный домен TLR9. В частных вариантах осуществления слитый белок называют CTBR.TLR9 или преобразователем сигналов CTBR.TLR9.

В различных вариантах осуществления слитый полипептид содержит полипептид TGFβR2, содержащий внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR2, трансмембранный домен TLR10 и внутриклеточный сигнальный домен TLR10; саморасщепляющийся вирусный пептид 2A и полипептид TGFβR1, содержащий внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR1, трансмембранный домен TLR10 и внутриклеточный сигнальный домен TLR10. В частных вариантах осуществления слитый белок называют CTBR.TLR10 или преобразователем сигналов CTBR.TLR10.

В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся вирусный полипептид 2A выбран из группы, состоящей из пептида вируса ящура (FMDV) (F2A), пептида вируса ринита лошадей A (ERAV) (E2A), пептида вируса *Thosea asigna* (TaV) (T2A), пептида тешовируса-1 свиней (PTV-1) (P2A), пептида 2A тейловируса и пептида 2A вируса энцефаломиокардита.

В дополнительных вариантах осуществления слитый полипептид, рассматриваемый в настоящем документе, дополнительно содержит сконструированный антигенный рецептор и второй саморасщепляющийся вирусный полипептид 2A.

В отдельных вариантах осуществления второй саморасщепляющийся вирусный полипептид 2A выбран из группы, состоящей из: пептида вируса ящура (FMDV) (F2A), пептида вируса ринита лошадей A (ERAV) (E2A), пептида вируса *Thosea asigna* (TaV) (T2A), пептида тешовируса-1 свиней (PTV-1) (P2A), пептида 2A тейловируса и пептида 2A вируса энцефаломиокардита.

В частных вариантах осуществления сконструированный антигенный рецептор выбран из группы, состоящей из сконструированного Т-клеточного рецептора (TCR), химерного антигенного рецептора (CAR), рецептора DARIC или его компонентов и химерного цитокинового рецептора; необязательно, где сконструированный антигенный рецептор распознает антиген, выбранный из группы, состоящей из рецептора фолиевой кислоты альфа, 5T4, интегрин $\alpha\beta6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, семейства EGFR, включая ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EPCAM, FAP, фетального AchR, FR α , GD2, GD3, глипикана-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, лямбда, антигена Y системы Льюис, каппа, мезотелина, Muc1, Muc16, NCAM, лигандов NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, сурвивина, TAG72, TEM, VEGFR2 и WT-1.

В дополнительных вариантах осуществления слитый полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 26-35.

В различных вариантах осуществления предложен полинуклеотид, кодирующий слитый полипептид, рассматриваемый в настоящем документе.

В дополнительных вариантах осуществления предложен вектор, содержащий полинуклеотид или слитый полинуклеотид, рассматриваемые в настоящем документе.

В частных вариантах осуществления предложена клетка, содержащая слитый полипептид, полинуклеотид или вектор, рассматриваемые в настоящем документе.

В дополнительных вариантах осуществления клетка представляет собой гемопоэтическую клетку.

В отдельных вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку.

В различных вариантах осуществления клетка представляет собой клетку CD3+, CD4+ и/или CD8+.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку.

В дополнительных вариантах осуществления клетка представляет собой цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL) или хелперные Т-клетки.

В дополнительных вариантах осуществления клетка представляет собой естественную клетку-киллер (NK-клетку) или Т-клетку, имеющую свойства естественного киллера (NKT-клетку).

В частных вариантах осуществления источником клетки являются мононуклеары периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинная кровь, ткань вилочковой железы, ткань из очага инфекции, асцит, плевральный выпот, ткань селезенки или опухоли.

В некоторых вариантах осуществления клетка, содержащая слитый полипептид, рассматриваемый в настоящем документе, дополнительно содержит сконструированный антигенный рецептор.

В различных вариантах осуществления сконструированный антигенный рецептор выбран из группы, состоящей из сконструированного Т-клеточного рецептора (TCR), химерного антигенного рецептора (CAR), рецептора DARIC или его компонентов и химерного цитокинового рецептора.

В дополнительных вариантах осуществления предложена композиция, содержащая слитый полипептид, полинуклеотид, вектор или клетку, рассматриваемые в настоящем документе.

В частных вариантах осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и слитый полипептид, полинуклеотид, вектор или клетку, рассматриваемые в настоящем документе.

В отдельных вариантах осуществления способ лечения нуждающегося в этом субъекта включает введение указанному субъекту эффективного количества композиции или фармацевтической компози-

ции, рассматриваемых в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения, предотвращения или уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома рака, инфекционного заболевания, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания и иммунодефицита или связанного с ними состояния включает введение субъекту эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, рассматриваемых в настоящем документе.

В дополнительных вариантах осуществления способ лечения солидного рака включает введение субъекту эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, рассматриваемых в настоящем документе.

В различных вариантах осуществления солидный рак включает рак печени, рак поджелудочной железы, рак легкого, рак молочной железы, рак яичника, рак предстательной железы, рак яичка, рак мочевого пузыря, рак мозга, саркому, рак головы и шеи, рак кости, рак щитовидной железы, рак почки или рак кожи.

В частных вариантах осуществления солидный рак представляет собой рак поджелудочной железы, рак легкого или рак молочной железы.

В отдельных вариантах осуществления предложен способ лечения гематологического злокачественного новообразования, включающий введение субъекту эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, рассматриваемых в настоящем документе.

В различных вариантах осуществления гематологическое злокачественное новообразование представляет собой лейкоз, лимфому или множественную миелому.

Краткое описание нескольких изображений в графических материалах

На фиг. 1 в виде рисунка показаны полипептиды, кодирующие химерный антигенный рецептор (CAR) и доминантно-отрицательный рецептор TGF β (CAR.DNR); CAR и субъединицу TGF β R2 (R2); CAR и преобразователь сигналов CTBR12 (CAR.CTBR12) и CAR и преобразователь сигналов CTBR7 (CAR.CTBR7).

На фиг. 2 показана экспрессия CAR и субъединицы TGF β R2 в первичных человеческих Т-клетках, трансдуцированных химерным антигенным рецептором к ROR1, отдельно и в комбинации с TGF β DNR, субъединицей TGF β R2 и преобразователем сигналов CTBR12.

На фиг. 3 показана экспрессия фосфо-SMAD2/3 в первичных человеческих Т-клетках, трансдуцированных химерным антигенным рецептором к ROR1, отдельно и в комбинации с TGF β DNR, субъединицей TGF β R2 и преобразователем сигналов CTBR12 и обработанных TGF β 1, по сравнению с необработанными клетками.

На фиг. 4 показана экспрессия фосфо-STAT4 в первичных человеческих Т-клетках, трансдуцированных химерным антигенным рецептором к ROR1, отдельно и в комбинации с TGF β DNR, субъединицей TGF β R2 и преобразователем сигналов CTBR12 и обработанных IL-12 (верхний ряд) или TGF β 1 (нижний ряд).

На фиг. 5 показана экспрессия фосфо-STAT4 и фосфо-STAT5 в первичных человеческих Т-клетках, трансдуцированных химерным антигенным рецептором к ROR1 и преобразователем сигналов CTBR12 и обработанных IL-12 (левая секция) или TGF β 1 (правая секция).

На фиг. 6 показан анализ экспрессии генов первичными человеческими Т-клетками, трансдуцированными химерным антигенным рецептором к ROR1 в комбинации с преобразователем сигналов CTBR12, последовательно повторно стимулированными клетками-мишенями, экспрессирующими ROR1, в течение 21 дня в присутствии или в отсутствие TGF β 1.

На фиг. 7 показана секреция IFN γ первичными человеческими Т-клетками, трансдуцированными химерным антигенным рецептором к ROR1, отдельно и в комбинации с TGF β DNR или преобразователем сигналов CTBR12, и культивированными в присутствии или в отсутствие TGF β 1 на планшетах, покрытых CD3 или ROR1.

На фиг. 8 показаны кривые роста первичных человеческих Т-клеток, трансдуцированных химерным антигенным рецептором к ROR1, отдельно и в комбинации с TGF β DNR или преобразователем сигналов CTBR12, последовательно повторно стимулированными клетками-мишенями, экспрессирующими ROR1, в присутствии или в отсутствие TGF β 1.

На фиг. 9 показана экспрессия CAR и субъединицы TGF β R2 в первичных человеческих Т-клетках, трансдуцированных химерным антигенным рецептором к ROR1, отдельно и в комбинации с TGF β DNR и преобразователем сигналов CTBR7.

На фиг. 10 показана экспрессия фосфо-SMAD2/3 в первичных человеческих Т-клетках, трансдуцированных химерным антигенным рецептором к ROR1, отдельно и в комбинации с TGF β DNR и преобразователем сигналов CTBR7, и обработанных TGF β 1.

На фиг. 11 показана экспрессия фосфо-STAT5 в первичных человеческих Т-клетках, трансдуцированных химерным антигенным рецептором к ROR1, отдельно и в комбинации с TGF β DNR и преобразователем сигналов CTBR7, и обработанных TGF β 1.

На фиг. 12 показана экспрессия BCL2 в первичных человеческих Т-клетках, трансдуцированных химерным антигенным рецептором к ROR1, отдельно и в комбинации с TGFβ DNR и преобразователем сигналов CTBR7, и обработанных TGFβ1.

На фиг. 13 показаны кривые роста первичных человеческих Т-клеток, трансдуцированных химерным антигенным рецептором к ROR1, отдельно и в комбинации с TGFβ DNR или преобразователем сигналов CTBR7, в присутствии или в отсутствие TGFβ1.

На фиг. 14 показаны кривые роста первичных человеческих Т-клеток, трансдуцированных химерным антигенным рецептором к ROR1, отдельно и в комбинации с TGFβ DNR или преобразователем сигналов CTBR7, последовательно повторно стимулированных клетками-мишенями, экспрессирующими ROR1, в присутствии или в отсутствие TGFβ1.

На фиг. 15 показана экспрессия CAR и субъединицы TGFβR2 в первичных человеческих Т-клетках, трансдуцированных химерным антигенным рецептором к EGFR, отдельно и в комбинации с TGFβ DNR, преобразователем сигналов CTBR12 и преобразователем сигналов CTBR7 (верхняя секция). На фиг. 15 также показана экспрессия фосфо-SMAD2/3 в первичных человеческих Т-клетках, трансдуцированных химерным антигенным рецептором к EGFR, отдельно и в комбинации с TGFβ DNR, преобразователем сигналов CTBR12 и преобразователем сигналов CTBR7, и обработанных TGFβ1 (нижняя секция), по сравнению с необработанными клетками.

На фиг. 16 показана экспрессия фосфо-STAT4 в первичных человеческих Т-клетках, трансдуцированных химерным антигенным рецептором к EGFR, отдельно и в комбинации с TGFβ DNR и преобразователем сигналов CTBR12, и обработанных либо IL-12, либо TGFβ1.

На фиг. 17 показана экспрессия фосфо-STAT5 в первичных человеческих Т-клетках, трансдуцированных химерным антигенным рецептором к EGFR, отдельно и в комбинации с TGFβ DNR и преобразователем сигналов CTBR7, и обработанных IL-7 или TGFβ1.

На фиг. 18 показана секреция IFNγ первичными человеческими Т-клетками, трансдуцированными химерным антигенным рецептором к EGFR, отдельно и в комбинации с TGFβ DNR или преобразователем сигналов CTBR12, и культивированными с линиями EGFR (-) или EGFR (+) клеток в присутствии или в отсутствие TGFβ1.

На фиг. 19 показаны кривые роста первичных человеческих Т-клеток, трансдуцированных химерным антигенным рецептором к EGFR, отдельно и в комбинации с TGFβ DNR, преобразователем сигналов CTBR12, или преобразователем сигналов CTBR7, последовательно повторно стимулированных клетками-мишенями, экспрессирующими EGFR, в присутствии или в отсутствие TGFβ1.

На фиг. 20 в виде рисунка показаны полипептиды, кодирующие Т-клеточный рецептор (TCR), распознающий NY-ESO1 (A2), NY-ESO1 TCR и доминантно-негативный рецептор TGFβ (NY-ESO1.DNR); NY-ESO1 TCR и преобразователь сигналов CTBR7 (NY-ESO1.CTBR7), и NY-ESO1 TCR и преобразователь сигналов CTBR12 (NY-ESO1.CTBR12).

На фиг. 21 показана экспрессия фосфо-SMAD2/3 в первичных человеческих Т-клетках, трансдуцированных NY-ESO1 TCR, NY-ESO1.DNR, NY-ESO1.CTBR7 и NY-ESO1.CTBR12 и обработанных TGFβ1, по сравнению с необработанными клетками.

На фиг. 22 показана экспрессия фосфо-STAT5 в первичных человеческих Т-клетках, трансдуцированных NY-ESO1.CTBR7 и обработанных IL-7 или TGFβ1 (верхняя секция). На фиг. 22 также показана экспрессия фосфо-STAT4 в первичных человеческих Т-клетках, трансдуцированных NY-ESO1.CTBR12 и обработанных IL-12 или TGFβ1 (нижняя секция).

На фиг. 23 показана секреция IFNγ первичными человеческими Т-клетками, трансдуцированными NY-ESO1 TCR, NY-ESO1.DNR, NY-ESO1.CTBR7 и NY-ESO1.CTBR12, культивированными с линиями клеток A2(+).NY-ESO1(+) в присутствии или в отсутствие TGFβ1.

Краткое описание идентификаторов последовательностей

SEQ ID NO: 1 представляет собой полипептидную последовательность человеческого TGFβR1.

SEQ ID NO: 2 представляет собой полипептидную последовательность человеческого TGFβR2.

SEQ ID NO: 3 представляет собой полипептидную последовательность человеческого IL-12Rp1 (CD212).

SEQ ID NO: 4 представляет собой полипептидную последовательность человеческого IL-12Rβ2.

SEQ ID NO: 5 представляет собой полипептидную последовательность человеческого IL-7Rα (CD 127).

SEQ ID NO: 6 представляет собой полипептидную последовательность человеческого IL-2Rγ (CD 132).

SEQ ID NO: 7 представляет собой полипептидную последовательность человеческого IL-2Rβ (CD 122).

SEQ ID NO: 8 представляет собой полипептидную последовательность человеческого IL-21R (CD360).

SEQ ID NO: 9 представляет собой полипептидную последовательность человеческого IL-18R1 (CD218a).

SEQ ID NO: 10 представляет собой полипептидную последовательность человеческого IL-18RAP (CD218b).

SEQ ID NO: 11 представляет собой полипептидную последовательность человеческого IL-1R1 (CD

протеазой и сайтов расщепления саморасщепляющимся полипептидом.

Подробное описание изобретения

А. Обзор

Т-клетки, экспрессирующие химерные антигенные рецепторы (CAR-Т-клетки), продемонстрировали значительную противоопухолевую активность при гематологических злокачественных новообразованиях. Однако активность при признаках солидных опухолей была частично ограничена из-за иммуносупрессивного микроокружения солидных опухолей (ТМЕ). Повышенная продукция иммуносупрессивных цитокинов, включая TGF β , опухолевыми клетками и опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами способствует иммуносупрессивности микроокружения опухоли. TGF β ингибирует функцию Т-клеток посредством различных механизмов. TGF β часто связан с метастазированием и инвазией опухоли, ингибированием функции иммунных клеток и неблагоприятным прогнозом у пациентов с раком. Передача сигналов TGF β посредством TGF β R2 в опухолеспецифических CTL снижает их функцию и распространенность в опухоли, а блокирование передачи сигналов TGF β на CD8 Т-клетках с помощью моноклональных антител приводит к более быстрому надзору за опухолью и присутствию в месте опухоли гораздо большего количества CTL. На сегодняшний день стратегии ингибирования TGF β в клинических условиях не дали значительных терапевтических результатов.

Настоящее изобретение в целом относится к полипептидам, преобразующим иммуносупрессивный сигнал TGF β в иммуностимулирующий сигнал, и к клеткам, экспрессирующим указанные полипептиды. Без привязки к какой-либо конкретной теории, рассматриваемые в настоящем документе полипептиды представляют собой преобразователи сигналов TGF β , содержащие TGF β -связывающие домены TGF β R1 и TGF β R2, которые при связывании с иммуностимулирующими концевыми доменами и совместной экспрессии в иммунных эффекторных клетках могут преобразовывать воздействие TGF β из иммуносупрессивного сигнала в иммуностимулирующий сигнал, который стимулирует активность и функцию иммунных эффекторных клеток.

Совместная экспрессия полипептидов, преобразующих сигналы TGF β , в иммунных эффекторных клетках придает клеткам устойчивость к иммуносупрессивному воздействию TGF β , например, путем восстановления или увеличения секреции провоспалительных цитокинов. В особенно предпочтительных вариантах осуществления полипептид, преобразующий сигналы TGF β , называют химерным рецептором TGF β или CTBR.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения рассматриваются в том числе полипептиды, преобразующие иммуносупрессивный сигнал TGF β в иммуностимулирующий сигнал, опосредованный одним или более внутриклеточными доменами одного или более иммунных рецепторов.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения рассматриваются в том числе полипептиды, преобразующие иммуносупрессивный сигнал TGF β в иммуностимулирующий сигнал, опосредованный одним или более внутриклеточными доменами одного или более цитокиновых рецепторов.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения рассматриваются в том числе полипептиды, преобразующие иммуносупрессивный сигнал TGF β в иммуностимулирующий сигнал, опосредованный одним или более внутриклеточными доменами одного или более рецепторов интерлейкинов.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения рассматриваются в том числе полипептиды, преобразующие иммуносупрессивный сигнал TGF β в иммуностимулирующий сигнал, опосредованный одним или более внутриклеточными доменами одного или более образраспознающих рецепторов.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения рассматриваются в том числе полипептиды, преобразующие иммуносупрессивный сигнал TGF β в иммуностимулирующий сигнал, опосредованный одним или более внутриклеточными доменами одного или более толл-подобных рецепторов.

В частных вариантах осуществления настоящего изобретения рассматривается в том числе полипептид, содержащий внеклеточный домен TGF β R1, связывающий TGF β , трансмембранный домен и один или более внутриклеточных доменов одного или более иммунных рецепторов; и полипептид, содержащий внеклеточный домен TGF β R2, связывающий TGF β , трансмембранный домен и один или более внутриклеточных доменов одного или более иммунных рецепторов. В одном из вариантов осуществления полипептиды связаны друг с другом сигналом расщепления полипептида, например, сигналом расщепления полипептида 2А.

В частных вариантах осуществления настоящего изобретения рассматривается в том числе иммунная эффекторная клетка, например CAR Т-клетка, экспрессирующая полипептид, содержащий внеклеточный домен TGF β R1, связывающий TGF β , трансмембранный домен и один или более внутриклеточных доменов одного или более иммунных рецепторов; и полипептид, содержащий внеклеточный домен TGF β R2, связывающий TGF β , трансмембранный домен и один или более внутриклеточных доменов одного или более иммунных рецепторов.

В частных вариантах осуществления трансмембранные домены и внутриклеточные сигнальные домены выделены из рецептора IL-12, рецептора IL-7, рецептора IL-15, рецептора IL-21, рецептора IL-2, рецептора IL-1, рецептора IL-18, рецептора IL-36, рецептора IFN I типа, рецептора TLR1, рецептора TLR2, рецептора TLR3, рецептора TLR4, рецептора TLR5, рецептора TLR6, рецептора TLR7, рецептора TLR8, рецептора TLR9 или рецептора TLR10.

В частных вариантах осуществления трансмембранные домены и внутриклеточные сигнальные домены выделены из IL-12R β 2, IL-7R α , IL-2R γ , IL-2R β , IL-21R, IL-18R1, IL-18RAP, IL-1R1, IL-1RAP, IFNAR1, IFNAR2, IL-1RL2, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 или TLR10.

Практическая реализация частных вариантов осуществления потребует применения, если явным образом не указано иное, общепринятых методов из области химии, биохимии, органической химии, молекулярной биологии, микробиологии, технологий рекомбинантных ДНК, генетики, иммунологии и клеточной биологии, которые известны специалистам в данной области техники; многие из них описаны ниже с целью иллюстрации. Такие методики всецело описаны в литературе. См., например,

Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2001); Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Ausubel *et al.*, *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, 1985); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); Harlow and Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) *Current Protocols in Immunology* Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*; а также монографии в журналах, таких как *Advances in Immunology*.

В. Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значения, общепринятые специалистами в области техники, к которой принадлежит изобретение. Хотя любые методы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут применяться при практической реализации или тестировании частных вариантов осуществления, в настоящем документе описаны предпочтительные варианты осуществления композиций, методов и материалов. В рамках настоящего изобретения ниже приводятся определения следующих терминов.

Единственное число используется в настоящем документе для обозначения одного или более чем одного (то есть, по меньшей мере одного или одного или более) грамматического объекта. Например, "элемент" означает один элемент или один или более элементов.

Использование альтернативы (например, "или") следует понимать как одну из, обе или любую комбинацию альтернатив.

Термин "и/или" следует понимать как означающий либо одну из, либо обе альтернативы.

В контексте настоящего документа термин "приблизительно" или "около" обозначает количество, уровень, значение, число, частоту, процент, измерение, размер, величину, массу или длину, варьирующую на вплоть до 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% от референсного количества, уровня, значения, числа, частоты, процента, измерения, размера, величины, массы или длины. В одном из вариантов осуществления термин "около" или "приблизительно" относится к диапазону количества, уровня, значения, числа, частоты, процента, измерения, размера, величины, массы или длины $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, $\pm 8\%$, $\pm 7\%$, $\pm 6\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$ или $\pm 1\%$ относительно референсного количества, уровня, значения, числа, частоты, процента, измерения, размера, величины, массы или длины.

В данном описании, если контекст не требует иного, слова "содержат", "содержит" и "содержащий" следует понимать как подразумевающие включение указанной стадии, или элемента, или группы стадий или элементов, но не исключение любой другой стадии, или элемента, или группы стадий или элементов. Под "состоящий из" подразумевается включая и ограничиваясь тем, что следует за фразой "состоящий из". Таким образом, фраза "состоящий из" указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными, и никакие другие элементы присутствовать не могут. Под "по существу состоящий из" подразумевается включающий любые элементы, перечисленные после фразы, и ограничиваясь другими элементами, которые не препятствуют или способствуют проявлению активности или действия, указанных в описании для перечисленных элементов. Таким образом, фраза "по существу со-

стоящий из" указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными, но при этом не присутствуют никакие другие элементы, существенным образом влияющие на активность или действие перечисленных элементов.

Ссылка по тексту данного описания на "один вариант осуществления", "вариант осуществления", "частный вариант осуществления", "связанный вариант осуществления", "отдельный вариант осуществления", "еще один вариант осуществления" или "дополнительный вариант осуществления" или их комбинации означает, что отдельный признак, структура или характеристика, описанные в связи с указанным вариантом осуществления, включены по меньшей мере в один вариант осуществления. Таким образом, вышеупомянутые фразы, упоминаемые в различных местах в тексте данного описания, не обязательно все относятся к одному и тому же варианту осуществления. Кроме того, отдельные признаки, структуры или характеристики могут быть объединены любым подходящим образом в одном или более вариантах осуществления. Также подразумевается, что положительное изложение признака в одном варианте осуществления служит основой для исключения этого признака из частного варианта осуществления.

"Антиген (Ag)" относится к соединению, композиции или веществу, которое может стимулировать продукцию антител или Т-клеточный ответ у животного, включая композиции (такие как композиция, включающая специфичный для рака белок), которые вводят животному путем инъекции или адсорбции. Примеры антигенов включают, не ограничиваясь перечисленным, липиды, углеводы, полисахариды, гликопротеины, пептиды или нуклеиновые кислоты. Антиген взаимодействует с продуктами специфического гуморального или клеточного иммунитета, в том числе продуктами, индуцированными гетерологичными антигенами, такими как раскрытые антигены.

"Антиген-мишень" или "представляющий интерес антиген-мишень" представляет собой антиген, для связывания с которым предназначен связывающий домен, рассматриваемый в настоящем документе. В частных вариантах осуществления целевой антиген выбран из группы, состоящей из рецептора фолликулярной кислоты альфа, 5T4, интегрина $\alpha\beta6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, семейства EGFR, включая ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, фетального AchR, FR α , GD2, GD3, глипикана-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, лямбда, антигена Y системы Льюиса, каппа, мезотелина, Muc1, Muc16, NCAM, лигандов NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, сурвивина, STn, TAG72, TEM, VEGFR2 и WT-1.

В одном из вариантов осуществления антиген представляет собой комплекс ГКГС-пептид, такой как комплекс ГКГС I класса-пептид или комплекс ГКГС II класса-пептид.

В контексте настоящего документа термины "связывающий домен", "внеклеточный домен", "антигенсвязывающий домен", "внеклеточный связывающий домен", "внеклеточный антигенсвязывающий домен", "антигенспецифический связывающий домен" и "внеклеточный антигенспецифический связывающий домен" используются взаимозаменяемо и придают полипептиду способность специфически связываться с представляющим интерес антигеном-мишенью. Связывающий домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. Иллюстративные примеры связывающих доменов включают, не ограничиваясь перечисленным, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, домены FN3 и DARPin.

Термины "специфическая аффинность связывания" или "специфически связывает", или "специфически связанный", или "специфическое связывание", или "специфически направленный на" в контексте настоящего документа описывают связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном-мишенью с большей аффинностью связывания, чем фоновое связывание. Связывающий домен "специфически связывается" с антигеном-мишенью, если он связывается с антигеном или ассоциирует с ним с аффинностью или K_a (т.е., равновесной константой ассоциации отдельного связывающего взаимодействия, выражаемой в единицах измерения $1/M$), например, большей или равной приблизительно $10^5 M^{-1}$. В отдельных вариантах осуществления связывающий домен (или содержащий его слитый белок) связывается с мишенью с K_a , большей или равной приблизительно $10^6 M^{-1}$, $10^7 M^{-1}$, $10^8 M^{-1}$, $10^9 M^{-1}$, $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, $10^{12} M^{-1}$ или $10^{13} M^{-1}$. "Высокоаффинные" связывающие домены (или слитые белки, содержащие их одноцепочечные фрагменты) относятся к связывающим доменам с K_a , составляющей 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 $10^{12} M^{-1}$, по меньшей мере $10^{13} M^{-1}$ или более.

В качестве альтернативы, аффинность может быть определена как равновесная константа диссоциации (K_d) отдельного связывающего взаимодействия, выражаемая в единицах измерения M (например, от $10^{-5} M$ до $10^{-13} M$, или менее). Аффинности полипептидов связывающих доменов могут быть легко определены с использованием общепринятых методик, например, с помощью конкурентного ELISA (иммуноферментного анализа), или анализа связывания, или анализа смещения с использованием меченых лигандов, или с помощью устройства, использующего свойства поверхностного плазмонного резонанса, такого как Biacore T100, доступное от Biacore, Inc., Пискатауэй, Нью-Джерси, или технологии оп-

тического биосенсора, такой как система EPIC или EnSpire, доступные соответственно от Corning и Perkin Elmer (см. также, например, Scatchard et al. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660; и патенты США №№ 5283173, 5468614 или эквиваленты).

В одном из вариантов осуществления аффинность специфического связывания приблизительно в 2 раза больше, чем фоновое связывание, приблизительно в 5 раз больше, чем фоновое связывание, приблизительно в 10 раз больше, чем фоновое связывание, приблизительно в 20 раз больше, чем фоновое связывание, приблизительно в 50 раз больше, чем фоновое связывание, приблизительно в 100 раз больше, чем фоновое связывание или приблизительно в 1000 или более раз больше, чем фоновое связывание.

"Антитело" относится к связывающему агенту, представляющему собой полипептид, содержащий по меньшей мере вариабельную область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина, который специфически распознает и связывает эпитоп антигена, такого как липид, углевод, полисахарид, гликопротеин, пептид или нуклеиновая кислота, содержащий антигенную детерминанту, такую как распознаваемая иммунной клеткой.

"Эпитоп" или "антигенная детерминанта" относится к области антигена, с которой связывается связывающий агент.

Антитела включают их антигенсвязывающие фрагменты, такие как верблюжьи антитела, антитела NAR (новый антигенный рецептор), Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab)₂-фрагменты, F(ab)₃-фрагменты, Fv, одноцепочечные Fv-белки ("scFv"), биспецифические scFv, (scFv)₂, миниантитела, диатела, триатела, тетраатела, стабилизированные дисульфидными связями Fv-белки ("dsFv") и однодоменное антитело (sdAb, нанотело), и части полноразмерных антител, ответственные за связывание антигена. Термин также включает сконструированные с помощью генной инженерии формы, такие как химерные антитела (например, гуманизированные мышиные антитела), гетероконъюгаты антител (такие как биспецифические антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты. См. также Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997.

Как должно быть понятно специалисту в данной области техники и как описано в других частях настоящего документа, целое антитело содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области и первой, второй и третьей константных областей, тогда как каждая легкая цепь состоит из вариабельной области и константной области. Тяжелые цепи млекопитающих классифицируются на α , δ , ϵ , γ и μ . Легкие цепи млекопитающих классифицируются на λ или κ . Иммуноглобулины, содержащие тяжелые цепи α , δ , ϵ , γ и μ классифицируются на иммуноглобулин (Ig)A, IgD, IgE, IgG и IgM. Целое антитело имеет "Y"-образную форму. Ствол Y состоит из второй и третьей константных областей (а в случае IgE и IgM - четвертой константной области) двух тяжелых цепей, связанных вместе, и в шарнирной области образуются дисульфидные связи (межцепочечные). Тяжелые цепи γ , α и δ имеют константную область, состоящую из трех последовательно связанных (расположенных в линию) доменов Ig, и шарнирную область для дополнительной гибкости; тяжелые цепи μ и ϵ имеют константную область, состоящую из четырех доменов иммуноглобулина. Вторую и третью константные области называют "доменом CH2" и "доменом CH3" соответственно. Каждое плечо Y включает вариабельную область и первую константную область одной тяжелой цепи, связанные с вариабельной и константными областями одной легкой цепи. Вариабельные области легкой и тяжелой цепей ответственны за связывание антигена.

Вариабельные области легкой и тяжелой цепей содержат "каркасную" область, прерываемую тремя гипервариабельными областями, также называемыми "областями, определяющими комплементарность" или "CDR". CDR могут быть определены или идентифицированы общепринятыми способами, например, с помощью последовательности, согласно Kabat et al. (Wu, T. T. and Kabat E. A., J Exp Med. 132(2):211-50, (1970); Borden, P. and Kabat E. A., PNAS, 84: 2440-2443 (1987); (см. источник Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991, включенный в настоящий документ посредством ссылки), или с помощью структуры, согласно Chothia et al. (Chothia C. and Lesk A.M., J Mol Biol, 196(4): 901-917 (1987), Chothia C. et al., Nature, 342: 877-883 (1989)).

Иллюстративные примеры правил для предсказания CDR легкой цепи включают: CDR-L1 начинается приблизительно с остатка 24, ей предшествует Cys, составляет приблизительно 10-17 остатков, и за ней следует Trp (обычно Trp-Tyr-Gln, но также встречается Trp-Leu-Gln, Trp-Phe-Gln, Trp-Tyr-Leu); CDR-L2 начинается приблизительно через 16 остатков после окончания CDR-L1, ей обычно предшествует Ile-Tyr, но также встречается Val-Tyr, Ile-Lys, Ile-Phe, и она составляет 7 остатков; и CDR-L3 начинается приблизительно через 33 остатка после окончания CDR-L2, ей предшествует Cys, она составляет 7-11 остатков, и за ней следует Phe-Gly-XXX-Gly (XXX представляет собой любую аминокислоту) [SEQ ID NO:73].

Иллюстративные примеры правил для предсказания CDR тяжелой цепи включают: CDR-H1 начинается приблизительно с остатка 26, ей предшествует Cys-XXX-XXX-XXX (SEQ ID NO: 74), она составляет 10-12 остатков и за ней следует Trp (обычно Trp-Val, но также встречается Trp-Ile, Trp-Ala); CDR-H2 начинается приблизительно через 15 остатков после окончания CDR-H1, ей обычно предшествует

Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (SEQ ID NO: 75) или ряд вариаций, она составляет 16-19 остатков, и за ней следует Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala; и CDR-H3 начинается приблизительно через 33 остатка после окончания CDR-H2, ей предшествует Cys-XXX-XXX (обычно Cys-Ala-Arg), она составляет от 3 до 25 остатков, и за ней следует Trp-Gly-XXX-Gly (SEQ ID NO: 76).

В одном из вариантов осуществления CDR легкой цепи и CDR тяжелой цепи определены способом согласно Kabat.

В одном из вариантов осуществления CDR легкой цепи и CDR2 и CDR3 тяжелой цепи определены способом согласно Kabat, а CDR1 тяжелой цепи определена способом AbM, который представляет собой компромисс между способами согласно Kabat и Clothia, см., например, Whitelegg N & Rees AR, Protein Eng. 2000 Dec; 13(12):819-24 и Methods Mol Biol. 2004; 248:51-91. Программы для прогнозирования расположения CDR являются общедоступными, например, AbYsis (www.bioinf.org.uk/abysis/).

Последовательности каркасных областей различных легких или тяжелых цепей относительно консервативны в пределах вида, такого как человек. Каркасная область антитела, то есть объединенные каркасные области составляющих легкой и тяжелой цепей, служит для локализации и выравнивания CDR в трехмерном пространстве. CDR главным образом ответственны за связывание с эпитопом антигена. CDR каждой цепи обычно обозначают как CDR1, CDR2 и CDR3, пронумерованные последовательно, начиная с N-конца, и также обычно идентифицируют указанием цепи, в которой находится конкретная CDR. Таким образом, CDR, расположенные в переменном домене тяжелой цепи антитела, обозначают как CDRH1, CDRH2 и CDRH3, тогда как CDR, расположенные в переменном домене легкой цепи антитела, обозначают как CDRL1, CDRL2, и CDRL3. Антитела с разной специфичностью (т. е. с разными связывающими сайтами для разных антигенов) имеют разные CDR. Хотя именно CDR различаются у разных антител, только ограниченное число положений аминокислот в CDR непосредственно участвует в связывании антигена. Эти положения в CDR называются остатками, определяющими специфичность (SDR).

Упоминания "VL" или "VL" относятся к переменной области легкой цепи иммуноглобулина, включая переменную область легкой цепи антитела, Fv, scFv, dsFv, Fab или другого фрагмента антитела, как описано в настоящем документе.

Упоминания "VH" или "VH" относятся к переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая переменную область тяжелой цепи антитела, Fv, scFv, dsFv, Fab или другого фрагмента антитела, как описано в настоящем документе.

"Моноклональное антитело" представляет собой антитело, продуцируемое одним клоном В-лимфоцитов или клеткой, в которую были трансфицированы гены легкой и тяжелой цепи одного антитела. Моноклональные антитела получают способами, известными специалистам в данной области техники, например, путем получения гибридных антителообразующих клеток путем слияния клеток миеломы с иммунокомпетентными клетками селезенки. Моноклональные антитела включают гуманизированные моноклональные антитела.

"Химерное антитело" имеет каркасные остатки от одного вида, такого как человек, и CDR (которые обычно обеспечивают возможность связывания антигена) от другого вида, такого как мышь. В частных предпочтительных вариантах осуществления антигенспецифический связывающий домен представляет собой химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В частных вариантах осуществления антитело представляет собой человеческое антитело (такое как человеческое моноклональное антитело) или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с антигеном-мишенью. Человеческие антитела могут быть сконструированы путем объединения последовательности(ей) переменного домена клона Fv, выбранных из библиотек фагового дисплея человека, с известной(ыми) последовательностью(ями) человеческого константного домена, как описано выше. В качестве альтернативы, человеческие моноклональные антитела могут быть получены гибридной технологией. Клеточные линии человеческой миеломы и гетерогридомы мыши и человека для получения человеческих моноклональных антител были описаны, например, Kozbor J. Immunol, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, с. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); и Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991). Кроме того, для получения полного репертуара человеческих антител можно использовать трансгенных животных (например, мышей) при отсутствии продукции эндогенных иммуноглобулинов. См., например, Jakobovits et al., PNAS USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol, 7: 33 (1993). Для получения человеческих антител из антител нечеловеческого происхождения, например, антител грызунов, в случае, когда человеческое антитело имеет схожие аффинности и специфичности с исходным антителом нечеловеческого происхождения, может быть использована перестановка генов. См. публикацию заявки PCT WO 93/06213, опубликованную 1 апреля 1993 г. В отличие от традиционной гуманизации антител нечеловеческого происхождения с помощью прививки CDR эта методика позволяет получать полностью человеческие антитела, которые не имеют остатков FR или CDR нечеловеческого происхождения.

"Гуманизированное" антитело представляет собой иммуноглобулин, включающий каркасную область человека и одну или более CDR иммуноглобулина нечеловеческого происхождения (например, мышиного, крысиного или синтетического). Иммуноглобулин нечеловеческого происхождения, являю-

щийся источником CDR, называют "донором", а человеческий иммуноглобулин, являющийся источником каркаса, называют "акцептором". В одном из вариантов осуществления все CDR в гуманизированном иммуноглобулине происходят из иммуноглобулина-донора. Константные области не обязательно должны присутствовать, но в случае, если они присутствуют, они должны быть по существу идентичны человеческим константным областям, то есть, идентичны им по меньшей мере приблизительно на 85-90%, например, приблизительно на 95% или более. Следовательно, все части гуманизированного иммуноглобулина, за исключением, возможно, CDR, по существу идентичны соответствующим частям последовательностей природного человеческого иммуноглобулина.

Гуманизированные или другие моноклональные антитела могут иметь дополнительные консервативные аминокислотные замены, которые по существу не влияют на связывание антигена или другие функции иммуноглобулина. Гуманизированные антитела могут быть сконструированы с помощью генной инженерии (см., например, патент США № 5585089).

Термин "верблюжье Ig" или "VHH верблюдовых" в контексте настоящего документа относится к наименьшей известной антигенсвязывающей единице антитела из тяжелой цепи (Koch-Nolte et al., FASEB J., 21: 3490-3498 (2007)). "Антитело из тяжелой цепи" или "антитело верблюдовых" относится к антителу, которое содержит два домена VH и не содержит легких цепей (Riechmann L. et al., J. Immunol. Methods 231:25-38 (1999); WO 94/04678; WO 94/25591; патент США № 6005079).

"IgNAR" или "иммуноглобулиновый новый антигенный рецептор" относится к классу антител из иммунного репертуара акулы, состоящих из гомодимеров одного переменного домена нового антигенного рецептора (VNAR) и пяти константных доменов нового антигенного рецептора (CNAR). IgNAR представляют собой одни из самых маленьких известных белковых каркасов на основе иммуноглобулина и являются высоко стабильными и обладают эффективными характеристиками связывания. Свойственная им стабильность может быть связана с (i) нижележащим каркасом Ig, который содержит значительное количество заряженных и гидрофильных расположенных на поверхности остатков по сравнению с обычными доменами VH и VL антител из мышинных антител; и (ii) стабилизирующими структурными особенностями в петлях областей, определяющих комплементарность (CDR), включая межпетлевые дисульфидные мостики и структуры внутриветлевых водородных связей.

При расщеплении антител папаином образуются два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых "Fab"-фрагментами, каждый из которых имеет один антигенсвязывающий сайт, и остаточный "Fc"-фрагмент, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином дает фрагмент F(ab')₂, который имеет два антигенсвязывающих сайта и все еще способен к перекрестному связыванию антигена.

"Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, содержащий полный антигенсвязывающий сайт. В одном из вариантов осуществления двухцепочечный вид Fv состоит из димера одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи, объединенных тесной нековалентной связью. У одноцепочечных видов Fv (scFv) один переменный домен тяжелой цепи и один переменный домен легкой цепи могут быть ковалентно связаны гибким пептидным линкером, так что легкая и тяжелая цепи могут объединяться в "димерную" структуру, аналогичную структуре двухцепочечных видов Fv. Именно в этой конфигурации три гиперпеременные области (HVR) каждого переменного домена взаимодействуют, образуя антигенсвязывающий сайт на поверхности димера VH-VL. В совокупности шесть HVR придают антителу антигенсвязывающую специфичность. Однако даже один переменный домен (или половина Fv, содержащая только три HVR, специфичных к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем целый сайт связывания.

Fab-фрагмент содержит переменные домены тяжелой и легкой цепей, а также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов добавлением нескольких остатков на карбоксиконце домена CH1 тяжелой цепи, включая один или более остатков пистеина из шарнирной области антитела. Fab'-SH в настоящем документе обозначает Fab', в котором остаток(тки) пистеина константных доменов несут свободную тиольную группу. F(ab')₂-фрагменты антител первоначально были получены в виде пар Fab'-фрагментов, имеющих между собой шарнирные остатки пистеина. Известны также другие химические сочетания фрагментов антител.

Термин "диатела" относится к фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), связанный с переменным доменом легкой цепи (VL) в одной и той же полипептидной цепи (VH-VL). Используя линкер, который является слишком коротким, чтобы обеспечить связывание двух доменов в пары в одной и той же цепи, домены вынуждают связываться с комплементарными доменами другой цепи и образовывать два антигенсвязывающих сайта. Диатела могут быть двухвалентными или биспецифическими. Более полное описание диател содержится, например, в EP 404097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003) и Hollinger et al., PNAS USA 90: 6444-6448 (1993). Триатела и тетраатела также описаны в Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

"Однодоменное антитело", или "sdAb", или "нанотело" относится к фрагменту антитела, состояще-

му из варибельной области тяжелой цепи антитела (домена VH) или варибельной области легкой цепи антитела (домена VL) (Holt L., et al., Trends in Biotechnology, 21(11): 484-490).

"Одноцепочечные Fv" или "scFv"-фрагменты антитела содержат домены VH и VL антитела, причем эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи и в любой ориентации (например, VL-VH или VH-VL). Обычно полипептид scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет scFv образовывать желаемую структуру для связывания антигена. Обзор scFv можно найти, например, в The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Pluckthün, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), с. 269-315.

Одноцепочечные антитела могут быть клонированы из генов V-области гибридомы, специфичной к желаемой мишени. Получение таких гибридом стало рутинной операцией. Методика, которая может быть использована для клонирования варибельной области тяжелой цепи (V_H) и варибельной области легкой цепи (V_L), была описана, например, в Orlandi et al., PNAS, 1989; 86: 3833-3837.

"Линкер" относится к множеству аминокислотных остатков между различными полипептидными доменами, например, между доменами V_H и V_L , добавленных для получения необходимых промежутков и конформации молекулы. В частных вариантах осуществления линкер представляет собой линкерную последовательность варибельной области. "Линкерная последовательность варибельной области" представляет собой аминокислотную последовательность, связывающую домены V_H и V_L и выполняющую функцию спейсера, совместимую с взаимодействием двух субсвязывающих доменов, так что полученный полипептид сохраняет специфическую аффинность связывания с той же молекулой-мишенью, с которой связывается антитело, содержащее такие же варибельные области легкой и тяжелой цепи. В частных вариантах осуществления линкер разделяет один или более варибельных доменов тяжелой или легкой цепи, шарнирных доменов, доменов мультимеризации, трансмембранных доменов, костимулирующих доменов и/или первичных сигнальных доменов.

Иллюстративные примеры линкеров, подходящих для применения в частных вариантах осуществления, рассматриваемых в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленным, следующие аминокислотные последовательности: GGG; DGGGS (SEQ ID NO: 36); TGEKP (SEQ ID NO: 37) (см., например, Liu et al, PNAS 5525-5530 (1997)); GGRR (SEQ ID NO: 38) (Pomerantz et al. 1995, выше); (GGGG)_n, где n = 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 39) (Kim et al., PNAS 93, 1156-1160 (1996.); EGKSSGSGS-ESKVD (SEQ ID NO: 40) (Chaudhary et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070); KESGVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 41) (Bird et al., 1988, Science 242:423-426), GGRRGGGS (SEQ ID NO: 42); LRQRDGERP (SEQ ID NO: 43); LRQKDGGSERP (SEQ ID NO: 44); LRQKD(GGG)₂ERP (SEQ ID NO: 45). В качестве альтернативы, гибкие линкеры могут быть рациональным образом сконструированы с использованием компьютерной программы, способной моделировать как сайты связывания ДНК, так и сами пептиды (Desjarlais & Berg, PNAS 90:2256-2260 (1993), PNAS 91:11099-11103 (1994), или с использованием методов фагового дисплея. В одном из вариантов осуществления линкер содержит следующую аминокислотную последовательность: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 46) (Cooper et al., Blood, 101(4): 1637-1644 (2003)).

"Спейсерный домен" относится к полипептиду, разделяющему два домена. В одном из вариантов осуществления спейсерный домен перемещает антигенсвязывающий домен от поверхности эффекторных клеток для обеспечения надлежащего контакта между клетками, связывания антигена и активации (Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). В частных вариантах осуществления спейсерный домен разделяет один или более варибельных доменов тяжелой или легкой цепи, доменов мультимеризации, трансмембранных доменов, костимулирующих доменов и/или первичных сигнальных доменов. Спейсерный домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. В отдельных вариантах осуществления спейсерный домен представляет собой часть иммуноглобулина, включая, не ограничиваясь перечисленным, одну или более константных областей тяжелой цепи, например, CH2 и CH3. Спейсерный домен может включать аминокислотную последовательность природной шарнирной области иммуноглобулина или измененной шарнирной области иммуноглобулина.

"Шарнирный домен" относится к полипептиду, играющему роль в перемещении антигенсвязывающего домена от поверхности эффекторных клеток для обеспечения надлежащего контакта между клетками, связывания антигена и активации. В частных вариантах осуществления полипептиды могут содержать один или более шарнирных доменов между связывающим доменом и доменом мультимеризации, между связывающим доменом и трансмембранным доменом (ТМ) или между доменом мультимеризации и трансмембранным доменом. Шарнирный домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. Шарнирный домен может включать аминокислотную последовательность природной шарнирной области иммуноглобулина или измененной шарнирной области иммуноглобулина.

"Измененная шарнирная область" относится к (а) природной шарнирной области, содержащей до 30% изменений аминокислот (например, до 25, 20, 15, 10 или 5% аминокислотных замен или делений), (b) части природной шарнирной области, длина которой составляет по меньшей мере 10 аминокислот (например, по меньшей мере 12, 13, 14 или 15 аминокислот), содержащей до 30% изменений аминокис-

лот (например, до 25, 20, 15, 10 или 5% аминокислотных замен или делепий), или (с) части природной шарнирной области, содержащей коровую шарнирную область (длина которой может составлять 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15, или по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот). В отдельных вариантах осуществления один или более остатков пистеина в природной шарнирной области иммуноглобулина могут быть заменены одним или несколькими другими аминокислотными остатками (например, одним или несколькими остатками серина). В качестве альтернативы или дополнительно, остаток пролина шарнирной области иммуноглобулина дикого типа в измененной шарнирной области иммуноглобулина может быть заменен другим аминокислотным остатком (например, остатком серина).

Термин "домен мультимеризации" в контексте настоящего документа относится к полипептиду, который преимущественно взаимодействует или ассоциирует с другим, отличным полипептидом напрямую или через мостиковую молекулу, где взаимодействие различных доменов мультимеризации по существу способствует мультимеризации или эффективно ее стимулирует (т.е. образование димера, тримера или многокомпонентного комплекса, который может представлять собой гомодимер, гетеродимер, гомотример, гетеротример, гомомультимер, гетеромультимер). Домен мультимеризации может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника.

Иллюстративные примеры доменов мультимеризации, подходящих для применения в частных вариантах осуществления, рассматриваемых в настоящем документе, включают полипептид FKBP, полипептид FRB, полипептид кальциневрина, полипептид пиклофилина, бактериальный полипептид DHFR, полипептид PYL1, полипептид ABI1, полипептид GIB1, полипептид GAI или их варианты.

"Мостиковый фактор" относится к молекуле, которая ассоциирует с и расположена между двумя или более доменами мультимеризации. В частных вариантах осуществления домены мультимеризации по существу способствуют образованию полипептидного комплекса или эффективно его стимулируют только в присутствии мостикового фактора. В частных вариантах осуществления домены мультимеризации не способствуют образованию полипептидного комплекса или не стимулируют его эффективным образом в отсутствие мостикового фактора. Иллюстративные примеры мостиковых факторов, подходящих для применения в частных вариантах осуществления, рассматриваемых в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленным, рапамицин (сиролимус) или его рапалог, кумермицин или его производное, гиббереллин или его производное, абсцизовую кислоту (ABA) или ее производное, метотрексат или его производное, циклоспорин А или его производное, FKCsA или его производное, триметоприм (Tmr) - синтетический лиганд для FKBP (SLF) или его производное, или любую их комбинацию.

Аналоги рапамицина (рапалоги) включают, не ограничиваясь перечисленным, раскрытые в патенте США № 6649595, при этом структуры рапалогов, раскрытые в данном документе, включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. В отдельных вариантах осуществления изобретения мостиковый фактор представляет собой рапалог с по существу сниженным иммуносупрессивным действием по сравнению с рапамицином. В предпочтительном варианте осуществления рапалог представляет собой производные AP21967 (также известное как C-16(S)-7-метилиндолрапамипин, IC₅₀ = 10 нМ, химически модифицированный неиммуносупрессивный аналог рапамицина).

"По существу сниженное иммуносупрессивное действие" относится к иммуносупрессивному действию, составляющему по меньшей мере в 0,1-0,005 раз меньше, чем наблюдаемое или ожидаемое для такой же дозы, измеренному в клинических условиях или на подходящей *in vitro* (например, ингибирование Т-клеточной пролиферации) или *in vivo* модели иммуносупрессивной активности у человека.

В контексте настоящего документа термин "якорный домен" относится к аминокислотной последовательности или другой молекуле, способствующей закреплению, прикреплению или ассоциации димеризуемого рецептора с поверхностью клетки. Типичные якорные домены включают аминокислотную последовательность со структурой, стабильной в клеточной мембране, или аминокислотную последовательность, способствующую добавлению гликолипида (также известного как гликозилфосфатидилинозитола или GPI), или тому подобное. В отдельных вариантах осуществления якорный домен представляет собой гидрофобный домен (например, трансмембранный домен) или сигнальную последовательность GPI. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, рассматриваемый в настоящем документе, содержит якорный домен, где якорный домен необязательно представляет собой молекулу GPI.

"Трансмембранный домен" или "ТМ домен" представляет собой домен, прикрепляющий полипептид к плазматической мембране клетки. ТМ домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника.

"Внутриклеточный сигнальный домен" относится к части белка, которая преобразует сигнал, регулирующий эффекторную функцию, и направляет клетку на выполнение специализированной функции. Хотя обычно можно использовать целый внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях в этом нет необходимости. Если используется усеченная часть внутриклеточного сигнального домена, такая усеченная часть может использоваться вместо целого домена при условии, что она преобразует сигнал, регулирующий эффекторную функцию. Подразумевается, что термин "внутриклеточный сигнальный

домен" включает любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для преобразования сигнала, регулирующего эффекторную функцию.

Термин "эффекторная функция" или "функция эффекторных клеток" относится к специализированной функции иммунной эффекторной клетки. Эффекторная функция включает, не ограничиваясь перечисленным, активацию, продукцию цитокинов, пролиферацию и питотоксическую активность, включая высвобождение питотоксических факторов, или другие клеточные ответы, вызванные связыванием антигена с рецептором, экспрессируемым на иммунной эффекторной клетке.

Известно, что одних сигналов, генерируемых через TCR, недостаточно для полной активации Т-клеток, и также необходим вторичный или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация Т-клеток опосредована двумя различными классами внутриклеточных сигнальных доменов: первичными сигнальными доменами, которые инициируют антигензависимую первичную активацию через TCR (например, комплекс TCR/CD3), и костимулирующими сигнальными доменами, которые действуют независимым от антигена образом, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал.

"Первичный сигнальный домен" относится к сигнальному домену, регулирующему первичную активацию комплекса TCR либо стимулирующим, либо ингибирующим образом. Первичные сигнальные домены, действующие стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, известные как иммунорецепторные тирозин-активируемые мотивы или ITAM. Иллюстративные примеры ITAM, содержащих первичные сигнальные домены, подходящие для применения в частных вариантах осуществления, включают, не ограничиваясь перечисленным, полученные из FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

В контексте настоящего документа термин "костимулирующий сигнальный домен" или "костимулирующий домен" относится к внутриклеточному сигнальному домену костимулирующей молекулы. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличные от антигенных рецепторов или Fc-рецепторов, обеспечивающие второй сигнал, необходимый для эффективной активации и функционирования Т-лимфоцитов при связывании с антигеном. Иллюстративные примеры таких костимулирующих молекул, из которых могут быть выделены костимулирующие домены, включают, не ограничиваясь перечисленным: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM и ZAP70.

"Иммунное нарушение" относится к заболеванию, вызывающему ответ иммунной системы. В частных вариантах осуществления термин "иммунное нарушение" относится к раку, аутоиммунному заболеванию или иммунодефициту. В одном из вариантов осуществления иммунные нарушения охватывают инфекционное заболевание.

В контексте настоящего документа термин "рак" в общем относится к классу заболеваний или состояний, при которых патологические клетки бесконтрольно делятся и могут проникать в близлежащие ткани.

В контексте настоящего документа термин "злокачественный" относится к раку, при котором группа опухолевых клеток демонстрирует одно или более из неконтролируемого роста (т.е. деления, превышающего пределы нормы), инвазии (т.е. проникновения в соседние ткани и их разрушения) и метастазирования (т.е. распространения в другие области тела через лимфу или кровь). В контексте настоящего документа термин "метастазирование" относится к распространению рака из одной части тела в другую. Опухоль, образованная распространившимися клетками, называется "метастатической опухолью" или "метастазом". Метастатическая опухоль содержит клетки, подобные клеткам исходной (первичной) опухоли.

В контексте настоящего документа термин "доброкачественный" или "незлокачественный" относится к опухолям, которые могут увеличиваться в размерах, но не распространяются в другие части тела. Доброкачественные опухоли самоограничены и обычно не распространяются и не метастазируют.

"Раковая клетка" относится к отдельной клетке ракового образования или ткани. Раковые клетки включают как солидные раковые заболевания, так и гемобласты. "Опухоль" или "опухолевая клетка" в общем относится к опуханию или очагу, образовавшимся в результате патологического роста клеток, который может быть доброкачественным, предзлокачественным или злокачественным. Большинство раковых заболеваний образуют опухоли, но гемобласты, например, лейкоз, не обязательно образуют опухоли. Для тех раковых заболеваний, которые образуют опухоли, термины рак (раковая клетка) и опухоль (опухолевая клетка) используются взаимозаменяемо. Величина опухоли у индивидуума представляет собой "опухолевую нагрузку", которая может быть измерена как количество, объем или масса опухоли.

Термин "рецидив" относится к диагнозу возвращения или признакам и симптомам возвращения рака после периода улучшения или ремиссии.

"Ремиссия" также называется "клинической ремиссией" и включает как частичную, так и полную ремиссию. При частичной ремиссии исчезают некоторые, но не все признаки и симптомы рака. При полной ремиссии исчезают все признаки и симптомы рака, хотя рак все еще может находиться в организме.

"Рефрактерный" относится к раку, устойчивому к или не отвечающему на терапию конкретным терапевтическим агентом. Рак может быть невосприимчивым с самого начала лечения (т.е. не отвечающим на первоначальное воздействие терапевтического агента) или в результате развития устойчивости к терапевтическому агенту, либо в течение первого периода лечения, либо в течение последующего периода лечения.

"Антиген-отрицательный" относится к клетке, не экспрессирующей антиген или экспрессирующей незначительное количество антигена, которое невозможно обнаружить. В одном из вариантов осуществления антиген-отрицательные клетки не связывают рецепторы, направленные на антиген. В одном из вариантов осуществления антиген-отрицательные клетки по существу не связывают рецепторы, направленные на антиген.

"Аутоиммунное заболевание" относится к заболеванию, при котором организм производит иммунный ответ (т.е. ответ иммунной системы) на некоторую составляющую своей собственной ткани. Другими словами, иммунная система теряет свою способность распознавать некоторую ткань или систему в организме как "себя", считает ее мишенью и атакует ее, как если бы она была чужеродной. Аутоиммунные заболевания можно классифицировать на те, при которых поражается преимущественно один орган (например, гемолитическая анемия и аутоиммунный тиреоидит), и на те, при которых процесс аутоиммунного заболевания распространяется на многие ткани (например, системная красная волчанка). Например, полагают, что рассеянный склероз вызван поражением Т-клетками оболочек, окружающих нервные волокна головного и спинного мозга. Это приводит к потере координации, слабости и нечеткому зрению. Аутоиммунные заболевания известны в данной области техники и включают, например, тиреоидит Хашимото, болезнь Грейвса, волчанку, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, гемолитическую анемию, аутоиммунный тиреоидит, системную красную волчанку, целиакию, болезнь Крона, колит, диабет, склеродермию, псориаз и тому подобное.

"Иммунодефицит" означает состояние пациента, иммунная система которого была нарушена в результате заболевания или введения химических веществ. Это состояние вызывает дефицит количества и типов клеток крови в системе, необходимых для защиты от инородного вещества. Иммунодефицитные состояния или заболевания известны в данной области техники и включают, например, СПИД (синдром приобретенного иммунодефицита), ТКИД (тяжелый комбинированный иммунодефицит), селективный дефицит IgA, переменный неклассифицируемый иммунодефицит, X-сцепленную агаммаглобулинемию, хроническую гранулематозную болезнь, синдром гипер-IgM и диабет.

"Инфекционное заболевание" относится к заболеванию, которое может передаваться от человека к человеку или от организма к организму и вызывается микробным или вирусным агентом (например, острые респираторные вирусные инфекции). Инфекционные заболевания известны в данной области техники и включают, например, гепатит, заболевания, передаваемые половым путем (например, хламидиоз, гонорею), туберкулез, ВИЧ/СПИД, дифтерию, гепатит В, гепатит С, холеру и грипп.

В контексте настоящего документа термины "индивидуум" и "субъект" часто используются взаимозаменяемо и относятся к любому животному, демонстрирующему симптом рака или другого иммунного нарушения, подлежащего лечению с помощью композиций и способов, рассматриваемых в других частях настоящего документа. Подходящие субъекты (например, пациенты) включают лабораторных животных (таких как мышь, крыса, кролик или морская свинка), сельскохозяйственных животных и домашних животных или питомцев (таких как кошка или собака). Включены приматы, не являющиеся людьми, и, предпочтительно, пациенты-люди. Типичные субъекты включают пациентов-людей, у которых есть, был диагностирован рак или другое иммунное нарушение, или существует риск его развития.

В контексте настоящего документа термин "пациент" относится к субъекту, у которого был диагностирован рак или другое иммунное нарушение, подлежащее лечению с помощью композиций и способов, раскрытых в других частях настоящего документа.

В контексте настоящего документа термин "лечение" или "лечить" включает любое полезное или желательное воздействие на симптомы или патологию заболевания или патологического состояния и может включать даже минимальное снижение одного или более измеримых маркеров заболевания или состояния, подлежащего лечению. Лечение необязательно может включать ослабление заболевания или состояния или задержку развития заболевания или состояния, например, задержку роста опухоли. "Лечение" не обязательно указывает на полное устранение или излечение заболевания или состояния, или связанных с ними симптомов.

В контексте настоящего документа "предупреждать" и подобные слова, такие как "предотвращенный", "предотвращение" и т. д. обозначают подход для предотвращения, ингибирования или уменьшения вероятности возникновения или рецидива заболевания или состояния. Они также относятся к задержке развития или рецидива заболевания или состояния, или задержке появления или рецидива симптомов заболевания или состояния. В контексте настоящего документа "предотвращение" и подобные слова также включают уменьшение интенсивности, действия, симптомов и/или бремени заболевания или состояния до развития или рецидива заболевания или состояния.

В контексте настоящего документа выражение "уменьшение интенсивности по меньшей мере одного симптома" относится к уменьшению одного или более симптомов заболевания или состояния, которое

лечат у субъекта. В частных вариантах осуществления заболевание или состояние, подлежащее лечению, представляет собой рак, при котором один или более симптомов, интенсивность которых уменьшают, включают, не ограничиваясь перечисленным, слабость, утомляемость, одышку, легко появляющиеся кровоподтеки и кровотечения, частые инфекции, увеличенные лимфатические узлы, вздутый или болезненный живот (из-за увеличенных органов брюшной полости), боль в костях или суставах, переломы, незапланированную потерю массы тела, плохой аппетит, ночную потливость, постоянную легкую лихорадку и сниженное мочеиспускание (из-за нарушения функции почек).

Под "усилением", или "активацией", или "увеличением", или "развитием" обычно подразумевается способность композиции, рассматриваемой в настоящем документе, генерировать, порождать или вызывать больший физиологический ответ (т.е. последующие эффекты) по сравнению с ответом, вызываемым носителем или контрольной молекулой/композицией. Измеримый физиологический ответ может включать увеличение размножения, активации, персистенции Т-клеток, секреции цитокинов и/или увеличение способности уничтожать раковые клетки, среди прочих эффектов, очевидных из общих знаний в данной области техники и описания в настоящем документе. "Увеличенное" или "повышенное" количество обычно представляет собой "статистически значимое" количество и может включать увеличение в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 или более раз (например, 500, 1000 раз) (включая все целые и десятичные числа между указанными, превышающие 1, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т.д.) по сравнению с ответом, вызываемым наполнителем или контрольной композицией.

Под "понижением", или "снижением", или "уменьшением", или "сокращением", или "ослаблением" обычно подразумевается способность композиции, рассматриваемой в настоящем документе, генерировать, порождать или вызывать меньший физиологический ответ (т.е. последующие эффекты) по сравнению с ответом, вызываемым носителем или контрольной молекулой/композицией. "Сниженное" или "сокращенное" количество обычно представляет собой "статистически значимое" количество и может включать снижение в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 или более раз (например, 500, 1000 раз) (включая все целые и десятичные числа между указанными, превышающие 1, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т.д.) по сравнению с ответом (референсным ответом), вызываемым наполнителем, контрольной композицией, или ответом в определенной линии клеток.

Под "поддержанием", или "сохранением", или "поддерживанием", или "без изменений", или "без существенных изменений", или "без существенного снижения" обычно подразумевается способность композиции, рассматриваемой в настоящем документе, генерировать, порождать или вызывать по существу схожий или сопоставимый физиологический ответ (т.е. последующие эффекты) в клетке по сравнению с ответом, вызываемым наполнителем, контрольной молекулой/композицией, или ответом в определенной линии клеток. Сопоставимый ответ представляет собой ответ, который по существу не отличается или не отличается в измеримой степени от референсного ответа.

С. Преобразователи сигналов TGFβ (химерные рецепторы TGFβ)

В частных вариантах осуществления рассматривается преобразователь сигналов TGFβ, преобразующий иммуностимулирующий сигнал под воздействием TGFβ, включая, но не ограничиваясь перечисленным, TGFβ1. В контексте настоящего документа термин "преобразователь сигналов TGFβ" относится к одному или более не встречающимся в природе полипептидам, которые преобразуют иммуносупрессивные сигналы TGFβ из микроокружения опухоли в иммуностимулирующие сигналы в Т-клетке, например, стимулирующие активность и функцию иммунных эффекторных клеток, увеличивающие продукцию и/или секрецию провоспалительных цитокинов. В частных вариантах осуществления термин "преобразователь сигналов TGFβ" используется взаимозаменяемо с термином "химерный(ые) рецептор(ы) TGFβ", или "СТBR", или "преобразователь сигналов СТBR".

В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов СТBR представляет собой полипептид, содержащий внеклеточный TGFβ-связывающий домен TGFβR2, трансмембранный домен, внутриклеточный сигнальный домен иммунного рецептора, включая, не ограничиваясь перечисленным, цитокиновый рецептор, рецептор интерлейкина, образ-распознающий рецептор и толл-подобный рецептор; сигнал расщепления полипептида; и внеклеточный TGFβ-связывающий домен TGFβR1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен иммунного рецептора, включая, не ограничиваясь перечисленным, цитокиновый рецептор, рецептор интерлейкина, образ-распознающий рецептор и толл-подобный рецептор.

В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов СТBR представляет собой слитый полипептид, содержащий первый полипептид, содержащий внеклеточный TGFβ-связывающий домен TGFβR2, трансмембранный домен, внутриклеточный сигнальный домен иммунного рецептора, включая, не ограничиваясь перечисленным, цитокиновый рецептор, рецептор интерлейкина, образ-распознающий рецептор и толл-подобный рецептор; сигнал расщепления полипептида; и второй полипептид, содержащий внеклеточный TGFβ-связывающий домен TGFβR1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен иммунного рецептора, включая, не ограничиваясь перечисленным, цитокиновый рецептор, рецептор интерлейкина, образ-распознающий рецептор и толл-подобный рецептор.

В других частных вариантах осуществления преобразователь сигналов СТBR представляет собой

комплекс полипептидов, содержащий полипептид, содержащий внеклеточный TGF β -связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен иммунного рецептора, включая, не ограничиваясь перечисленным, цитокиновый рецептор, рецептор интерлейкина, образ-распознающий рецептор и толл-подобный рецептор; и полипептид, содержащий внеклеточный TGF β -связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен иммунного рецептора, включая, не ограничиваясь перечисленным, цитокиновый рецептор, рецептор интерлейкина, образ-распознающий рецептор и толл-подобный рецептор.

В контексте настоящего документа термин "иммунный рецептор" относится к рецептору, экспрессируемому на поверхности иммунной клетки, модулирующей иммунный ответ при связывании распознанного лиганда. Иммунные рецепторы, подходящие для применения в частных вариантах осуществления, включают, не ограничиваясь перечисленным: цитокиновые рецепторы, рецепторы интерлейкинов, образ-распознающие рецепторы и толл-подобные рецепторы, где передача сигналов через иммунный рецептор стимулирует иммунный ответ.

Иллюстративные примеры иммунорецепторных трансмембранных и внутриклеточных сигнальных доменов, которые могут применяться в частных вариантах осуществления, рассматриваемых в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленным, трансмембранные и внутриклеточные сигнальные домены, выделенные из рецептора IL-12, рецептора IL-7, рецептора IL-15, рецептора IL-21, рецептора IL-2, рецептора IL-1, рецептора IL-18, рецептора IL-36, рецептора IFN I типа, рецептора TLR1, рецептора TLR2, рецептора TLR3, рецептора TLR4, рецептора TLR5, рецептора TLR6, рецептора TLR7, рецептора TLR8, рецептора TLR9 или рецептора TLR10.

Дополнительные иллюстративные примеры иммунорецепторных трансмембранных и внутриклеточных сигнальных доменов, которые могут применяться в частных вариантах осуществления, рассматриваемых в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленным, трансмембранные и внутриклеточные сигнальные домены, выделенные из IL-12R β 2, IL-7R α , IL-2R γ , IL-2R β , IL-21R, IL-18R1, IL-18RAP, IL-1R1, IL-1RAP, IFNAR1, IFNAR2, IL-1RL2, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 или TLR10.

Иллюстративные примеры трансмембранных и внутриклеточных сигнальных доменов цитокиновых рецепторов, которые могут применяться в частных вариантах осуществления, рассматриваемых в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленным, трансмембранные и внутриклеточные сигнальные домены, выделенные из IL-12R β 2, IL-7R α , IL-2R γ , IL-2R β , IL-21R, IL-18R1, IL-18RAP, IL-1R1, IL-1RAP, IFNAR1, IFNAR2 и IL-1RL2.

Иллюстративные примеры трансмембранных и внутриклеточных сигнальных доменов рецепторов интерлейкинов, которые могут применяться в частных вариантах осуществления, рассматриваемых в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленным, трансмембранные и внутриклеточные сигнальные домены, выделенные из IL-12R β 2, IL-7R α , IL-2R γ , IL-2R β , IL-21R, IL-18R1, IL-18RAP, IL-1R1, IL-1RAP и IL-1RL2.

Иллюстративные примеры трансмембранных и внутриклеточных сигнальных доменов толл-подобных рецепторов, которые могут применяться в частных вариантах осуществления, рассматриваемых в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленным, трансмембранные и внутриклеточные сигнальные домены, выделенные из TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 и TLR10.

1. Преобразователь сигналов CTBR12

Интерлейкин-12 (IL-12) представляет собой цитокин, стимулирующий функцию и активность Т-клеток, в том числе, путем увеличения экспрессии IFN γ , увеличения пролиферации Т-клеток и усиления передачи сигналов IL-12. IL-12 связывает рецептор интерлейкина-12, бета 1 (IL-12R β 1, также известный как CD212) и рецептор интерлейкина-12, бета 2 (IL-12R β 2).

Передача сигналов IL-12 через IL-12R β 1 и IL-12R β 2 приводит к фосфорилированию STAT3, STAT4 и STAT5. Фосфорилированный STAT3/STAT4 транслицируется в ядро и связывает промотор IFN γ для увеличения экспрессии IFN γ . Фосфорилированный STAT4 также рекрутирует онкоген Jun (с-Jun) к промотору IFN γ для увеличения экспрессии IFN γ и усиливает передачу сигналов IL-12 посредством увеличения транскрипции IL-12R β 2. Фосфорилирование STAT5 увеличивает пролиферацию Т-клеток.

Передача сигналов IL-12 также увеличивает экспрессию рецептора интерлейкина-2, альфа (IL-2R), путем рекрутирования STAT4 и с-Jun к промотору IL-2R, тем самым усиливая пролиферацию Т-клеток.

В различных вариантах осуществления одна или более иммунных эффекторных клеток, включая иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие сконструированный антигенный рецептор, модифицированы путем введения одного или более полинуклеотидов или векторов, кодирующих преобразователь сигналов CTBR12. В различных вариантах осуществления одна или более иммунных эффекторных клеток модифицированы путем введения одного или более полинуклеотидов или векторов, кодирующих преобразователь сигналов CTBR12 и сконструированный антигенный рецептор.

В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов CTBR12 преобразует иммуносупрессивный сигнал TGF β в иммуностимулирующий сигнал, опосредованный IL-12. В частных вариантах

осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR12 содержит: внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-12Rβ1; сигнал расщепления полипептида; и внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-12Rβ2. В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR12 содержит: внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-12Rβ2; сигнал расщепления полипептида; и внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-12Rβ1.

В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR12 содержит слитый полипептид, содержащий первый полипептид, содержащий внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-12Rβ1; сигнал расщепления полипептида и второй полипептид, содержащий внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-12Rβ2. В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR12 содержит слитый полипептид, содержащий первый полипептид, содержащий внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-12Rβ2; сигнал расщепления полипептида; и второй полипептид, содержащий внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-12Rβ1.

В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов CTBR12 представляет собой комплекс полипептидов, содержащий первый полипептид, содержащий полипептид, содержащий внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-12Rβ1 и полипептид, содержащий внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-12Rβ2. В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов CTBR12 представляет собой комплекс полипептидов, содержащий первый полипептид, содержащий полипептид, содержащий внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-12Rβ2; и полипептид, содержащий внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-12Rβ1.

В отдельных вариантах осуществления полипептид содержит трансмембранный домен TGFβR1 или TGFβR2. В отдельных вариантах осуществления полипептид содержит трансмембранный домен IL-12Rβ1 или IL-12Rβ2. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR1 и трансмембранный домен IL-12Rβ1, и внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR2 и трансмембранный домен IL-12Rβ2, и внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR1 и трансмембранный домен IL-12Rβ2, и внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR2 и трансмембранный домен IL-12Rβ1, и внутриклеточный сигнальный домен.

В частных вариантах осуществления сигнал расщепления полипептида представляет собой саморасщепляющийся вирусный полипептид; более предпочтительно саморасщепляющийся вирусный полипептид 2A и более предпочтительно саморасщепляющийся вирусный полипептид, выбранный из группы, состоящей из: пептида вируса ящура (FMDV) (F2A), пептида вируса ринита лошадей A (ERAV) (E2A), пептида вируса *Thosea asigna* (TaV) (T2A), пептида тешовируса-1 свиней (PTV-1) (P2A), пептида 2A тейловируса и пептида 2A вируса энцефаломиокардита. В одном из вариантов осуществления сигнал расщепления полипептида представляет собой саморасщепляющийся вирусный полипептид P2A или T2A.

2. Преобразователь сигналов CTBR7

Интерлейкин-7 (IL-7) представляет собой цитокин, стимулирующий функцию и активность Т-клеток, в том числе, путем улучшения выживания и пролиферации предшественников Т-клеток. IL-7 связывает рецептор интерлейкина-7 альфа (IL-7Ra, также известный как CD127) и рецептор интерлейкина-2, общая гамма-цепь (IL-2Rγ, также известный как CD132 и γс). Передача сигналов IL-7 активирует сигнальные пути киназы JAK/STAT, PI-3K и Src и приводит к транскрипции антиапоптотических генов и генов, стимулирующих пролиферацию предшественников Т-клеток.

В различных вариантах осуществления одна или более иммунных эффекторных клеток, включая иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие сконструированный антигенный рецептор, модифицированы путем введения одного или более полинуклеотидов или векторов, кодирующих преобразователь сигналов CTBR7. В различных вариантах осуществления одна или более иммунных эффекторных клеток модифицированы путем введения одного или более полинуклеотидов или векторов, кодирующих преобразователь сигналов CTBR7 и сконструированный антигенный рецептор.

В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов TGF β преобразует иммуносупрессивный сигнал TGF β в иммуностимулирующий сигнал, опосредованный IL-7. В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR7 содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-7R α ; сигнал расщепления полипептида и внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R γ . В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR7 содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R γ ; сигнал расщепления полипептида и внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-7R α .

В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR7 содержит слитый полипептид, содержащий первый полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-7R α ; сигнал расщепления полипептида и второй полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R γ . В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR7 содержит слитый полипептид, содержащий первый полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R γ ; сигнал расщепления полипептида; и второй полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-7R α .

В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов CTBR7 представляет собой комплекс полипептидов, содержащий первый полипептид, содержащий полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-7R α ; и полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R γ . В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов CTBR7 представляет собой комплекс полипептидов, содержащий первый полипептид, содержащий полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R γ ; и полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-7R α .

В отдельных вариантах осуществления полипептид содержит трансмембранный домен TGF β R1 или TGF β R2. В отдельных вариантах осуществления полипептид содержит трансмембранный домен IL-7R α или IL-2R γ . В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1 и трансмембранный домен IL-7R α , и внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2 и трансмембранный домен IL-2R γ , и внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1 и трансмембранный домен IL-2R γ , и внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2 и трансмембранный домен IL-7R α , и внутриклеточный сигнальный домен.

В частных вариантах осуществления сигнал расщепления полипептида представляет собой саморасщепляющийся вирусный полипептид; более предпочтительно, саморасщепляющийся вирусный полипептид 2A; и более предпочтительно, саморасщепляющийся вирусный полипептид, выбранный из группы, состоящей из пептида вируса ящура (FMDV) (F2A), пептида вируса ринита лошадей A (ERAV) (E2A), пептида вируса *Thosia asigna* (TaV) (T2A), пептида тешовируса-1 свиней (PTV-1) (P2A), пептида 2A тейловируса и пептида 2A вируса энцефаломиокардита. В одном из вариантов осуществления сигнал расщепления полипептида представляет собой саморасщепляющийся вирусный полипептид P2A или T2A.

3. Преобразователь сигналов CTBR15

Интерлейкин-15 (IL-15) представляет собой цитокин, стимулирующий функцию и активность Т-клеток, в том числе, путем улучшения выживания и пролиферации предшественников Т-клеток. IL-15 связывается с высокой аффинностью с IL-15R α (также известным как CD215), который затем ассоциирует с комплексом, содержащим IL-2R β (также известный как IL-15R β и CD122) и IL-2R γ (также известный как CD132 и γ c), экспрессируемым либо на одной и той же клетке (цис-презентация), либо на другой клетке (транспрезентация). Передача сигналов IL-15 активирует сигнальные пути киназы JAK/STAT, PI-3K и Src и приводит к транскрипции антиапоптотических генов и генов, стимулирующих пролиферацию предшественников Т-клеток.

В различных вариантах осуществления одна или более иммунных эффекторных клеток, включая

иммунные эффекторный клетки, экспрессирующие сконструированный антигенный рецептор, модифицированы путем введения одного или более полинуклеотидов или векторов, кодирующих преобразователь сигналов CTBR15, и, необязательно, полинуклеотида или вектора, кодирующего полипептид IL-15R α . В различных вариантах осуществления одна или более иммунных эффекторных клеток модифицированы путем введения одного или более полинуклеотидов или векторов, кодирующих преобразователь сигналов CTBR15 и сконструированный антигенный рецептор, и, необязательно, полинуклеотида или вектора, кодирующего полипептид IL-15R α .

В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов TGF β преобразует иммуносупрессивный сигнал TGF β в иммуностимулирующий сигнал, опосредованный IL-15. В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR15 содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R β ; сигнал расщепления полипептида и внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R γ . В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR15 содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R γ ; сигнал расщепления полипептида и внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R β .

В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR15 содержит слитый полипептид, содержащий первый полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R β ; сигнал расщепления полипептида; и второй полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R γ . В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR15 содержит слитый полипептид, содержащий первый полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R γ ; сигнал расщепления полипептида; и второй полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R β .

В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов CTBR15 представляет собой комплекс полипептидов, содержащий первый полипептид, содержащий полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R β ; и полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R γ . В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов CTBR15 представляет собой комплекс полипептидов, содержащий первый полипептид, содержащий полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R γ ; и полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R β .

В отдельных вариантах осуществления полипептид содержит трансмембранный домен TGF β R1 или TGF β R2. В отдельных вариантах осуществления полипептид содержит трансмембранный домен IL-2R β или IL-2R γ . В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1 и трансмембранный домен IL-2R β , и внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2 и трансмембранный домен IL-2R γ , и внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1 и трансмембранный домен IL-2R γ , и внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2 и трансмембранный домен IL-2R β , и внутриклеточный сигнальный домен.

В частных вариантах осуществления сигнал расщепления полипептида представляет собой саморасщепляющийся вирусный полипептид; более предпочтительно, саморасщепляющийся вирусный полипептид 2A; и более предпочтительно, саморасщепляющийся вирусный полипептид, выбранный из группы, состоящей из: пептида вируса ящура (FMDV) (F2A), пептида вируса ринита лошадей A (ERAV) (E2A), пептида вируса *Thossea asigna* (TaV) (T2A), пептида тешовируса-1 свиней (PTV-1) (P2A), пептида 2A тейловируса и пептида 2A вируса энцефаломиокардита. В одном из вариантов осуществления сигнал расщепления полипептида представляет собой саморасщепляющийся вирусный полипептид P2A или T2A.

4. Преобразователь сигналов CTBR21

Интерлейкин-21 (IL-21) представляет собой цитокин, стимулирующий функцию и активность Т-клеток, в том числе, путем улучшения выживания и пролиферации предшественников Т-клеток. IL-21

связывается с рецептором интерлейкина-21 (IL-21R, также известный как CD360) и IL-2R γ (также известный как CD132 и γ c). Передача сигналов IL-21 активирует сигнальные пути киназы JAK/STAT, PI-3K и Src и приводит к транскрипции антиапоптотических генов и генов, стимулирующих пролиферацию предшественников Т-клеток.

В различных вариантах осуществления одна или более иммунных эффекторных клеток, включая иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие сконструированный антигенный рецептор, модифицированы путем введения одного или более полинуклеотидов или векторов, кодирующих преобразователь сигналов CTBR21. В различных вариантах осуществления одна или более иммунных эффекторных клеток модифицированы путем введения одного или более полинуклеотидов или векторов, кодирующих преобразователь сигналов CTBR21 и сконструированный антигенный рецептор.

В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов TGF β преобразует иммуносупрессивный сигнал TGF β в иммуностимулирующий сигнал, опосредованный IL-21. В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR21 содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-21R; сигнал расщепления полипептида; и внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R γ . В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR21 содержит: внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R γ ; сигнал расщепления полипептида и внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-21R.

В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR21 содержит слитый полипептид, содержащий первый полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-21R; сигнал расщепления полипептида; и второй полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R γ . В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR21 содержит слитый полипептид, содержащий первый полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R γ ; сигнал расщепления полипептида; и второй полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-21R.

В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов CTBR21 представляет собой комплекс полипептидов, содержащий первый полипептид, содержащий полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-21R; и полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R γ . В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов CTBR21 представляет собой комплекс полипептидов, содержащий первый полипептид, содержащий полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-2R γ ; и полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-21R.

В отдельных вариантах осуществления полипептид содержит трансмембранный домен TGF β R1 или TGF β R2. В отдельных вариантах осуществления полипептид содержит трансмембранный домен IL-21R или IL-2R γ . В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1 и трансмембранный домен IL-21R, и внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2 и трансмембранный домен IL-2R γ , и внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1 и трансмембранный домен IL-2R γ , и внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2 и трансмембранный домен IL-21R, и внутриклеточный сигнальный домен.

В частных вариантах осуществления сигнал расщепления полипептида представляет собой саморасщепляющийся вирусный полипептид; более предпочтительно, саморасщепляющийся вирусный полипептид 2A; и более предпочтительно, саморасщепляющийся вирусный полипептид, выбранный из группы, состоящей из пептида вируса ящура (FMDV) (F2A), пептида вируса ринита лошадей A (ERAV) (E2A), пептида вируса *Thosia asigna* (TaV) (T2A), пептида тешовируса-1 свиней (PTV-1) (P2A), пептида 2A тейловируса и пептида 2A вируса энцефаломиокардита. В одном из вариантов осуществления сигнал расщепления полипептида представляет собой саморасщепляющийся вирусный полипептид P2A или T2A.

5. Преобразователь сигналов CTBR18

Интерлейкин-18 (IL-18) представляет собой цитокин, стимулирующий функцию и активность Т-клеток, в том числе, путем увеличения экспрессии IFN γ , увеличения пролиферации Т-клеток и защиты от индуцированной активацией гибели клеток (AICD). IL-18 связывает рецептор интерлейкина-18 I типа (IL-18R1, также известный как CD218a) и вспомогательный белок рецептора интерлейкина-18 (IL-18RAP, CD218b).

Передача сигналов IL-18 через IL-18R1 и IL-18RAP приводит к активации через адаптерный белок MyD88 и фосфорилирование IRAK4. Фосфорилирование IRAK4 и последующее фосфорилирование IRAK1/2 в конечном итоге приводит к активации факторов транскрипции NF- κ B и AP-1 с увеличением экспрессии IFN γ и увеличением чувствительности к IL-12. Транскрипционная программа, индуцированная IL-18, также увеличивает пролиферацию Т-клеток и защищает от AICD.

В различных вариантах осуществления одна или более иммунных эффекторных клеток, включая иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие сконструированный антигенный рецептор, модифицированы путем введения одного или более полинуклеотидов или векторов, кодирующих преобразователь сигналов CTBR18. В различных вариантах осуществления одна или более иммунных эффекторных клеток модифицированы путем введения одного или более полинуклеотидов или векторов, кодирующих преобразователь сигналов CTBR18 и сконструированный антигенный рецептор.

В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов TGF β преобразует иммуносупрессивный сигнал TGF β в иммуностимулирующий сигнал, опосредованный IL-18. В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR18 содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-18RAP; сигнал расщепления полипептида; и внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-18R1. В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR18 содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-18R1; сигнал расщепления полипептида; и внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-18RAP.

В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR18 содержит слитый полипептид, содержащий: первый полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-18R1; сигнал расщепления полипептида; и второй полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-18RAP. В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR18 содержит слитый полипептид, содержащий первый полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-18RAP; сигнал расщепления полипептида; и второй полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-18R1.

В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов CTBR18 представляет собой комплекс полипептидов, содержащий первый полипептид, содержащий полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-18RAP; и полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-18R1. В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов CTBR18 представляет собой комплекс полипептидов, содержащий первый полипептид, содержащий полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-18R1; и полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-18RAP.

В отдельных вариантах осуществления полипептид содержит трансмембранный домен TGF β R1 или TGF β R2. В отдельных вариантах осуществления полипептид содержит трансмембранный домен IL-18R1 или IL-18RAP. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1 и трансмембранный домен IL-18RAP, и внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2 и трансмембранный домен IL-18R1, и внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1 и трансмембранный домен IL-18R1, и внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2 и трансмембранный домен IL-18RAP, и внутриклеточный сигнальный домен.

В частных вариантах осуществления сигнал расщепления полипептида представляет собой само-

расщепляющийся вирусный полипептид; более предпочтительно, саморасщепляющийся вирусный полипептид 2А; и более предпочтительно, саморасщепляющийся вирусный полипептид, выбранный из группы, состоящей из пептида вируса ящура (FMDV) (F2A), пептида вируса ринита лошадей А (ERAV) (E2A), пептида вируса *Thosea asigna* (TaV) (T2A), пептида тешовируса-1 свиней (PTV-1) (P2A), пептида 2А тейловируса и пептида 2А вируса энцефаломиокардита. В одном из вариантов осуществления сигнал расщепления полипептида представляет собой саморасщепляющийся вирусный полипептид P2A или T2A.

6. Преобразователь сигналов CTBR1

Интерлейкин-1 (IL-1) представляет собой цитокин, стимулирующий функцию и активность Т-клеток, в том числе, путем увеличения экспрессии IFN γ , увеличения пролиферации Т-клеток и усиления защиты от индуцированной активацией гибели клеток (AICD). IL-1 связывает рецептор интерлейкина-1 I типа (IL-1R1, также известный как CD 121a) и вспомогательный белок рецептора интерлейкина-1 (IL-1RAP).

Передача сигналов IL-1 через IL-1R1 и IL-1RAP приводит к активации через адаптерный белок MyD88 и фосфорилирование IRAK4. Фосфорилирование IRAK4 и последующее фосфорилирование IRAK1/2 в конечном итоге приводит к активации факторов транскрипции NF- κ B и AP-1 с увеличением экспрессии IFN γ и увеличением чувствительности к IL-12. Транскрипционная программа, индуцированная IL-1, также увеличивает пролиферацию Т-клеток и защищает от AICD.

В различных вариантах осуществления одна или более иммунных эффекторных клеток, включая иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие сконструированный антигенный рецептор, модифицированы путем введения одного или более полинуклеотидов или векторов, кодирующих преобразователь сигналов CTBR1. В различных вариантах осуществления одна или более иммунных эффекторных клеток модифицированы путем введения одного или более полинуклеотидов или векторов, кодирующих преобразователь сигналов CTBR1 и сконструированный антигенный рецептор.

В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов TGF β преобразует иммуносупрессивный сигнал TGF β в иммуностимулирующий сигнал, опосредованный IL-1. В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR1 содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-1RAP; сигнал расщепления полипептида; и внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-1R1. В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR1 содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-1R1; сигнал расщепления полипептида; и внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-1RAP.

В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR1 содержит слитый полипептид, содержащий первый полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-1R1; сигнал расщепления полипептида; и второй полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-1RAP. В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR1 содержит слитый полипептид, содержащий первый полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-1RAP; сигнал расщепления полипептида; и второй полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-1R1.

В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов CTBR1 представляет собой комплекс полипептидов, содержащий первый полипептид, содержащий полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-1RAP; и полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-1R1. В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов CTBR1 представляет собой комплекс полипептидов, содержащий первый полипептид, содержащий полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-1R1; и полипептид, содержащий внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен IL-1RAP.

В отдельных вариантах осуществления полипептид содержит трансмембранный домен TGF β R1 или TGF β R2. В отдельных вариантах осуществления полипептид содержит трансмембранный домен IL-1R1 или IL-1RAP. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1 и трансмембранный домен IL-1RAP, и внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGF β 1-связывающий

домен TGFβR2 и трансмембранный домен IL-1R1, и внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR1 и трансмембранный домен IL-1R1, и внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR2 и трансмембранный домен IL-1RAP, и внутриклеточный сигнальный домен.

В частных вариантах осуществления сигнал расщепления полипептида представляет собой саморасщепляющийся вирусный полипептид; более предпочтительно саморасщепляющийся вирусный полипептид 2A и более предпочтительно саморасщепляющийся вирусный полипептид, выбранный из группы, состоящей из пептида вируса ящура (FMDV) (F2A), пептида вируса ринита лошадей A (ERAV) (E2A), пептида вируса *Thosea asigna* (TaV) (T2A), пептида тешовируса-1 свиней (PTV-1) (P2A), пептида 2A тейловируса и пептида 2A вируса энцефаломиокардита. В одном из вариантов осуществления сигнал расщепления полипептида представляет собой саморасщепляющийся вирусный полипептид P2A или T2A.

7. Преобразователь сигналов CTBR.TLR

Толл-подобные рецепторы (TLR1-TLR10) представляют собой образраспознающие рецепторы, которые обнаруживают вторжение патогенов и активируют врожденные и адаптивные иммунные ответы. Активация TLR различными лигандами приводит к индукции провоспалительной транскрипционной программы и экспрессии множества воспалительных пиритинов.

Передача сигналов TLR происходит посредством гомодимеризации сигнальных доменов TLR, приводящей к активации через адаптерный белок MyD88 и фосфорилирование IRAK4. Фосфорилирование IRAK4 и последующее фосфорилирование IRAK1/2 в конечном итоге приводит к активации факторов транскрипции NF-κB и AP-1 с увеличением продукции воспалительных пиритинов и индукцией пролиферации. Активация TLR также может приводить к активации факторов транскрипции IRF3 и IRF7.

В различных вариантах осуществления одна или более иммунных эффекторных клеток, включая иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие сконструированный антигенный рецептор, модифицированы путем введения одного или более полинуклеотидов или векторов, кодирующих преобразователь сигналов CTBR.TLR. В различных вариантах осуществления одна или более иммунных эффекторных клеток модифицированы путем введения одного или более полинуклеотидов или векторов, кодирующих преобразователь сигналов CTBR.TLR и сконструированный антигенный рецептор.

В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов TGFβ преобразует иммуносупрессивный сигнал TGFβ в иммуностимулирующий сигнал, опосредованный TLR. В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR.TLR содержит внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен TLR; сигнал расщепления полипептида; и внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR2, трансмембранный домен и идентичный сигнальный домен TLR.

В частных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе преобразователь сигналов CTBR.TLR содержит слитый полипептид, содержащий: первый полипептид, содержащий внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен TLR; сигнал расщепления полипептида; и второй полипептид, содержащий внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR2, трансмембранный домен и идентичный сигнальный домен TLR.

В частных вариантах осуществления преобразователь сигналов CTBR.TLR представляет собой комплекс полипептидов, содержащий первый полипептид, содержащий полипептид, содержащий внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен TLR; и полипептид, содержащий внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR2, трансмембранный домен и идентичный сигнальный домен TLR.

В отдельных вариантах осуществления полипептид содержит трансмембранный домен TGFβR1 или TGFβR2. В отдельных вариантах осуществления полипептид содержит трансмембранный домен TLR. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR1 и трансмембранный домен TLR, и внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления полипептид содержит внеклеточный TGFβ1-связывающий домен TGFβR2 и трансмембранный домен TLR, и внутриклеточный сигнальный домен.

В частных вариантах осуществления сигнал расщепления полипептида представляет собой саморасщепляющийся вирусный полипептид; более предпочтительно саморасщепляющийся вирусный полипептид 2A и более предпочтительно саморасщепляющийся вирусный полипептид, выбранный из группы, состоящей из пептида вируса ящура (FMDV) (F2A), пептида вируса ринита лошадей A (ERAV) (E2A), пептида вируса *Thosea asigna* (TaV) (T2A), пептида тешовируса-1 свиней (PTV-1) (P2A), пептида 2A тейловируса и пептида 2A вируса энцефаломиокардита. В одном из вариантов осуществления сигнал расщепления полипептида представляет собой саморасщепляющийся вирусный полипептид P2A или T2A.

D. Сконструированные антигенные рецепторы

В частных вариантах осуществления полипептид содержит сконструированный антигенный рецептор, сигнал расщепления полипептида и CTBR. В других частных вариантах осуществления поли-

нуклеотид или вектор, кодирующий CTBR, вводят в иммунную эффекторную клетку, содержащую сконструированный антигенный рецептор. Без привязки к какой-либо конкретной теории в частных вариантах осуществления предполагают, что для введения и совместной экспрессии сконструированного антигенного рецептора и CTBR в одной и той же иммунной эффекторной клетке или популяции клеток для увеличения устойчивости иммунных эффекторных клеток к ТМЕ и усилению и увеличению эффективности, величины и продолжительности ответа иммунных эффекторных клеток, может применяться любой механизм, известный в данной области техники.

В частных вариантах осуществления рассматриваемые в настоящем документе иммунные эффекторные клетки содержат сконструированный антигенный рецептор и CTBR. В частных вариантах осуществления сконструированный антигенный рецептор представляет собой сконструированный Т-клеточный рецептор (TCR), химерный антигенный рецептор (CAR), рецептор DARIC или его компоненты или зетакин.

1. Сконструированные TCR

В частных вариантах осуществления рассматриваемые в настоящем документе иммунные эффекторные клетки содержат сконструированный TCR и преобразователь сигналов CTBR. В одном из вариантов осуществления Т-клетки генетически модифицированы путем введения полинуклеотида или вектора, кодирующего сконструированный TCR и преобразователь сигналов CTBR, разделенные одним или более сигналами расщепления полипептида. В одном из вариантов осуществления Т-клетки генетически модифицированы путем введения полинуклеотида или вектора, кодирующего сконструированный TCR, и полинуклеотида или вектора, кодирующего преобразователь сигналов CTBR. В одном из вариантов осуществления Т-клетки генетически модифицированы для экспрессии сконструированного TCR и дополнительно генетически модифицированы путем введения полинуклеотида или вектора, кодирующего преобразователь сигналов CTBR.

Природные Т-клеточные рецепторы содержат две субъединицы: субъединицу альфа-цепи и бета-цепи, каждая из которых является уникальным белком, продуцируемым в результате рекомбинации в геноме каждой Т-клетки. Библиотеки TCR могут быть подвергнуты скринингу в отношении их селективности к конкретным антигенам-мишеням. Таким образом, природные TCR, обладающие высокой авидностью и реакционной способностью по отношению к антигенам-мишеням, могут быть отобраны, клонированы и впоследствии введены в популяцию Т-клеток, используемых для адоптивной иммунотерапии.

В одном из вариантов осуществления Т-клетки модифицируют путем введения субъединицы TCR, обладающей способностью образовывать TCR, придающие Т-клеткам специфичность к опухолевым клеткам, экспрессирующим антиген-мишень. В частных вариантах осуществления субъединицы имеют одну или более аминокислотных замен, делеций, инсерций или модификаций по сравнению с природной субъединицей, при условии, что субъединицы сохраняют способность к образованию TCR и наделяют трансфицированные Т-клетки способностью нацеливаться на клетки-мишени и участвовать в иммунологически значимой передаче сигналов от цитокинов. Сконструированные TCR предпочтительно также связывают клетки-мишени, демонстрирующие соответствующий опухолеассоциированный пептид с высокой авидностью, и, необязательно, опосредуют эффективное уничтожение клеток-мишеней, презентующих соответствующий пептид, *in vivo*.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие сконструированные TCR, предпочтительно выделены из их естественного окружения в (природной) хромосоме Т-клетки и могут быть включены в подходящие векторы, как описано в других частях настоящего документа. Как нуклеиновые кислоты, так и содержащие их векторы могут быть перенесены в клетку, предпочтительно Т-клетку, в частных вариантах осуществления. После этого модифицированные Т-клетки способны экспрессировать одну или более цепей TCR, кодируемых трансдуцированной нуклеиновой кислотой или нуклеиновыми кислотами. В предпочтительных вариантах осуществления сконструированный TCR представляет собой экзогенный TCR, поскольку он вводится в Т-клетки, которые обычно не экспрессируют конкретный TCR. Существенным аспектом сконструированных TCR является то, что они обладают высокой авидностью к опухолевому антигену, презентуемому главным комплексом гистосовместимости (ГКГС) или аналогичным иммунологическим компонентом. В отличие от сконструированных TCR, CAR сконструированы так, чтобы связывать антигены-мишени независимо от ГКГС образом.

TCR может быть экспрессирован дополнительными полипептидами, присоединенными к аминоконцевой или карбоксиконцевой части альфа-цепи или бета-цепи TCR, при условии, что присоединенный дополнительный полипептид не влияет на способность альфа-цепи или бета-цепи образовывать функциональный Т-клеточный рецептор и ГКГС-зависимое распознавание антигенов.

Антигены, распознаваемые сконструированными TCR, рассматриваемыми в частных вариантах осуществления, включают, не ограничиваясь перечисленным, раковые антигены, включая антигены как при гематологических злокачественных новообразованиях, так и при солидных опухолях. Примеры антигенов включают, не ограничиваясь перечисленным, рецептор фоллиевой кислоты альфа, 5T4, интегрин $\alpha v \beta 6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, семейство EGFR, включая ErbB2 (HER2),

EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, фетального AchR, FR α , GD2, GD3, глипикан-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, лямбда, антиген Y системы Льюис, каппа, мезотелин, Muc1, Muc16, NCAM, лиганды NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSMA, ROR1, SSX, сурвивин, TAG72, TEM, VEGFR2 и WT-1.

2. Химерные антигенные рецепторы

В различных вариантах осуществления иммунные эффекторские клетки экспрессируют CAR, которые перенаправляют цитотоксическое действие на опухолевые клетки. CAR представляют собой молекулы, сочетающие специфичность антитела к антигену-мишени (например, опухолевому антигену) с внутриклеточным доменом, активирующим Т-клеточный рецептор, тем самым образуя химерный белок, проявляющий специфичную противоопухолевую клеточную иммунную активность. В контексте настоящего документа термин "химерный" означает состоящий из частей разных белков или ДНК различного происхождения.

В частных вариантах осуществления рассматриваемые в настоящем документе иммунные эффекторские клетки содержат CAR и преобразователь сигналов CTBR. В одном из вариантов осуществления Т-клетки генетически модифицированы путем введения полинуклеотида или вектора, кодирующего CAR и преобразователь сигналов CTBR, разделенные одним или более сигналами расщепления полипептида. В одном из вариантов осуществления Т-клетки генетически модифицированы путем введения полинуклеотида или вектора, кодирующего CAR, и полинуклеотида или вектора, кодирующего преобразователь сигналов CTBR. В одном из вариантов осуществления Т-клетки генетически модифицированы для экспрессии CAR и дополнительно генетически модифицированы путем введения полинуклеотида или вектора, кодирующего преобразователь сигналов CTBR.

В различных вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный домен, связывающийся с определенным антигеном-мишенью (также называемый связывающим доменом или антигенспецифическим связывающим доменом), трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. Основной характеристикой CAR является их способность перенаправлять специфичность иммунных эффекторских клеток, тем самым вызывая пролиферацию, продукцию цитокинов, фагоцитоз или продукцию молекул, которые могут опосредовать гибель клеток, экспрессирующих антиген-мишень, независимым от главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) образом, используя способности моноклональных антител, растворимых лигандов или клеточно-специфических корецепторов к специфическому нацеливанию на клетки.

В частных вариантах осуществления CAR содержат внеклеточный связывающий домен, который специфически связывается с полипептидом-мишенью, например, антигеном-мишенью, экспрессируемым на опухолевой клетке. В контексте настоящего документа термины "связывающий домен", "внеклеточный домен", "внеклеточный связывающий домен", "антигенсвязывающий домен", "антигенспецифический связывающий домен" и "внеклеточный антигенспецифический связывающий домен" используются взаимозаменяемо и придают химерному рецептору, например, CAR или DARIC, способность специфически связываться с представляющим интерес антигеном-мишенью. Связывающий домен может содержать любой белок, полипептид, олигопептид или пептид, обладающий способностью специфически распознавать биологическую молекулу (например, рецептор клеточной поверхности или опухолевый белок, липид, полисахарид или другую молекулу-мишень клеточной поверхности, или ее компонент) и связываться с ней. Связывающий домен включает любой природный, синтетический, полусинтетический или рекомбинантно полученный партнер по связыванию для представляющей интерес биологической молекулы.

В частных вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

"Антитело" относится к связывающему агенту, представляющему собой полипептид, содержащий, по меньшей мере, варибельную область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина, который специфически распознает и связывает эпитоп антигена-мишени, такого как пептид, липид, полисахарид или нуклеиновая кислота, содержащий антигенную детерминанту, такую как распознаваемая иммунной клеткой. Антитела включают антигенсвязывающие фрагменты, например, верблюжье Ig (антитело верблюдовых или его VHH-фрагмент), Ig NAR, Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab)₂-фрагменты, F(ab)₃-фрагменты, Fv, одноцепочечный Fv-фрагмент антитела ("scFv"), бис-scFv, (scFv)₂, миниантитело, диантитело, триантитело, тетрантитело, стабилизированный дисульфидными связями Fv-белок ("dsFv") и однодоменное антитело (sdAb, нанотело) или другие фрагменты антител. Термин также включает сконструированные формы, такие как химерные антитела (например, гуманизированные мышьиные антитела), гетероконъюгаты антител (такие как биспецифические антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты. См. также Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающий домен представляет собой scFv.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления связывающий домен представляет собой антитело верблюдовых.

В частных вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный домен, связывающий антиген, выбранный из группы, состоящей из рецептора фолиевой кислоты альфа, 5T4, интегрина $\alpha v \beta 6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, семейства EGFR, включая ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, фетального AchR, FR α , GD2, GD3, глипикана-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, лямбда, антигена Y системы Льюис, каппа, мезотелина, Muc1, Muc16, NCAM, лигандов NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, сурвивина, TAG72, TEM, VEGFR2 и WT-1.

В частных вариантах осуществления CAR содержат внеклеточный связывающий домен, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающее антиген, где антиген представляет собой комплекс ГКГС-пептид, такой как комплекс ГКГС I класса-пептид или комплекс ГКГС II класса-пептид.

В отдельных вариантах осуществления CAR содержат линкерные остатки между различными доменами. "Линкерная последовательность вариабельной области" представляет собой аминокислотную последовательность, связывающую вариабельную область тяжелой цепи с вариабельной областью легкой цепи и выполняющую функцию спейсера, совместимую с взаимодействием двух субсвязывающих доменов, так что полученный полипептид сохраняет специфическую аффинность связывания с той же молекулой-мишенью, с которой связывается антитело, содержащее такие же вариабельные области легкой и тяжелой цепи. В частных вариантах осуществления CAR содержат один, два, три, четыре или пять, или более линкеров. В частных вариантах осуществления длина линкера составляет от приблизительно 1 до приблизительно 25 аминокислот, от приблизительно 5 до приблизительно 20 аминокислот или от приблизительно 10 до приблизительно 20 аминокислот, или любое промежуточное количество аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более аминокислот в длину.

В частных вариантах осуществления за связывающим доменом CAR расположены один или более "спейсерных доменов", которые относятся к области, перемещающей антигенсвязывающий домен от поверхности эффекторных клеток для обеспечения надлежащего контакта между клетками, связывания антигена и активации (Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). Спейсерный домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. В отдельных вариантах осуществления спейсерный домен представляет собой часть иммуноглобулина, включая, не ограничиваясь перечисленным, одну или более константных областей тяжелой цепи, например CH2 и CH3. Спейсерный домен может включать аминокислотную последовательность природной шарнирной области иммуноглобулина или измененной шарнирной области иммуноглобулина.

В одном из вариантов осуществления спейсерный домен содержит CH2 и CH3 IgG1, IgG4 или IgD.

В одном из вариантов осуществления связывающий домен CAR связан с одним или более "шарнирными доменами", играющими роль в перемещении антигенсвязывающего домена от поверхности эффекторных клеток для обеспечения надлежащего контакта между клетками, связывания антигена и активации. CAR обычно содержит один или более шарнирных доменов между связывающим доменом и трансмембранным доменом (ТМ). Шарнирный домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. Шарнирный домен может включать аминокислотную последовательность природной шарнирной области иммуноглобулина или измененной шарнирной области иммуноглобулина.

Примеры шарнирных доменов, подходящие для применения в CAR, описанных в настоящем документе, включают шарнирную область, полученную из внеклеточных областей мембранных белков 1 типа, таких как CD8 α и CD4, которые могут представлять собой шарнирные области дикого типа из этих молекул или могут быть изменены. В еще одном варианте осуществления шарнирный домен содержит шарнирную область CD8 α .

В еще одном варианте осуществления шарнир представляет собой шарнир PD-1 или шарнир CD152.

"Трансмембранный домен" представляет собой часть CAR, которая соединяет внеклеточную связывающую часть и внутриклеточный сигнальный домен и прикрепляет CAR к плазматической мембране иммунной эффекторной клетки. ТМ домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника.

Примеры ТМ доменов могут быть получены из (т.е. содержать, по меньшей мере, трансмембранную(ые) область(и) альфа- или бета-цепи) Т-клеточного рецептора, CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD154, AMN и PD-1.

В одном из вариантов осуществления CAR содержит ТМ домен, полученный из CD8 α . В еще одном варианте осуществления CAR, рассматриваемый в настоящем документе, содержит ТМ домен, получен-

ный из CD8 α , и короткий олиго- или полипептидный линкер, предпочтительно длиной 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, связывающий ТМ домен и внутриклеточный сигнальный домен CAR. Глицин-сериновый линкер является особенно подходящим линкером.

В частных вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен. "Внутриклеточный сигнальный домен" относится к части CAR, которая участвует в передаче сообщения об эффективном связывании CAR с антигеном-мишенью во внутреннюю часть иммунной эффекторной клетки, чтобы вызвать функцию эффекторных клеток, например активацию, продукцию цитокинов, пролиферацию и цитотоксическую активность, включая высвобождение цитотоксических факторов в CAR-связанную клетку-мишень, или другие клеточные ответы, вызванные связыванием антигена с внеклеточным доменом CAR.

Термин "эффекторная функция" относится к специализированной функции клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой питолическую активность или помощь или активность, включая секрецию питокина. Таким образом, термин "внутриклеточный сигнальный домен" относится к части белка, которая преобразует сигнал, регулирующий эффекторную функцию, и направляет клетку на выполнение специализированной функции. Хотя обычно можно использовать целый внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях в этом нет необходимости. Если используется усеченная часть внутриклеточного сигнального домена, такая усеченная часть может использоваться вместо целого домена при условии, что она преобразует сигнал, регулирующий эффекторную функцию. Подразумевается, что термин "внутриклеточный сигнальный домен" включает любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для преобразования сигнала, регулирующего эффекторную функцию.

Известно, что одних сигналов, генерируемых через TCR, недостаточно для полной активации Т-клеток, и также необходим вторичный или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация Т-клеток опосредована двумя различными классами внутриклеточных сигнальных доменов: первичными сигнальными доменами, которые инициируют антигензависимую первичную активацию через TCR (например, комплекс TCR/CD3), и костимулирующими сигнальными доменами, которые действуют независимым от антигена образом, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал. В предпочтительных вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, содержащий один или более "костимулирующих сигнальных доменов" и "первичный сигнальный домен".

Первичные сигнальные домены регулируют первичную активацию комплекса TCR либо стимулирующим, либо ингибирующим образом. Первичные сигнальные домены, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, известные как иммунорецепторные тирозин-активируемые мотивы или ITAM.

Иллюстративные примеры ITAM, содержащих первичные сигнальные домены, подходящие для применения в CAR, рассматриваемых в частных вариантах осуществления, включают полученные из FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В частных предпочтительных вариантах осуществления CAR содержит первичный сигнальный домен CD3 ζ и один или более костимулирующих сигнальных доменов. Внутриклеточные первичные сигнальные и костимулирующие сигнальные домены могут быть последовательно связаны в любом порядке с карбоксильным концом трансмембранного домена.

В частных вариантах осуществления CAR содержит один или более костимулирующих сигнальных доменов для повышения эффективности и размножения Т-клеток, экспрессирующих рецепторы CAR. В контексте настоящего документа термин "костимулирующий сигнальный домен" или "костимулирующий домен" относится к внутриклеточному сигнальному домену костимулирующей молекулы.

Иллюстративные примеры таких костимулирующих молекул, подходящих для применения в CAR, рассматриваемых в частных вариантах осуществления, включают TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD 11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM и ZAP70. В одном из вариантов осуществления CAR содержит один или более костимулирующих сигнальных доменов, выбранных из группы, состоящей из CD28, CD137 и CD134, и первичный сигнальный домен CD3 ζ .

В различных вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный домен, связывающий антиген, выбранный из группы, состоящей из BCMA, CD19, CSPG4, PSCA, ROR1 и TAG72; трансмембранный домен, выделенный из полипептида, выбранного из группы, состоящей из CD4, CD8 α , CD154 и PD-1; один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов, выделенных из полипептида, выбранного из группы, состоящей из CD28, CD134 и CD137; и сигнальный домен, выделенный из полипептида, выбранного из группы, состоящей из FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

3. DARIC

В частных вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки содержат одну или более цепей рецептора DARIC. В контексте настоящего документа термин "рецептор DARIC" относится к многоцепочечному сконструированному антигенному рецептору.

В частных вариантах осуществления рассматриваемые в настоящем документе иммунные эффектор-ные клетки содержат одну или более цепей рецептора DARIC и преобразователь сигналов CTBR. В одном из вариантов осуществления Т-клетки генетически модифицированы путем введения полинуклеотида или вектора, кодирующего одну или более цепей рецептора DARIC и преобразователь сигналов CTBR, разделенные одним или более сигналами расщепления полипептида. В одном из вариантов осуществления Т-клетки генетически модифицированы путем введения полинуклеотида или вектора, кодирующего одну или более цепей рецептора DARIC, и полинуклеотида или вектора, кодирующего преобразователь сигналов CTBR. В одном из вариантов осуществления Т-клетки генетически модифицированы для экспрессии одной или более цепей рецептора DARIC и дополнительно генетически модифицированы путем введения полинуклеотида или вектора, кодирующего преобразователь сигналов CTBR.

Иллюстративные примеры строения и компонентов DARIC раскрыты в публикации заявки РСТ № WO 2015/017214 и публикации патентной заявки США № 20150266973, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В одном из вариантов осуществления донорная матрица репарации содержит следующие компоненты DARIC: сигнальный полипептид, содержащий первый домен мультимеризации, первый трансмембранный домен и один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов и/или первичных сигнальных доменов; и связывающий полипептид, содержащий связывающий домен, второй домен мультимеризации и, необязательно, второй трансмембранный домен. Функциональный DARIC содержит мостиковый фактор, способствующий образованию рецепторного комплекса DARIC на клеточной поверхности, причем мостиковый фактор ассоциирован с доменами мультимеризации сигнального полипептида и связывающего полипептида и расположен между ними.

В частных вариантах осуществления первый и второй домены мультимеризации ассоциируют с мостиковым фактором, выбранным из группы, состоящей из рапамицина или его рапалога, кумермицина или его производного, гиббереллина или его производного, абсцизовой кислоты (ABA) или ее производного, метотрексата или его производного, циклоспорина А или его производного, FKCsA или его производного, триметоприм (Ттр)-синтетического лиганда для FKBP (SLF) или его производного, и любой их комбинации.

Иллюстративные примеры аналогов рапамицина (рапалогов) включают раскрытые в патенте США № 6649595, при этом структуры рапалогов, раскрытые в данном документе, включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. В отдельных вариантах осуществления изобретения мостиковый фактор представляет собой рапалог с по существу сниженным иммуносупрессивным действием по сравнению с рапамицином. "По существу сниженное иммуносупрессивное действие" относится к рапалогу, иммуносупрессивное действие которого составляет по меньшей мере в 0,1-0,005 раз меньше, чем наблюдаемое или ожидаемое для эквимольного количества рапамицина, измеренному в клинических условиях или на подходящей *in vitro* (например, ингибирование Т-клеточной пролиферации) или *in vivo* модели иммуносупрессивной активности у человека. В одном из вариантов осуществления "по существу сниженное иммуносупрессивное действие" относится к рапалогу, имеющему значение EC50 в подобном анализе *in vitro*, по меньшей мере в 10-250 раз превышающее значение EC50, наблюдаемое для рапамицина в том же анализе.

Другие иллюстративные примеры рапалогов включают, не ограничиваясь перечисленным, зверо-лимус, новолимус, пимекролимус, ридафороллимус, такролимус, темсиролимус, умиролимус и зотаролимус.

В отдельных вариантах осуществления домены мультимеризации будут ассоциировать с мостиковым фактором, представляющим собой рапамицин или его рапалог. Например, первый и второй домены мультимеризации представляют собой пару, выбранную из FKBP и FRB. Домены FRB представляют собой полипептидные области (белковые "домены"), способные образовывать трехчленный комплекс с белком FKBP и рапамицином или его рапалогом. Домены FRB присутствуют во многих встречающихся в природе белках, включая белки mTOR (также упоминаемые в литературе как FRAP, RAP1 или RAFT) человека и других видов; дрожжевые белки, включая Tor1 и Tor2; и гомолог Candida FRAP. Информация о нуклеотидных последовательностях, клонировании и других аспектах этих белков уже известна в данной области техники. Например, номер доступа для белковой последовательности человеческого mTOR представляет собой номер доступа в GenBank L34075.1 (Brown et al., Nature 369:756, 1994).

Домены FRB, подходящие для применения в частных вариантах осуществления, рассматриваемых в настоящем документе, обычно содержат по меньшей мере от приблизительно 85 до приблизительно 100 аминокислотных остатков. В отдельных вариантах осуществления аминокислотная последовательность FRB для применения в слитых белках согласно настоящему изобретению будет содержать последовательность из 93 аминокислот от Ile-2021 до Lys-2113 и мутацию T2098L на основе аминокислотной последовательности с номером доступа в GenBank L34075.1. Домен FRB для применения в DARIC, рассматриваемых в частных вариантах осуществления, будет способен связываться с комплексом белка FKBP, связанного с рапамицином или его рапалогом. В отдельных вариантах осуществления пептидная последовательность домена FRB содержит (а) природную пептидную последовательность, охватывающую по меньшей мере указанную область из 93 аминокислот человеческого mTOR или соответствующие

области гомологичных белков; (b) вариант природного FRB, в котором до приблизительно десяти аминокислот, или от приблизительно 1 до приблизительно 5 аминокислот, или от приблизительно 1 до приблизительно 3 аминокислот, или в некоторых вариантах осуществления только одна аминокислота природного пептида были удалены, вставлены или заменены; или (c) пептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты, способной селективно гибридизоваться с молекулой ДНК, кодирующей природный домен FRB, или последовательностью ДНК, которая была бы способна, в отсутствие вырожденности генетического кода, селективно гибридизоваться с молекулой ДНК, кодирующей встречающийся в природе домен FRB.

FKBP (FK506-связывающие белки) представляют собой цитозольные рецепторы макролидов, таких как FK506, FK520 и рапамицин, и являются высоко консервативными для всех видов. FKBP представляют собой белки или белковые домены, способные связываться с рапамицином или его рапалогом и дополнительно образовывать трехчленный комплекс с FRB-содержащим белком или слитым белком. Домен FKBP также может называться "рапамицинсвязывающим доменом". Информация в отношении нуклеотидных последовательностей, клонирования и других аспектов различных видов FKBP известна в данной области техники (см., например, Staendart et al., *Nature* 346:671, 1990 (человеческий FKBP12); Kay, *Biochem. J.* 314:361, 1996). Гомологичные белки FKBP других видов млекопитающих, дрожжей и других организмов также известны в данной области техники и могут применяться в слитых белках, раскрытых в настоящем документе. Домен FKBP, рассматриваемый в частных вариантах осуществления, будет способен связываться с рапамицином или его рапалогом и участвовать в трехчленном комплексе с FRB-содержащим белком (что может быть определено любыми способами, прямыми или косвенными, обнаружения такого связывания).

Иллюстративные примеры доменов FKBP, подходящих для применения в DARIC, рассматриваемых в частных вариантах осуществления, включают, не ограничиваясь перечисленным: природную пептидную последовательность FKBP, предпочтительно выделенную из белка FKBP12 человека (номер доступа в GenBank AAA58476.1), или пептидную последовательность, выделенную из нее, из другого FKBP человека, из FKBP мыши или другого млекопитающего или из FKBP какого-либо другого животного, дрожжей или грибка; вариант природной последовательности FKBP, в которой до приблизительно десяти аминокислот, или от приблизительно 1 до приблизительно 5 аминокислот, или от приблизительно 1 до приблизительно 3 аминокислот, или, в некоторых вариантах осуществления, только одна аминокислота природного пептида были удалены, вставлены или заменены; или пептидную последовательность, кодируемую молекулой нуклеиновой кислоты, способной селективно гибридизоваться с молекулой ДНК, кодирующей природный FKBP, или последовательностью ДНК, которая была бы способна, в отсутствие вырожденности генетического кода, селективно гибридизоваться с молекулой ДНК, кодирующей природный FKBP.

Другие иллюстративные примеры пар доменов мультимеризации, подходящих для применения в DARIC, рассматриваемом в частных вариантах осуществления, включают, не ограничиваясь перечисленным, домены из FKBP и FRB, FKBP и кальциневрина, FKBP и циклофилина, FKBP и бактериального DHFR, кальциневрина и циклофилина, PYL1 и ABI1, или GIB1 и GAI, или их варианты.

В других вариантах осуществления антимоистиковый фактор блокирует ассоциацию сигнального полипептида и связывающего полипептида с мостиковым фактором. Например, циклоспорин или FK506 могут применяться в качестве антимоистиковых факторов для подбора дозы рапамицина и, следовательно, для остановки передачи сигналов, поскольку связывается только один домен мультимеризации. В отдельных вариантах осуществления антимоистиковый фактор (например, циклоспорин, FK506) представляет собой иммуносупрессивное средство. Например, иммуносупрессивный антимоистиковый фактор может применяться для блокирования или минимизации функции компонентов DARIC, рассматриваемых в частных вариантах осуществления, и в то же время ингибировать или блокировать нежелательный или патологический воспалительный ответ в клинических условиях.

В одном из вариантов осуществления первый домен мультимеризации содержит FRB T2098L, второй домен мультимеризации содержит FKBP12 и мостиковый фактор представляет собой рапалог AP21967.

В еще одном варианте осуществления первый домен мультимеризации содержит FRB, второй домен мультимеризации содержит FKBP12 и мостиковый фактор представляет собой рапамицин, темсиrolimus или эверолимус.

В частных вариантах осуществления сигнальный полипептид, первый трансмембранный домен и связывающий полипептид содержат второй трансмембранный домен или ГФИ (гликозилфосфатидилинозитол)-якорь. Иллюстративные примеры первого и второго трансмембранных доменов выделены из полипептида, независимо выбранного из группы, состоящей из CD3δ, CD3ε, CD3γ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD154, AMN и PD-1.

В одном из вариантов осуществления сигнальный полипептид содержит один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов и/или первичных сигнальных доменов.

Иллюстративные примеры первичных сигнальных доменов, подходящих для применения в сигнальных компонентах DARIC, рассматриваемых в частных вариантах осуществления, включают полученные из FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В частных предпочтительных вариантах осуществления сигнальный компонент DARIC содержит первичный сигнальный домен CD3 ζ и один или более костимулирующих сигнальных доменов. Внутриклеточные первичные сигнальные и костимулирующие сигнальные домены могут быть последовательно связаны в любом порядке с карбоксильным концом трансмембранного домена.

Иллюстративные примеры таких костимулирующих молекул, подходящих для применения в сигнальных компонентах DARIC, рассматриваемых в частных вариантах осуществления, включают TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM и ZAP70. В одном из вариантов осуществления сигнальный компонент DARIC содержит один или более костимулирующих сигнальных доменов, выбранных из группы, состоящей из CD28, CD137 и CD134, и первичный сигнальный домен CD3 ζ .

В частных вариантах осуществления связывающий компонент DARIC содержит связывающий домен. В одном из вариантов осуществления связывающий домен представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере вариабельную область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина, который специфически распознает и связывает эпитоп антигена-мишени, такого как пептид, липид, полисахарид или нуклеиновая кислота, содержащий антигенную детерминанту, такую как распознаваемая иммунной клеткой. Антитела включают антигенсвязывающие фрагменты, например, верблюжье Ig (антитело верблюдовых или его VHH-фрагмент), Ig NAR, Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab)' $_2$ -фрагменты, F(ab)' $_3$ -фрагменты, Fv, одноцепочечный Fv-фрагмент антитела ("scFv"), бис-scFv, (scFv) $_2$, миниантитело, диатело, триатело, тетратело, стабилизированный дисульфидными связями Fv-белок ("dsFv") и однодоменное антитело (sdAb, нанотело), или другие фрагменты антител. Термин также включает сконструированные формы, такие как химерные антитела (например, гуманизированные мышиные антитела), гетероконъюгаты антител (такие как биспецифические антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты. См. также Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления связывающий домен представляет собой scFv.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления связывающий домен представляет собой антитело верблюдовых.

В частных вариантах осуществления связывающий компонент DARIC содержит внеклеточный домен, связывающий антиген, выбранный из группы, состоящей из рецептора фолиевой кислоты альфа, 5T4, интегрина α v β 6, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, семейства EGFR, включая ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, фетального AchR, FR α , GD2, GD3, глипикана-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, лямбда, антигена Y системы Льюиса, каппа, мезотелина, Muc1, Muc16, NCAM, лигандов NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, сурвивина, TAG72, TEM, VEGFR2 и WT-1.

В одном из вариантов осуществления связывающий компонент DARIC содержит внеклеточный домен, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающее комплекс ГККГ-пептид, такой как комплекс ГККГ I класса-пептид или комплекс ГККГ II класса-пептид.

В частных вариантах осуществления рассматриваемые в настоящем документе компоненты DARIC содержат линкер или спейсер, соединяющий два белка, полипептида, пептида, домена, области или мотива. В отдельных вариантах осуществления линкер содержит от приблизительно 2 до приблизительно 35 аминокислот, или от приблизительно 4 до приблизительно 20 аминокислот, или от приблизительно 8 до приблизительно 15 аминокислот, или от приблизительно 15 до приблизительно 25 аминокислот. В других вариантах осуществления спейсер может иметь конкретную структуру, такую как домен CH2CH3 антитела, шарнирный домен или тому подобное. В одном из вариантов осуществления спейсер содержит домены CH2 и CH3 IgG1, IgG4 или IgD.

В частных вариантах осуществления рассматриваемые в настоящем документе компоненты DARIC содержат один или более "шарнирных доменов", играющих роль в расположении доменов для обеспечения надлежащего контакта между клетками, связывания антигена и активации. DARIC может содержать один или более шарнирных доменов между связывающим доменом и доменом мультимеризации и/или трансмембранным доменом (ТМ), или между доменом мультимеризации и трансмембранным доменом. Шарнирный домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. Шарнирный домен может включать аминокислотную последовательность природной шарнирной области иммуноглобулина или измененной шарнирной области иммуноглобулина. В

частном варианте осуществления шарнир представляет собой шарнир CD8 α или шарнир CD4.

В одном из вариантов осуществления DARIC содержит сигнальный полипептид, содержащий первый домен мультимеризации FRB T2098L, трансмембранный домен CD8, костимулирующий домен 4-1BB и первичный сигнальный домен CD3 ζ ; связывающий полипептид содержит scFv, который связывает CD19, второй домен мультимеризации FKBP12 и трансмембранный домен CD4; и мостовой фактор представляет собой рапалог AP21967.

В одном из вариантов осуществления DARIC содержит сигнальный полипептид, содержащий первый домен мультимеризации FRB, трансмембранный домен CD8, костимулирующий домен 4-1BB и первичный сигнальный домен CD3 ζ ; связывающий полипептид содержит scFv, который связывает CD19, второй домен мультимеризации FKBP12 и трансмембранный домен CD4; и мостовой фактор представляет собой рапамицин, темсиrolimus или эверолимус.

4. Зетакины

В различных вариантах осуществления иммунные эффекторские клетки содержат химерный цитокиновый рецептор, который перенаправляет цитотоксическое действие на опухолевые клетки. Зетакины представляют собой химерные трансмембранные иммунорецепторы, содержащие внеклеточный домен, содержащий растворимый рецепторный лиганд, связанный с областью подложки, способной закреплять внеклеточный домен на клеточной поверхности, трансмембранную область и внутриклеточный сигнальный домен. При экспрессии на поверхности Т-лимфоцитов зетакины направляют активность Т-клеток на те клетки, которые экспрессируют рецептор, к которому специфичен растворимый рецепторный лиганд. Зетакиновые химерные иммунорецепторы перенаправляют антигенную специфичность Т-клеток, что используют для лечения различных раковых заболеваний, в частности, через системы аутокринных/паракринных цитокинов, задействованные злокачественными новообразованиями человека.

В частных вариантах осуществления рассматриваемые в настоящем документе иммунные эффекторские клетки содержат одну или более цепей зетакинового рецептора и преобразователь сигналов CTBR. В одном из вариантов осуществления Т-клетки генетически модифицированы путем введения полинуклеотида или вектора, кодирующего одну или более цепей зетакинового рецептора и преобразователь сигналов CTBR, разделенные одним или более сигналами расщепления полипептида. В одном из вариантов осуществления Т-клетки генетически модифицированы путем введения полинуклеотида или вектора, кодирующего одну или более цепей зетакинового рецептора, и полинуклеотида или вектора, кодирующего преобразователь сигналов CTBR. В одном из вариантов осуществления Т-клетки генетически модифицированы для экспрессии одной или более цепей зетакинового рецептора и дополнительно генетически модифицированы путем введения полинуклеотида или вектора, кодирующего преобразователь сигналов CTBR.

В частных вариантах осуществления зетакин содержит иммуносупрессивный цитокин или его вариант, связывающийся с цитокиновым рецептором, линкер, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен.

В частных вариантах осуществления цитокин или его вариант, связывающийся с цитокиновым рецептором, выбран из группы, состоящей из интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-8 (IL-8), интерлейкина-10 (IL-10) и интерлейкина-13 (IL-13).

В отдельных вариантах осуществления линкер содержит домен CH2CH3, шарнирный домен или тому подобное. В одном из вариантов осуществления линкер содержит домены CH2 и CH3 IgG1, IgG4 или IgD. В одном из вариантов осуществления линкер содержит шарнирный домен CD8 α или CD4.

В частных вариантах осуществления трансмембранный домен выбран из группы, состоящей из альфа- или бета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD154, AMN и PD-1.

В частных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен выбран из группы, состоящей из ITAM, содержащего первичный сигнальный домен и/или костимулирующий домен.

В частных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен выбран из группы, состоящей из: FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

В частных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен выбран из группы, состоящей из: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54(ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM и ZAP70.

В одном из вариантов осуществления химерный цитокиновый рецептор содержит один или более костимулирующих сигнальных доменов, выбранных из группы, состоящей из CD28, CD137 и CD134, и первичный сигнальный домен CD3 ζ .

Е. Полипептиды

В настоящем документе рассматриваются различные полипептиды, включая, не ограничиваясь перечисленным, полипептиды, преобразующие сигналы TGF β , CTBR, сконструированные TCR, CAR, DARIC, зетакины, слитые белки, содержащие вышеуказанные полипептиды, и их фрагменты. В предпочти-

тельных вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1-71. "Полипептид", "пептид" и "белок" используются взаимозаменяемо, если не указано иное, и имеют общепринятое значение, то есть подразумевают под собой последовательность аминокислот. В одном из вариантов осуществления "полипептид" включает слитые полипептиды и другие варианты. Полипептиды могут быть получены с использованием любого из множества хорошо известных рекомбинантных и/или синтетических методов. Полипептиды не ограничены конкретной длиной, например, они могут содержать полноразмерную белковую последовательность, фрагмент полноразмерного белка или слитый белок, и могут включать посттрансляционные модификации полипептида, например, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и тому подобное, а также другие модификации, известные в данной области техники, как встречающиеся, так и не встречающиеся в природе.

"Выделенный пептид" или "выделенный полипептид" и тому подобное в контексте настоящего документа относится к выделению и/или очистке молекулы пептида или полипептида *in vitro* из клеточного окружения и из ассоциации с другими компонентами клетки, т.е. указанная молекула по существу не связана с веществами *in vivo*.

Полипептиды включают "варианты полипептидов". Варианты полипептидов могут отличаться от природного полипептида одной или более заменами, делениями, добавлениями и/или инсерциями. Такие варианты могут встречаться в природе или могут быть получены синтетически, например, путем модификации одной или более из вышеуказанных полипептидных последовательностей. Например, в частных вариантах осуществления может быть желательно улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства полипептида путем введения в полипептид одной или более замен, делений, добавлений и/или инсерций. В частных вариантах осуществления полипептиды включают полипептиды, аминокислотная последовательность которых по меньшей мере приблизительно на 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 86, 97, 98 или 99% идентична любой из референсных последовательностей, рассматриваемых в настоящем документе, как правило при сохранении вариантом по меньшей мере одного вида биологической активности референсной последовательности.

Варианты полипептидов включают биологически активные "полипептидные фрагменты". Иллюстративные примеры биологически активных полипептидных фрагментов включают ДНК-связывающие домены, нуклеазные домены и тому подобное. В контексте настоящего документа термин "биологически активный фрагмент" или "минимальный биологически активный фрагмент" относится к полипептидному фрагменту, сохраняющему по меньшей мере 100%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 10% или по меньшей мере 5% от активности природного полипептида. В отдельных вариантах осуществления полипептидный фрагмент может содержать аминокислотную цепь длиной от по меньшей мере 5 до 1700 аминокислот. Должно быть ясно, что в отдельных вариантах осуществления фрагменты имеют по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700 или более аминокислот в длину.

В частных вариантах осуществления полипептиды, описанные в настоящем документе, могут содержать одну или более аминокислот, обозначенных как "X". "X", если она присутствует в аминокислоте SEQ ID NO, относится к любой одной или любым нескольким аминокислотам. В частных вариантах осуществления SEQ ID NO, обозначающие слитый белок, содержат непрерывную последовательность остатков X, которые в совокупности представляют собой любую аминокислотную последовательность.

Как отмечено выше, полипептиды могут быть изменены различными способами, включая аминокислотные замены, деления, усечения и инсерции. Способы осуществления таких манипуляций широко известны в данной области техники. Например, варианты аминокислотной последовательности референсного полипептида могут быть получены путем введения мутаций в ДНК. Способы мутагенеза и изменения нуклеотидных последовательностей хорошо известны в данной области техники. См., например, Kunkel (1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 488-492), Kimkel et al., (1987, Methods in Enzymol, 154: 367-382), патент США № 4873192, Watson, J. D. et al, (Molecular Biology of the Gene, Fourth Edition, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) и ссылки, цитируемые в указанных источниках. Руководство по выбору подходящих аминокислотных замен, которые не влияют на биологическую активность представляющего интерес белка, содержится в модели согласно Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl Biomed. Res. Found, Washington, D.C.).

В частных вариантах осуществления вариант полипептида содержит одну или более консервативных замен. "Консервативная замена" представляет собой замену, при которой аминокислота заменяется другой аминокислотой, которая обладает схожими свойствами, так что специалист в области пептидной химии может ожидать, что вторичная структура и профиль гидрофобности полипептида по существу не изменятся. В структуре полинуклеотидов и полипептидов, рассматриваемых в частных вариантах осуще-

ствления, могут быть сделаны модификации, позволяющие по-прежнему получить функциональную молекулу, кодирующую вариант или производное полипептида с желаемыми характеристиками. Когда желательно изменить аминокислотную последовательность полипептида для создания эквивалентного или даже улучшенного варианта полипептида, специалист в данной области техники может, например, изменить один или более кодонов кодирующей последовательности ДНК, например, согласно табл. 1.

Таблица 1. Кодоны аминокислот

Аминокислоты	Однобуквенный код	Трехбуквенный код	Кодоны			
Аланин	A	Ala	GC A	GC C	GC G	GCU
Цистеин	C	Cys	UG C	UGU		
Аспарагиновая кислота	D	Asp	GA C	GAU		
Глутаминовая кислота	E	Glu	GA A	GAG		
Фенилаланин	F	Phe	UU C	UUU		
Глицин	G	Gly	GG	GG	GG	GGU

			A	C	G			
Гистидин	H	His	CA C	CAU				
Изолейцин	I	Iso	AU A	AU C	AUU			
Лизин	K	Lys	AA A	AAG				
Лейцин	L	Leu	UU A	UU G	CU A	CU C	CU G	CU U
Метионин	M	Met	AUG					
Аспарагин	N	Asn	AA C	AAU				
Пролин	P	Pro	CC A	CC C	CC G	CCU		
Глутамин	Q	Gln	CA A	CAG				
Аргинин	R	Arg	AG A	AG G	CG A	CG C	CG G	CG U
Серин	S	Ser	AG C	AG U	UC A	UC C	UC G	UC U
Треонин	T	Thr	AC A	AC C	AC G	ACU		
Валин	V	Val	GU	GU	GU	GUU		

			A	C	G		
Триптофан	W	Trp	UGG				
Тирозин	Y	Tyr	UA C	UAU			

То, какие аминокислотные остатки могут быть заменены, вставлены или удалены без потери биологической активности, можно определить, руководствуясь компьютерными программами, хорошо известными в данной области техники, такими как DNASTAR, DNA Strider, Geneious, Mac Vector или Vector

NTI. Предпочтительно изменения аминокислот в вариантах белка, раскрытых в настоящем документе, представляют собой консервативные аминокислотные замены, т.е. замены одинаково заряженных или незаряженных аминокислот. Консервативное изменение аминокислот включает замену одной аминокислоты из семейства аминокислот, имеющих родственные боковые цепи. Природные аминокислоты обычно подразделяются на четыре семейства: кислые (аспартат, глутамат), основные (лизин, аргинин, гистидин), неполярные (аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан) и незаряженные полярные (глицин, аспарагин, глутамин, пистеин, серин, треонин, тирозин) аминокислоты. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда все вместе относят к ароматическим аминокислотам. Подходящие консервативные замены аминокислот в пептиде или белке известны специалистам в данной области техники и обычно могут быть сделаны без изменения биологической активности получающейся в результате молекулы. Специалистам в данной области техники ясно, что, как правило, одиночные аминокислотные замены в несущественных областях полипептида по существу не изменяют биологическую активность (см., например, Watson et al. *Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., с 224).

В одном из вариантов осуществления, когда желательна экспрессия двух или более полипептидов, кодирующие их полинуклеотидные последовательности могут быть разделены последовательностью IRES, как раскрыто в других частях настоящего документа.

Полипептиды, рассматриваемые в частных вариантах осуществления, включают слитые полипептиды. В частных вариантах осуществления предложены слитые полипептиды и полинуклеотиды, кодирующие слитые полипептиды. Слитые полипептиды и слитые белки относятся к полипептиду, имеющему по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять полипептидных сегментов.

В еще одном варианте осуществления два или более полипептида могут быть экспрессированы в виде слитого белка, содержащего одну или несколько последовательностей саморасщепляющихся полипептидов, как раскрыто в других частях настоящего документа.

Слитые полипептиды могут содержать один или более полипептидных доменов или сегментов, включая, не ограничиваясь перечисленным, сигнальные пептиды, домены проникающих в клетку пептидов (CPP), ДНК-связывающие домены, нуклеазные домены и т.д., эпитопные метки (например, мальтоза-связывающий белок ("MBP"), глутатион-S-трансфераза (GST), HIS6, MYC, FLAG, V5, VSV-G и HA), полипептидные линкеры и сигналы расщепления полипептидов. В слитых полипептидах С-конец обычно связан с N-концом, хотя также могут быть связаны С-конец с С-концом, N-конец с N-концом или N-конец с С-концом. В частных вариантах осуществления полипептиды в составе слитого белка могут присутствовать в любом порядке. Слитые полипептиды или слитые белки могут также включать консервативно модифицированные варианты, полиморфные варианты, аллели, мутанты, последовательности и межвидовые гомологи, при условии сохранения желаемой активности слитого полипептида. Слитые полипептиды могут быть получены методами химического синтеза или химического связывания двух фрагментов, или, в целом, могут быть получены с использованием других стандартных методов. Литературные последовательности ДНК, содержащие слитый полипептид, функционально связаны с подходящими элементами контроля транскрипции или трансляции, как описано в других частях настоящего документа.

Слитые полипептиды могут необязательно содержать линкер, который может применяться для связывания одного или более полипептидов или доменов в составе полипептида. Пептидная линкерная последовательность может быть использована для разделения любых двух или более полипептидных компонентов на расстояние, достаточное для того, чтобы каждый полипептид укладывался в свои соответствующие вторичные и третичные структуры, чтобы позволить полипептидным доменам выполнять требуемые функции. Таковую пептидную линкерную последовательность включают в слитый полипептид с использованием стандартных методов в данной области техники. Подходящие пептидные линкерные последовательности могут быть выбраны на основании следующих факторов: (1) их способности принимать гибкую вытянутую конформацию; (2) их неспособности принять вторичную структуру, которая могла бы взаимодействовать с функциональными эпитопами на первом и втором полипептидах; и (3) отсутствие гидрофобных или заряженных остатков, которые могли бы взаимодействовать с полипептидными функциональными эпитопами. Предпочтительные пептидные линкерные последовательности содержат остатки Gly, Asn и Ser. Другие почти нейтральные аминокислоты, такие как Thr и Ala, также могут применяться в линкерной последовательности. Аминокислотные последовательности, которые можно эффективно использовать в качестве линкеров, включают последовательности, раскрытые в Maratea et al., *Gene* 40:39-46, 1985; Murphy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8258-8262, 1986; патенте США № 4935233 и патенте США № 4751180. Линкерные последовательности не требуются, когда конкретный сегмент слитого полипептида содержит несущественные N-концевые аминокислотные области, которые могут быть использованы для разделения функциональных доменов и предотвращения стерического влияния. Предпочтительные линкеры обычно представляют собой гибкие аминокислотные подпоследовательности, которые синтезируются как часть рекомбинантного слитого белка. Линкерные полипептиды могут иметь от 1 до 200 аминокислот в длину, от 1 до 100 аминокислот в длину или от 1 до 50 аμιно-

кислот в длину, включая все целочисленные значения между указанными.

Иллюстративные сигналы расщепления полипептидов включают сайты распознавания расщепления полипептидов, такие как сайты расщепления протеазами, сайты расщепления нуклеазами (например, сайты распознавания редких ферментов рестрикции, саморасщепляющиеся сайты распознавания рибозимов) и саморасщепляющиеся вирусные олигопептиды (см. deFelipe and Ryan, 2004. Traffic, 5(8); 616-26).

Подходящие сайты расщепления протеазами и саморасщепляющиеся пептиды известны специалистам в данной области техники (см., например, Ryan et al., 1997. J. Gener. Virol. 78, 699-722; Scymczak et al. (2004) Nature Biotech. 5, 589-594). Примеры сайтов расщепления протеазами включают, не ограничиваясь перечисленным, сайты расщепления протеазами Nla потивируса (например, протеазами вируса гравировки табака), протеазами HC потивируса, протеазами PI (P35) потивируса, протеазами Nla байовируса, протеазами, кодируемыми РНК-2 байовируса, протеазами L афтовируса, протеазами 2A энтеровируса, протеазами 2A риновируса, протеазами 3С пикорнавируса, протеазами 24К комовируса, протеазами 24К неповируса, 3С-подобной протеазой RTSV (сферического вируса риса тунгро), 3С-подобной протеазой РYVФ (вируса желтой пятнистости пастернака), гепарином, тромбином, фактором Ха и энтерокиназой. Благодаря высокой точности расщепления сайты расщепления протеазой TEV (вируса гравировки табака) являются предпочтительными в одном из вариантов осуществления, например, EXXXYXQ(G/S) (SEQ ID NO: 47), например, ENLYFQG (SEQ ID NO: 48) и ENLYFQS (SEQ ID NO: 49), где X представляет собой любую аминокислоту (расщепление посредством TEV происходит между Q и G или Q и S).

В отдельных вариантах осуществления сайт саморасщепления полипептида содержит 2А или 2А-подобный сайт, последовательность или домен (Donnelly et al., 2001. J. Gen. Virol. 82:1027-1041). В частном варианте осуществления вирусный пептид 2А представляет собой пептид 2А афтовируса, пептид 2А потивируса или пептид 2А кардиовируса.

В одном из вариантов осуществления вирусный пептид 2А выбран из группы, состоящей из: пептида вируса ящура (FMDV) (F2A), пептида вируса ринита лошадей А (ERAV) (E2A), пептида вируса Thorsea asigna (TaV) (T2A), пептида тешовируса-1 свиней (PTV-1) (P2A), пептида 2А тейловируса и пептида 2А вируса энцефаломиокардита. Иллюстративные примеры сайтов 2А представлены в табл. 2.

Таблица 2

SEQ ID NO: 50	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO: 51	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO: 52	LLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO: 53	GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP
SEQ ID NO: 54	EGRGSLLTCGDVEENPGP
SEQ ID NO: 55	LLTCGDVEENPGP
SEQ ID NO: 56	GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP

SEQ ID NO: 57	QCTNYALLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 58	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 59	GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 60	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 61	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 62	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 63	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 64	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 65	NFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 66	QLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 67	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:	VTELLYRMKRAETCYCPRLLAHPTEARHKQKIVAPVKQT
68	
SEQ ID NO: 69	LNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 70	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 71	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

В предпочтительных вариантах осуществления полипептид содержит полипептид преобразователя сигналов CTBR.

Г. Полинуклеотиды

В частных вариантах осуществления предложены полинуклеотиды, кодирующие полипептиды преобразователей сигналов TGF β , CTBR, сконструированные TCR, CAR, DARIC, зетакины, слитые белки, содержащие вышеуказанные полипептиды, и их фрагменты. В контексте настоящего документа термины "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота" относятся к дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК), рибонуклеиновой кислоте (РНК) и гибридам ДНК и РНК. Полинуклеотиды могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, а также рекомбинантными, синтетическими или выделенными. Полинуклеотиды включают, не ограничиваясь перечисленным: предшественник информационной РНК (пре-иРНК), информационную РНК (иРНК), РНК, короткую интерферирующую РНК (киРНК), короткую шпилечную РНК (кшРНК), микроРНК, рибозимы, геномную РНК (гРНК), плюс-цепь РНК (РНК(+)), минус-цепь РНК (РНК(-)), транскрибирующую CRISPR РНК (тракрРНК), CRISPR РНК (крРНК), одиночную направляющую РНК (онРНК), синтетическую РНК, синтетическую иРНК, геномную ДНК (гДНК), амплифицированную ПЦР ДНК, комплементарную ДНК (кДНК), синтетическую ДНК или рекомбинантную ДНК. Полинуклеотиды относятся к полимерной форме нуклеотидов длиной по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 400, по меньшей мере 500, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 5000, по меньшей мере 10000 или по меньшей мере 15000 или более нуклеотидов, представляющих собой рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды, или модифицированную форму любого из этих типов нуклеотидов, а также любой промежуточной длины. Понятно, что "промежуточные длины" в данном контексте означают лю-

бую длину между указанными значениями, например 6, 7, 8, 9 и т.д., 101, 102, 103 и т.д.; 151, 152, 153 и т.д.; 201, 202, 203 и т. д. В частных вариантах осуществления последовательность полинуклеотидов или вариантов по меньшей мере или приблизительно на 50, 55, 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична референсной последовательности.

В частных вариантах осуществления полинуклеотиды могут быть кодоноптоимизированными. В контексте настоящего документа термин "кодоноптоимизированный" относится к замене кодонов в полинуклеотиде, кодирующем полипептид, для увеличения экспрессии, стабильности и/или активности полипептида. Факторы, влияющие на оптимизацию кодонов, включают, не ограничиваясь перечисленным, одно или более из: (i) вариации смещения кодонов между двумя или более организмами или генами или синтетически сконструированными таблицами смещения, (ii) вариации степени смещения кодонов в организме, гене или наборе генов, (iii) систематической вариации кодонов, включая контекстную, (iv) вариации кодонов в соответствии с их декодирующими tРНК, (v) вариации кодонов в соответствии с GC% (гуанин-цитозиновым содержанием), либо в целом, либо в одной позиции триплета, (vi) вариации степени сходства с референсной последовательностью, например, встречающейся в природе последовательностью, (vii) вариации частоты отсечки кодонов, (viii) структурных свойств иРНК, транскрибируемых с последовательности ДНК, (ix) ранее полученных знаний о функции последовательностей ДНК, на которой должен строиться набор замещений кодонов, (x) систематической вариации наборов кодонов для каждой аминокислоты и/или (xi) изолированного удаления ложных сайтов инициации трансляции.

В контексте настоящего документа термин "нуклеотид" относится к гетероциклическому азотистому основанию, связанному N-гликозидной связью с фосфорилированным сахаром. Подразумевается, что нуклеотиды включают природные основания и широкий спектр признанных в данной области техники модифицированных оснований. Такие основания обычно расположены в положении 1' сахарного фрагмента нуклеотида. Нуклеотиды обычно содержат основание, сахар и фосфатную группу. В рибонуклеиновой кислоте (РНК) сахар представляет собой рибозу, а в дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК) сахар представляет собой дезоксирибозу, т.е. сахар, в котором отсутствует гидроксильная группа, присутствующая в рибозе. Примеры природных азотистых оснований включают пурины аденозин (А) и гуанидин (G), и пиримидины пиримидин (C) и тимидин (T) (или в молекуле РНК урацил (U)). Атом C-1 дезоксирибозы связан с N-1 пиримидина или N-9 пурина. Нуклеотиды обычно представляют собой моно-, ди- или трифосфаты. Нуклеотиды могут быть немодифицированными или модифицированными по фрагменту сахара, фосфата и/или основания (также взаимозаменяемо называемые аналогами нуклеотидов, производными нуклеотидов, модифицированными нуклеотидами, неприродными нуклеотидами и нестандартными нуклеотидами; см., например, WO 92/07065 и WO 93/15187). Примеры модифицированных оснований нуклеиновых кислот кратко описаны Limbach et al. (1994, *Nucleic Acids Res.* 22, 2183-2196).

Нуклеотид также может рассматриваться как сложный эфир фосфорной кислоты и нуклеозида, причем этерификация происходит на гидроксильной группе, присоединенной к C-5 сахара. В контексте настоящего документа термин "нуклеозид" относится к гетероциклическому азотистому основанию, связанному N-гликозидной связью с сахаром. В данной области техники признано, что нуклеозиды включают природные основания, а также включают хорошо известные модифицированные основания. Такие основания обычно расположены в положении 1' сахарного фрагмента нуклеозида. Нуклеозиды обычно содержат основание и сахарную группу. Нуклеозиды могут быть немодифицированными или модифицированными по фрагменту сахара и/или основания (также взаимозаменяемо называемые аналогами нуклеозидов, производными нуклеозидов, модифицированными нуклеозидами, неприродными нуклеозидами или нестандартными нуклеозидами). Как отмечено выше, примеры модифицированных оснований нуклеиновых кислот кратко описаны Limbach et al. (1994, *Nucleic Acids Res.* 22, 2183-2196).

Иллюстративные примеры полинуклеотидов включают, не ограничиваясь перечисленным, полинуклеотиды, кодирующие SEQ ID NO: 1-71.

В различных иллюстративных вариантах осуществления полинуклеотиды, рассматриваемые в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленным, полинуклеотиды, кодирующие преобразователи сигналов TGF β , преобразователи сигналов CTBR, сконструированные антигенные рецепторы, слитые полипептиды и векторы экспрессии, вирусные векторы и трансферные плазмиды, содержащие полинуклеотиды, рассматриваемые в настоящем документе.

В контексте настоящего документа термины "вариант полинуклеотида" и "вариант" и тому подобное относятся к полинуклеотидам, демонстрирующим существенную идентичность последовательности с референсной полинуклеотидной последовательностью, или полинуклеотидам, гибридизующимся с референсной последовательностью в жестких условиях, которые определены ниже в настоящем документе. Эти термины также охватывают полинуклеотиды, отличающиеся от референсного полинуклеотида добавлением, делецией, заменой или модификацией по меньшей мере одного нуклеотида. Соответственно термины "вариант полинуклеотида" и "вариант" включают полинуклеотиды, в которых один или более нуклеотидов были добавлены или удалены, или модифицированы, или заменены другими нуклеотидами. В этой связи в данной области техники хорошо известно, что в референсный полинуклеотид могут быть внесены определенные изменения, включая мутации, добавления, делеции и замены, в результате кото-

рых измененный полинуклеотид сохраняет биологическую функцию или активность референсного полинуклеотида.

В одном из вариантов осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты в жестких условиях. Гибридизация в "жестких условиях" относится к протоколам гибридизации, в результате которой гибридизуются нуклеотидные последовательности, идентичные друг другу по меньшей мере на 60%. Обычно жесткие условия выбирают так, чтобы температура составляла приблизительно на 5°C ниже, чем температура плавления (T_m) для конкретной последовательности при определенной ионной силе и pH. T_m представляет собой температуру (при определенной ионной силе, pH и концентрации нуклеиновой кислоты), при которой 50% зондов, комплементарных целевой последовательности, гибридизуются с целевой последовательностью в равновесном состоянии. Поскольку целевые последовательности обычно присутствуют в избытке, при T_m 50% зондов занято в равновесном состоянии.

Выражения "идентичность последовательностей" или, например, содержащие слова "последовательность, на 50% идентичная" в контексте настоящего документа относятся к той степени, в которой последовательности идентичны друг другу при сравнении составляющих их нуклеотидов или аминокислот в пределах окна сравнения. Таким образом, "процент идентичности последовательностей" может быть рассчитан путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в пределах окна сравнения, определения количества позиций, в которых в обеих последовательностях присутствуют идентичные основания нуклеиновой кислоты (например, A, T, C, G, I) или идентичные аминокислотные остатки (например, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, He, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys и Met), с получением количества совпадающих позиций, деления количества совпадающих позиций на общее количество позиций в пределах окна сравнения (т.е. размер окна) и умножения результата на 100 с получением процента идентичности последовательностей. Включены нуклеотиды и полипептиды, последовательность которых по меньшей мере приблизительно на 50, 55, 60, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична любой из референсных последовательностей, описанных в настоящем документе, как правило, где вариант полипептида сохраняет по меньшей мере один вид биологической активности референсного полипептида.

Термины, используемые для описания соответствия последовательностей между двумя или более полинуклеотидами или полипептидами, включают термины "референсная последовательность", "окно сравнения", "идентичность последовательности", "процент идентичности последовательностей" и "по существу идентичный". "Референсная последовательность" имеет длину по меньшей мере 12, но часто от 15 до 18 и часто по меньшей мере 25 мономерных единиц, включая нуклеотиды и аминокислотные остатки. Поскольку каждый из двух полинуклеотидов может содержать (1) последовательность (т.е. только часть полной полинуклеотидной последовательности), схожую у двух полинуклеотидов, и (2) последовательность, различающуюся у двух полинуклеотидов, сравнения последовательностей двух (или более) полинуклеотидов обычно проводят путем сравнения последовательностей двух полинуклеотидов в пределах "окна сравнения" для идентификации и сравнения локальных областей сходства последовательностей. "Окно сравнения" относится к воображаемому сегменту из по меньшей мере 6 смежных позиций, обычно от приблизительно 50 до приблизительно 100, чаще от приблизительно 100 до приблизительно 150, в котором последовательность сравнивается с референсной последовательностью, содержащей такое же количество смежных позиций, после оптимального выравнивания двух последовательностей. Окно сравнения может содержать добавления или деления (т.е. гэпы) в количестве приблизительно 20% или менее по сравнению с референсной последовательностью (не содержащей добавлений или делений) для оптимального выравнивания двух последовательностей.

Оптимальное выравнивание последовательностей для выравнивания окна сравнения может быть выполнено с помощью компьютеризированных реализаций алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мадисон, Висконсин, США) или путем проверки и получения наилучшего выравнивания (т.е. приводящего к наибольшей процентной гомологии в пределах окна сравнения) любым из выбранных способом. Также можно упомянуть семейство программ BLAST, как, например, описано Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25: 3389. Подробное обсуждение анализа последовательностей можно найти в разделе 19.3 источника Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, глава 15.

В контексте настоящего документа термин "выделенный полинуклеотид" относится к полинуклеотиду, очищенному от последовательностей, фланкирующих его в природном состоянии, например, фрагменту ДНК, удаленному из последовательностей, которые обычно с ним соседствуют. "Выделенный полинуклеотид" также относится к комплементарной ДНК (кДНК), рекомбинантной ДНК или другому полинуклеотиду, который не существует в природе и был получен человеком.

В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит иРНК, кодирующую полипептид, рассматриваемый в настоящем документе. В отдельных вариантах осуществления иРНК содержит кэп, один или более нуклеотидов и поли(A)-хвост.

Термины, описывающие ориентацию полинуклеотидов, включают 5' (обычно конец полинуклеотида, имеющий свободную фосфатную группу) и 3' (обычно конец полинуклеотида, имеющий свободную гидроксильную (ОН) группу). Полинуклеотидные последовательности могут быть сопровождаемы комментарием об ориентации 5'-3' или 3'-5'. В случае ДНК и иРНК 5'-3' цепь называют "смысловой", "плюс" или "кодирующей" цепью, так как ее последовательность идентична последовательности предшественника (пре-иРНК) [за исключением урацила (U) в РНК вместо тимина (T) в ДНК]. В случае ДНК и иРНК комплементарную 3'-5' цепь, представляющую собой цепь, транскрибируемую РНК-полимеразой, называют "матричной", "антисмысловой", "минус" или "некодирующей" цепью. В контексте настоящего документа термин "обратная ориентация" относится к последовательности 5'-3', записанной в ориентации 3'-5', или последовательности 3'-5', записанной в ориентации 5'-3'.

Термины "комплементарный" и "комплементарность" относятся к полинуклеотидам (т. е. последовательностям нуклеотидов), которые могут взаимодействовать в соответствии с правилами спаривания оснований. Например, цепью, комплементарной последовательности ДНК 5' AGTCATG3', является 3' TCAGTAC5'. Последнюю последовательность часто записывают в виде обратного комплемента, с 5'-концом слева и 3'-концом справа 5' CATGACT3'. Последовательность, равная своему обратному комплементу, называется палиндромной последовательностью. Комплементарность может быть "частичной", когда только некоторые основания нуклеиновых кислот могут взаимодействовать в соответствии с правилами спаривания оснований. Или между нуклеиновыми кислотами может быть "совершенная" или "полная" комплементарность.

Кроме того, специалистам в данной области техники должно быть ясно, что вследствие вырожденности генетического кода существует много нуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептид или его фрагмент, как описано в настоящем документе. Некоторые из этих полинуклеотидов обладают минимальной гомологией с нуклеотидной последовательностью любого нативного гена. Тем не менее полинуклеотиды, различающиеся из-за различий в использовании кодонов, отдельно рассматриваются в частных вариантах осуществления, например полинуклеотиды, оптимизированные путем выбора кодонов человека и/или приматов. В частных вариантах осуществления полинуклеотиды являются кодон-оптимизированными для экспрессии и/или стабильности. Кроме того, могут также применяться аллели генов, содержащие полинуклеотидные последовательности, предложенные в настоящем документе.

Аллели представляют собой эндогенные гены, измененные в результате одной или более мутаций, таких как деления, добавления и/или замены нуклеотидов.

В контексте настоящего документа термин "кассета нуклеиновой кислоты" или "кассета экспрессии" относится к генетическим последовательностям в составе вектора, которые могут экспрессировать РНК, а затем полипептид. В одном из вариантов осуществления кассета нуклеиновой кислоты содержит представляющий(ие) интерес ген(ы), например, представляющий(ие) интерес полинуклеотид(ы). В еще одном варианте осуществления кассета нуклеиновой кислоты содержит одну или более последовательностей, контролирующих экспрессию, например, промотор, энхансер, поли(А)-последовательность, и представляющий(ие) интерес ген(ы), например, представляющий(ие) интерес полинуклеотид(ы). Векторы могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, или более кассет нуклеиновой кислоты. Кассета нуклеиновой кислоты позиционно и последовательно ориентирована в составе вектора таким образом, чтобы нуклеиновая кислота в кассете могла транскрибироваться в РНК и, при необходимости, транслироваться в белок или полипептид, подвергаться соответствующим посттрансляционным модификациям, необходимым для активности в трансформированной клетке, и могла быть перемещена в соответствующий компартмент для биологической активности путем нацеливания на соответствующие внутриклеточные компартменты или секрецию во внеклеточные компартменты. Предпочтительно 3'- и 5'-концы кассеты адаптированы для быстрой вставки в вектор, например, на каждом конце кассеты присутствуют сайты узнавания рестрикционной эндонуклеазы. В предпочтительном варианте осуществления кассета нуклеиновой кислоты содержит последовательность терапевтического гена, используемого для лечения, предотвращения или уменьшения интенсивности генного заболевания. Кассета может быть удалена и вставлена в плазмиду или вирусный вектор как единое целое.

Полинуклеотиды включают представляющий(ие) интерес полинуклеотид(ы). В контексте настоящего документа термин "представляющий интерес полинуклеотид" относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид или слитый полипептид или полинуклеотид, служащий в качестве матрицы для транскрипции ингибирующего полинуклеотида, рассматриваемого в настоящем документе.

Рассматриваемые в настоящем документе полинуклеотиды, независимо от длины самой кодирующей последовательности, могут быть объединены с другими последовательностями ДНК, такими как промоторы и/или энхансеры, нетранслируемые области (UTR), сигнальные последовательности, последовательности Козака, сигналы полиаденилирования, дополнительные сайты ферментов рестрикции, сайты множественного клонирования, внутренние сайты связывания рибосомы (IRES), сайты узнавания рекомбиназы (например, сайты LoxP, FRT и Att), терминирующие кодоны, сигналы терминации транскрипции и полинуклеотиды, кодирующие саморасщепляющиеся полипептиды, эпитопные метки, как описано в других частях настоящего документа или как известно в данной области техники, так что их

общая длина может значительно различаться. Поэтому предполагается, что может быть использован полинуклеотидный фрагмент практически любой длины, причем общая длина предпочтительно ограничена простотой получения и применения в предполагаемом протоколе получения рекомбинантной ДНК.

Полинуклеотиды могут быть получены, обработаны, экспрессированы и/или доставлены с использованием любого из множества общепризнанных методов, известных и доступных в данной области техники. Для экспрессии желаемого полипептида нуклеотидная последовательность, кодирующая указанный полипептид, может быть вставлена в соответствующий вектор.

Иллюстративные примеры векторов включают, не ограничиваясь перечисленным, плазмиду, автономно реплицирующиеся последовательности и транспозируемые элементы, например, *Sleeping Beauty*, *PiggyBac*.

Дополнительные иллюстративные примеры векторов включают, не ограничиваясь перечисленным, плазмиды, фазмиды, космиды, искусственные хромосомы, такие как дрожжевая искусственная хромосома (YAC), бактериальная искусственная хромосома (BAC) или искусственная хромосома из P1 (PAC), бактериофаги, такие как фаг лямбда или фаг M13, и вирусы животных.

Иллюстративные примеры вирусов, пригодных в качестве векторов, включают, не ограничиваясь перечисленным, ретровирус (включая лентивирус), аденовирус, аденоассоциированный вирус, герпесвирус (например, вирус простого герпеса), поксвирус, бакуловирус, папилломавирус и паповавирус (например, SV40).

Иллюстративные примеры векторов экспрессии включают, не ограничиваясь перечисленным, векторы pCneo (Promega) для экспрессии в клетках млекопитающих; pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ и pLenti6.2/V5-GW/lacZ (Invitrogen) для опосредованного лентивирусом переноса и экспрессии генов в клетках млекопитающих. В частных вариантах осуществления кодирующие последовательности полипептидов, раскрытых в настоящем документе, могут быть лигированы в такие векторы экспрессии для экспрессии полипептидов в клетках млекопитающих.

В частных вариантах осуществления вектор представляет собой эписомальный вектор или вектор, остающийся внехромосомным. В контексте настоящего документа термин "эписомальный" относится к вектору, который способен реплицироваться без интеграции в хромосомную ДНК хозяина и без постепенной потери из делящейся клетки-хозяина, а также означает, что указанный вектор реплицируется внехромосомно или эписомально.

"Последовательности, контролирующие экспрессию", "элементы контроля" или "регуляторные последовательности", присутствующие в векторе экспрессии, представляют собой нетранслируемые области вектора - точку начала репликации, селекционные кассеты, промоторы, энхансеры, сигналы инициации трансляции (последовательность Шайна-Дальгарно или последовательность Козака), интроны, последовательность полиаденилирования, 5'- и 3'-нетранслируемые области -которые взаимодействуют с клеточными белками хозяина для осуществления транскрипции и трансляции. Такие элементы могут различаться по своей силе и специфичности. В зависимости от используемой векторной системы и хозяина может быть использовано любое количество подходящих транскрипционных и трансляционных элементов, включая универсальные промоторы и индуцируемые промоторы.

В частных вариантах осуществления полинуклеотид содержит вектор, включая, не ограничиваясь перечисленным, векторы экспрессии и вирусные векторы. Вектор может содержать одну или более экзогенных, эндогенных или гетерологичных контрольных последовательностей, таких как промоторы и/или энхансеры. "Эндогенная контрольная последовательность" представляет собой последовательность, которая естественным образом связана с данным геном в геноме. "Экзогенная контрольная последовательность" представляет собой последовательность, которая помещается рядом с геном посредством генетических манипуляций (т.е. молекулярно-биологических методов), так что транскрипцией этого гена управляет связанный энхансер/промотор. "Гетерологичная контрольная последовательность" представляет собой экзогенную последовательность, которая принадлежит к другому виду, нежели клетки, подвергаемые генетической манипуляции. "Синтетическая" контрольная последовательность может содержать элементы еще одной эндогенной и/или экзогенной последовательности, и/или последовательностей, определенных *in vitro* или *in silico*, обеспечивающих оптимальную активность промотора и/или энхансера для конкретного вида терапии.

В контексте настоящего документа термин "промотор" относится к сайту распознавания полинуклеотида (ДНК или РНК), с которым связывается РНК-полимераза. РНК-полимераза иницирует и осуществляет транскрипцию полинуклеотидов, функционально связанных с промотором. В частных вариантах осуществления промоторы, действующие в клетках млекопитающих, содержат АТ-богатую область, расположенную на расстоянии приблизительно 25-30 оснований против хода транскрипции от сайта, в котором иницируется транскрипция, и/или другую последовательность, находящуюся на расстоянии 70-80 оснований против хода транскрипции от места начала транскрипции, область CNCAAT, где N может представлять собой любой нуклеотид.

Термин "энхансер" относится к сегменту ДНК, который содержит последовательности, способные обеспечивать усиленную транскрипцию, и в некоторых случаях могут функционировать независимо от

их ориентации относительно другой контрольной последовательности. Энхансер может функционировать совместно или в дополнение к промоторам и/или другим энхансерным элементам. Термин "промотор/энхансер" относится к сегменту ДНК, содержащему последовательности, способные выполнять функции как промотора, так и энхансера.

Термин "функционально связанный" относится к смежному расположению, в котором описанные компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать надлежащим образом. В одном из вариантов осуществления термин относится к функциональной связи между последовательностью, контролирующей экспрессию нуклеиновой кислоты (такой как промотор и/или энхансер), и второй полинуклеотидной последовательностью, например представляющим интерес полинуклеотидом, где последовательность, контролирующая экспрессию, управляет транскрипцией нуклеиновой кислоты, соответствующей второй последовательности.

В контексте настоящего документа термин "последовательность, контролирующая конститутивную экспрессию" относится к промотору, энхансеру или промотору/энхансеру, который постоянно или непрерывно обеспечивает транскрипцию функционально связанной последовательности.

Последовательность, контролирующая конститутивную экспрессию, может представлять собой "универсальный" промотор, энхансер или промотор/энхансер, обеспечивающий экспрессию в самых различных типах клеток и тканей, или "клеточно-специфический", "специфический для типа клеток", "специфический для линии клеток" или "тканеспецифический" промотор, энхансер или промотор/энхансер, обеспечивающий экспрессию в ограниченном разнообразии типов клеток и тканей соответственно.

Примеры универсальных последовательностей, контролирующих экспрессию, подходящих для применения в частных вариантах осуществления, включают, не ограничиваясь перечисленным, предранний промотор цитомегаловируса (CMV), вирусный промотор вируса обезьян 40 (SV40) (например, ранний или поздний), промотор LTR (длинного концевого повтора) вируса мышиного лейкоза Молони (MoMLV), LTR вируса саркомы Рауса (RSV), промотор вируса простого герпеса (HSV) (тимидинкиназы), промоторы H5, P7.5 и P11 вируса осповакцины, промотор фактора элонгации 1-альфа (EF1a), ответ на начальной стадии роста-1 (EGR1), Н-ферритин (FerH), L-ферритин (FerL), глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназу (GAPDH), эукариотический фактор инициации трансляции 4A1 (EIF4A1), белок 5 теплового шока, 70 кДа (HSPA5), белок теплового шока бета, член 1, 90 кДа (HSP90B1), белок теплового шока, 70 кДа (HSP70), β -кинезин (β -KIN), локус ROSA26 человека (Irions et al, Nature Biotechnology 25, 1477-1482 (2007)), промотор убиквитина C (UBC), промотор фосфоглицераткиназы-1 (PGK), энхансер цитомегаловируса/промотор β -актина курицы (CAG), промотор β -актина и энхансер вируса миелопрлиферативной саркомы, промотор с удаленной областью негативной регуляции и заменой на сайт связывания праймера dl587rev (MND) (Challita et al., J Virol. 69(2):748-55 (1995)).

В одном из вариантов осуществления вектор содержит промотор MND.

В одном из вариантов осуществления вектор содержит промотор EF1a, содержащий первый интрон гена EF1a человека.

В одном из вариантов осуществления вектор содержит промотор EF1a, в котором отсутствует первый интрон гена EF1a человека.

В частном варианте осуществления может быть желательно использовать клеточноспецифическую, специфическую для типа клеток, специфическую для линии клеток или тканеспецифическую последовательность, контролирующую экспрессию, для достижения специфической для типа клеток, специфической для линии клеток или тканеспецифической экспрессии желаемой полинуклеотидной последовательности (например, для экспрессии конкретной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, только в ряде типов клеток, линий клеток или тканей, или на определенных стадиях развития).

В частном варианте осуществления для экспрессии полинуклеотида может быть желательным промотор со специфической активностью в Т-клетках.

В контексте настоящего документа "условная экспрессия" может относиться к любому типу условной экспрессии, включая, не ограничиваясь перечисленным, индуцируемую экспрессию; подавляемую экспрессию; экспрессию в клетках или тканях, характеризующихся определенным физиологическим, биологическим или патологическим состоянием и т.д. Подразумевается, что это определение не исключает специфическую для типа клеток или тканеспецифическую экспрессию. В отдельных вариантах осуществления обеспечивается условная экспрессия представляющего интерес полинуклеотида, например, экспрессию контролируют, подвергая клетку, ткань, организм и т.д. обработке или воздействию условий, вызывающих экспрессию полинуклеотида или вызывающих увеличение или уменьшение экспрессии полинуклеотида, кодируемого представляющим интерес полинуклеотидом.

Иллюстративные примеры индуцируемых промоторов/систем включают, не ограничиваясь перечисленным, индуцируемые стероидами промоторы, такие как промоторы для генов, кодирующих глюкокортикоидные или эстрогеновые рецепторы (индуцируемые обработкой соответствующим гормоном), промотор металлотионеина (индуцируемый обработкой различными тяжелыми металлами), промотор MX-1 (индуцируемый интерфероном), система "GeneSwitch", регулируемая мифепристоном (Sirin et al., 2003, Gene, 323:67), переключение генов, индуцируемое куматом (WO 2002/088346), тетрациклин-

зависимые системы регуляции и т.д. Индуцирующие агенты включают, не ограничиваясь перечисленным, глюкокортикоиды, эстрогены, мифепристон (RU 486), металлы, интерфероны, малые молекулы, кумат, тетрациклин, доксициклин и их варианты.

Условная экспрессия также может быть достигнута с использованием сайт-специфической ДНК-рекомбиназы. Согласно отдельным вариантам осуществления вектор содержит по меньшей мере один (обычно два) сайт(а) для рекомбинации, опосредованный сайт-специфической рекомбиназой. В контексте настоящего документа термины "рекомбиназа" или "сайт-специфическая рекомбиназа" включают экспозиционные или интегративные белки, ферменты, кофакторы или ассоциированные белки, участвующие в реакциях рекомбинации с участием одного или более сайтов рекомбинации (например, двух, трех, четырех, пяти, семи, десяти, двенадцати, пятнадцати, двадцати, тридцати, пятидесяти и т.д.), которые могут представлять собой белки дикого типа (см. Landy, *Current Opinion in Biotechnology* 3:699-707 (1993)) или их мутанты, производные (например, слитые белки, содержащие последовательности рекомбинантных белков или их фрагменты), фрагменты и варианты. Иллюстративные примеры рекомбиназ, подходящих для применения в частных вариантах осуществления, включают, не ограничиваясь перечисленным, Cre, Int, IHF, Xis, Flp, Fis, Hin, Gin, ΦC31, Cin, резольвазу Tn3, TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCEI и ParA.

Полинуклеотиды могут содержать один или более сайтов рекомбинации для любой из множества сайт-специфических рекомбиназ. Следует понимать, что целевой сайт для сайт-специфической рекомбиназы является дополнением к любому сайту(ам), необходимому для интеграции вектора, например ретровирусного вектора или лентивирусного вектора. В контексте настоящего документа термины "последовательность рекомбинации", "сайт рекомбинации" или "сайт сайт-специфической рекомбинации" относятся к конкретной последовательности нуклеиновой кислоты, которую распознает и с которой связывается рекомбиназа.

Например, одним из сайтов рекомбинации для Cre-рекомбиназы является loxP, представляющий собой последовательность из 34 пар оснований, содержащую два инвертированных повтора из 13 пар оснований (служащих сайтами связывания рекомбиназы), фланкирующих коровую последовательность из 8 пар оснований (см. фиг. 1 в источнике Sauer, B., *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527 (1994)). Другие примеры сайтов loxP включают, не ограничиваясь перечисленным, lox511 (Hoess et al., 1996; Bethke and Sauer, 1997), lox5171 (Lee and Saito, 1998), lox2272 (Lee and Saito, 1998), m2 (Langer et al., 2002), lox71 (Albert et al., 1995) и lox66 (Albert et al., 1995).

Подходящие сайты узнавания для рекомбиназы FLP включают, не ограничиваясь перечисленным, FRT (McLeod et al., 1996), F₁, F₂, F₃ (Schlake and Bode, 1994), F₄, F₅ (Schlake and Bode, 1994), FRT(LE) (Senecoff et al., 1988), FRT(RE) (Senecoff et al., 1988).

Другими примерами последовательностей узнавания являются последовательности attB, attP, attL и attR, которые распознаются ферментом рекомбиназы λ-интегразой, например, φ-с31. Сайт-специфическая рекомбиназа φC31 опосредует рекомбинацию только между гетеротипическими сайтами attB (длиной 34 п.н.) и attP (длиной 39 п.н.) (Groth et al., 2000). attB и attP, названные по сайтам присоединения фаговой интегразы на бактериальном и фаговом геномах, соответственно, оба содержат несовершенные инвертированные повторы, которые, вероятно, связываются гомодимерами φC31 (Groth et al., 2000). Сайты продукта, attL и attR, эффективно инертны к дальнейшей рекомбинации, опосредованной φC31 (Belteki et al., 2003), что делает реакцию необратимой. В отношении катализа инсерций было обнаружено, что ДНК, несущая attB, встраивается в геномный сайт attP легче, чем сайт attP встраивается в геномный сайт attB (Thyagarajan et al., 2001; Belteki et al., 2003). Таким образом, в типичных методиках несущий attP "стыковочный сайт" путем гомологичной рекомбинации устанавливается в определенный локус, и затем соединяется с входящей последовательностью, несущей attB, для инсерций.

В контексте настоящего документа термин "внутренний сайт связывания рибосомы" или "IRES" относится к элементу, обеспечивающему непосредственное связывание рибосомы внутри иницирующего кодона, такого как ATG, пистрона (области, кодирующей белок), тем самым приводя к кэп-независимой трансляции гена. См., например, Jackson et al., 1990. *Trends Biochem Sci* 15(12):477-83) и Jackson and Kaminski. 1995 *RNA* 1(10):985-1000. Примеры IRES, обычно используемых специалистами в данной области техники, включают описанные в патенте США № 6692736. Дополнительные примеры "IRES", известных в данной области техники, включают, не ограничиваясь перечисленным, IRES, получаемый из пикорнавируса (Jackson et al., 1990), и IRES, получаемый из вирусных или клеточных источников иРНК, таких как, например, белок, связывающий тяжелую цепь иммуноглобулина (BiP), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) (Huez et al. 1998. *Mol. Cell. Biol* 18(11):6178-6190), фактор роста фибробластов-2 (FGF-2) и инсулиноподобный фактор роста (IGFII), фактор инициации трансляции eIF4G и факторы транскрипции дрожжей TFIIID и HAP4, вирус энцефаломиокардита (EMCV), коммерчески доступный от Novagen (Duke et al., 1992. *J. Virol* 66(3): 1602-9) и IRES VEGF (Huez et al., 1998. *Mol Cell Biol* 18(11): 6178-90). Ранее сообщалось о том, что IRES присутствует в вирусных геномах видов Picornaviridae, Dicistroviridae и Flaviviridae, а также в HCV (вирусе гепатита C), вирусе мышинного лейкоза Фрейда (FrMLV) и вирусе мышинного лейкоза Молони (MoMLV).

В одном из вариантов осуществления IRES, используемый в полинуклеотидах, рассматриваемых в настоящем документе, представляет собой IRES EMCV.

В частных вариантах осуществления полинуклеотиды включают полинуклеотиды, имеющие консенсусную последовательность Козака и кодирующие желаемый полипептид. В контексте настоящего документа термин "последовательность Козака" относится к короткой нуклеотидной последовательности, которая значительно облегчает начальное связывание иРНК с малой субъединицей рибосомы и увеличивает эффективность трансляции. Консенсусная последовательность Козака представляет собой (GCC)RCCATGG (SEQ ID NO:72), где R представляет собой пурин (А или G) (Kozak, 1986. Cell. 44(2): 283-92 и Kozak, 1987. Nucleic Acids Res. 15(20): 8125-48).

Элементы, направленные на эффективную терминацию и полиаденилирование транскриптов гетерологичной нуклеиновой кислоты, увеличивают гетерологичную экспрессию генов. Сигналы терминации транскрипции обычно находятся ниже по ходу транскрипции от сигнала полиаденилирования. В частных вариантах осуществления векторы содержат последовательность полиаденилирования 3'-конца полинуклеотида, кодирующего полипептид, который должен быть экспрессирован. В контексте настоящего документа термин "сайт полиА" или "последовательность полиА" обозначает последовательность ДНК, управляющую как терминацией, так и полиаденилированием растущего РНК-транскрипта с помощью РНК-полимеразы II. Последовательности полиаденилирования могут увеличивать стабильность иРНК путем добавления полиА-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности и, таким образом, способствовать повышению эффективности трансляции. Расщепление и полиаденилирование управляются последовательностью поли(А) в РНК. Основная последовательность поли(А) для пре-иРНК млекопитающих имеет два элемента узнавания, фланкирующих сайт расщепления-полиаденилирования. Как правило, почти инвариантный гексамер AAUAAA находится на расстоянии 20-50 нуклеотидов против хода транскрипции от более вариабельного элемента, богатого остатками U или GU. Расщепление растущего транскрипта происходит между этими двумя элементами и связано с добавлением до 250 аденозинов к 5'-концу продукта расщепления. В частных вариантах осуществления коровая последовательность поли(А) представляет собой идеальную последовательность полиА (например, AATAAA, ATTA-AA, AGTAAA). В частных вариантах осуществления последовательность поли(А) представляет собой последовательность полиА SV40, последовательность полиА бычьего гормона роста (BGHrA), последовательность полиА кроличьего β -глобина (grgA) или другую подходящую гетерологичную или эндогенную последовательность полиА, известную в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления в полинуклеотиде или клетке, несущих полинуклеотид, используется суицидальный ген, включая индуцируемый суицидальный ген, для снижения риска прямой токсичности и/или неконтролируемой пролиферации. В отдельных вариантах осуществления суицидальный ген не является иммуногенным для хозяина, несущего полинуклеотид или клетку. Примером одного из суицидальных генов, который можно использовать, является каспаза 9 или каспаза 8, или питозиндезаминаза.

Каспаза 9 может быть активирована с помощью специального химического индуктора димеризации (CID).

В отдельных вариантах осуществления полинуклеотиды содержат генные сегменты, обуславливающие восприимчивость иммунных эффекторных клеток, например Т-клеток, к отрицательному отбору *in vivo*. Под "отрицательным отбором" подразумевается, что введенная путем инфузии клетка может быть устранена в результате изменения состояния организма человека *in vivo*. Фенотип отрицательного отбора может быть результатом инсерции гена, придающего чувствительность вводимому агенту, например, соединению. Гены отрицательного отбора известны в данной области техники и включают, среди прочего, следующие: ген тимидинкиназы вируса простого герпеса I типа (HSV-I TK) (Wigler et al., Cell 11:223, 1977), придающий чувствительность к ганцикловиру; ген клеточной гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы (HPRT), ген клеточной аденинфосфорибозилтрансферазы (APRT) и бактериальная питозиндезаминаза (Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992)).

В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, содержат полинуклеотид, дополнительно содержащий положительный маркер, позволяющий осуществлять отбор клеток фенотипа отрицательного отбора *in vitro*. Маркер положительного отбора может представлять собой ген, который при введении в клетку-хозяина экспрессирует доминантный фенотип, позволяющий осуществлять положительный отбор клеток, несущих ген. Гены этого типа известны в данной области техники и включают, среди прочего, ген гигромицин-В-фосфотрансферазы (hph), придающий устойчивость к гигромицину В, ген аминокликозид-фосфотрансферазы (neo или aph) из Tn5, придающий устойчивость к антибиотику G418, ген дигидрофолат-редуктазы (DHFR), ген аденозиндезаминазы (ADA) и ген множественной лекарственной устойчивости (MDR).

В одном из вариантов осуществления маркер положительного отбора и элемент отрицательного отбора связаны таким образом, что потеря элемента отрицательного отбора обязательно сопровождается потерей маркера положительного отбора. В частном варианте осуществления маркеры положительного и отрицательного отбора слиты таким образом, что потеря одного обязательно ведет к потере другого.

Примером слитого полинуклеотида, в качестве продукта экспрессии дающего полипептид, придающий желаемые признаки как положительного, так и отрицательного отбора, описанные выше, является гибридный ген гигромицин-фосфотрансферазы и тимидинкиназы (НуТК). Экспрессия этого гена дает полипептид, придающий устойчивость к гигромицину В для положительного отбора *in vitro* и чувствительность к ганцикловиру для отрицательного отбора *in vivo*. См. также публикации заявок PCT/US 91/08442 2 и PCT/US 94/05601, за авт. S. D. Lupton, в которых описано применение бифункциональных отбираемых гибридных генов, полученных в результате слияния доминантных маркеров положительного отбора с маркерами отрицательного отбора.

Предпочтительные маркеры положительного отбора получены из генов, выбранных из группы, состоящей из *hph*, *neo* и *gpt*, а предпочтительные маркеры отрицательного отбора получены из генов, выбранных из группы, состоящей из питозиндезаминазы, HSV-I TK, VZV TK, HPRT, APRT и *gpt*. Примеры бифункциональных отбираемых гибридных генов, рассматриваемых в частных вариантах осуществления, включают, не ограничиваясь перечисленным, гены, в которых маркер положительного отбора получен из *hph* или *neo*, а маркер отрицательного отбора получен из питозиндезаминазы или гена TK, или маркера отбора.

В частных вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие один или более полипептидов или слитые полипептиды, могут быть введены в иммунные эффекторские клетки, например, Т-клетки, невирусными и вирусными способами. В частных вариантах осуществления доставка одного или более полинуклеотидов может быть обеспечена одним и тем же способом или разными способами, и/или одним и тем же вектором или разными векторами.

Термин "вектор" используется в настоящем документе для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной переносить или транспортировать другую молекулу нуклеиновой кислоты. Переносимая нуклеиновая кислота обычно связана, например, встроена, в молекулу нуклеиновой кислоты вектора. Вектор может включать последовательности, управляющие автономной репликацией в клетке, или может включать последовательности, достаточные для интеграции в ДНК клетки-хозяина. В частных вариантах осуществления невирусные векторы используются для доставки одного или более полинуклеотидов, рассматриваемых в настоящем документе, в Т-клетку.

Иллюстративные примеры невирусных векторов включают, не ограничиваясь перечисленным, плазмиды (например, ДНК-плазмиды или РНК-плазмиды), транспозоны, космиды и бактериальные искусственные хромосомы.

Примеры способов невирусной доставки полинуклеотидов, рассматриваемые в частных вариантах осуществления, включают, не ограничиваясь перечисленным: электропорацию, сонопорацию, липофекцию, микроинъекцию, баллистическую трансфекцию, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, наночастицы, поликатионы или конъюгаты липидов и нуклеиновых кислот, голую ДНК, искусственные вирионы, перенос, опосредованный ДЭАЭ-декстраном (диэтиламиноэтил-декстраном), генную пушку и тепловой шок.

Иллюстративные примеры систем доставки полинуклеотидов, подходящих для применения в частных вариантах осуществления, рассматриваемых в частных вариантах осуществления, включают, не ограничиваясь перечисленным, предоставляемые Amaxa Biosystems, Maxcyte, Inc., BTX Molecular Delivery Systems и Copernicus Therapeutics Inc. Реагенты для липофекции коммерчески доступны (например, Transfectam™ и Lipofectin™). Катионные и нейтральные липиды, подходящие для эффективной липофекции полинуклеотидов с распознаванием рецептором, описаны в литературе. См., например, Liu et al. (2003) *Gene Therapy*. 10:180-187 и Balazs et al. (2011) *Journal of Drug Delivery*. 2011:1-12. В частных вариантах осуществления также рассматривается направленная на антитела, полученная из бактерий доставка на основе неживых наноклеток.

Вирусные векторы, содержащие полинуклеотиды, рассматриваемые в частных вариантах осуществления, могут быть доставлены *in vivo* путем введения отдельному пациенту, обычно путем системного введения (например, внутривенной, внутрибрюшинной, внутримышечной, подкожной или внутричерепной инфузии) или местного применения, как описано ниже. В качестве альтернативы, векторы могут быть доставлены в клетки *ex vivo*, например, с помощью клеток, эксплантированных от отдельного пациента (например, мобилизованной периферической крови, лимфоцитов, аспиратов костного мозга, биопсии ткани и т.д.), или универсальных донорских гемопоэтических стволовых клеток с последующей реимплантацией клеток пациенту.

В одном из вариантов осуществления вирусные векторы, содержащие варианты нуклеаз и/или донорные матрицы репарации, вводят непосредственно в организм для трансдукции клеток *in vivo*. В качестве альтернативы может быть введена голая ДНК. Введение осуществляют любым способом, обычно применяемым, чтобы в конечном итоге обеспечить приведение молекулы в контакт с кровью или клетками ткани, включая, не ограничиваясь перечисленным, инъекцию, инфузию, местное применение и электропорацию. Подходящие способы введения таких нуклеиновых кислот доступны и хорошо известны специалистам в данной области техники, и, несмотря на то, что для введения конкретной композиции можно применять более одного способа, конкретный способ часто может обеспечивать более быстрый и более эффективный ответ по сравнению с другим способом.

Иллюстративные примеры вирусных векторных систем, подходящих для применения в частных вариантах осуществления, рассматриваемых в частных вариантах осуществления, включают, не ограничиваясь перечисленным, векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV), ретровируса, вируса простого герпеса, аденовируса и вируса осповакцины.

В различных вариантах осуществления один или более полинуклеотидов вводят в иммунную эффекторную клетку, например Т-клетку, путем трансдукции клетки рекомбинантным аденоассоциированным вирусом (гAAV), содержащим один или более полинуклеотидов.

AAV представляет собой небольшой (~26 нм) дефектный по репликации, в основном эписомальный, безоболочечный вирус. AAV может инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, и может включать свой геном в геном клетки-хозяина. Рекомбинантные AAV (гAAV) обычно состоят, как минимум, из трансгена и его регуляторных последовательностей, и 5'- и 3'-инвертированных концевых повторов AAV (ITR). Последовательности ITR имеют длину около 145 п.н. В частных вариантах осуществления гAAV содержит ITR и последовательности капсидного белка, выделенные из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или AAV10.

В некоторых вариантах осуществления используется химерный гAAV, последовательности ITR которого выделены из одного серотипа AAV, а последовательности капсидного белка выделены из другого серотипа AAV. Например, гAAV с последовательностями ITR, полученными из AAV2, и последовательностями капсидного белка, полученными из AAV6, называется AAV2/AAV6. В частных вариантах осуществления вектор гAAV может содержать ITR из AAV2 и капсидные белки из любого из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или AAV10. В предпочтительном варианте осуществления гAAV содержит последовательности ITR, полученные из AAV2, и последовательности капсидного белка, полученные из AAV6. В предпочтительном варианте осуществления гAAV содержит последовательности ITR, полученные из AAV2, и последовательности капсидного белка, полученные из AAV2.

В некоторых вариантах осуществления к капсидам AAV могут применяться методы генной инженерии и селекции, чтобы увеличить вероятность трансдукции ими представляющих интерес клеток.

Конструирование векторов гAAV, их получение и очистка были описаны, например, в патентах США №№ 9169494, 9169492, 9012224, 8889641, 8809058 и 8784799, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В различных вариантах осуществления один или более полинуклеотидов вводят в иммунную эффекторную клетку, например, Т-клетку, путем трансдукции клетки ретровирусом, например лентивирусом, содержащим один или более полинуклеотидов.

В контексте настоящего документа термин "ретровирус" относится к РНК-вирусу, который осуществляет обратную транскрипцию своей геномной РНК в линейную двухцепочечную копию ДНК и впоследствии ковалентно интегрирует свою геномную ДНК в геном хозяина. Примеры ретровирусов, подходящих для применения в частных вариантах осуществления, включают, не ограничиваясь перечисленным: вирус лейкоза мышей Молони (M-MuLV), вирус саркомы мышей Молони (MoMSV), вирус саркомы мышей Харви (HaMuSV), вирус рака молочной железы мышей (MuMTV), вирус лейкоза гиббонов (GaLV), вирус лейкоза кошачьих (FLV), спумавирус, вирус лейкоза мышей Френда, вирус стволовых клеток мышей (MSCV) и вирус саркомы Рауса (RSV)) и лентивирус.

В контексте настоящего документа термин "лентивирус" относится к группе (или роду) сложных ретровирусов. Примеры лентивирусов включают, не ограничиваясь перечисленным, ВИЧ (вирус иммунодефицита человека; включая ВИЧ типа 1 и ВИЧ типа 2); вирус висна-маеда (VMV); вирус артрита-энцефалита коз (CAEV); вирус инфекционной анемии лошадей (EIAV); вирус иммунодефицита кошек (FIV); вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV) и вирус иммунодефицита обезьян (SIV). В одном из вариантов осуществления предпочтительными являются последовательности остова вектора на основе ВИЧ (т. е. цис-действующие элементы ВИЧ).

В различных вариантах осуществления рассматриваемый в настоящем документе лентивирусный вектор содержит один или более LTR и один или более, или все из следующих вспомогательных элементов: cPPT/FLAP, сигнал упаковки пси (Ψ), элемент экспорта, последовательности поли(A), и может необязательно содержать WPRE или HPRE, инсуляторный элемент, селективируемый маркер и суицидальный ген клетки, как обсуждается в других частях настоящего документа.

В частных вариантах осуществления лентивирусные векторы, рассматриваемые в настоящем документе, могут представлять собой интегрирующий, или неинтегрирующий, или дефектный по интеграции лентивирус. В контексте настоящего документа термин "дефектный по интеграции лентивирус" или "IDLV" относится к лентивирусу, имеющему интегразу, которая не обладает способностью интегрировать вирусный геном в геном клеток-хозяев. Неспособные к интеграции вирусные векторы были описаны в патентной заявке WO 2006/010834, включенной в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Примеры мутаций в гене pol ВИЧ-1, подходящих для снижения активности интегразы, включают, не ограничиваясь перечисленным: H12N, H12C, H16C, H16V, S81 R, D41A, K42A, H51A, Q53C, D55V, D64E, D64V, E69A, K71A, E85A, E87A, D116N, D116I, D116A, N120G, N120I, N120E, E152G, E152A,

D35E, K156E, K156A, E157A, K159E, K159A, K160A, R166A, D167A, E170A, H171A, K173A, K186Q, K186T, K188T, E198A, R199c, R199T, R199A, D202A, K211A, Q214L, Q216L, Q221 L, W235F, W235E, K236S, K236A, K246A, G247W, D253A, R262A, R263A и K264H.

Термин "длинный концевой повтор (LTR)" относится к доменам пар оснований, расположенных на концах ретровирусных ДНК, которые в окружении их природной последовательности являются прямыми повторами и содержат области U3, R и U5.

В контексте настоящего документа термин "элемент FLAP" или "сРРТ/FLAP" относится к нуклеиновой кислоте, последовательность которой включает центральный полипуриновый тракт и центральные концевые последовательности (сРРТ и CTS) ретровируса, например, ВИЧ-1 или ВИЧ-2. Подходящие элементы FLAP описаны в патенте США № 6682907 и в Zennou et al., 2000, Cell, 101:173.

В контексте настоящего документа термин "сигнал упаковки" или "последовательность упаковки" относится к пси [Ψ] последовательностям, расположенным в ретровирусном геноме, необходимым для вставки вирусной РНК в вирусный капсид или частицу, см., например, Clever et al. 1995 J. of Virology, Vol. 69, No. 4; pp. 2101-2109.

Термин "элемент экспорта" относится к цис-действующему посттранскрипционному регуляторному элементу, который регулирует транспорт РНК-транскрипта из ядра в цитоплазму клетки. Примеры элементов экспорта РНК включают, не ограничиваясь перечисленным, элемент отклика rev (RRE) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) (см., например, Cullen et al., 1991). J. Virol. 65: 1053; и Cullen et al., 1991. Cell 58: 423) и посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита В (HPRE).

В частных вариантах осуществления экспрессия гетерологичных последовательностей в вирусных векторах повышается путем включения в векторы посттранскрипционных регуляторных элементов, эффективных сайтов полиаденилирования и, необязательно, сигналов терминации транскрипции. Разнообразные посттранскрипционные регуляторные элементы могут увеличивать экспрессию гетерологичной нуклеиновой кислоты в белке, например, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита лесных сурков (WPRE; Zufferey et al., 1999, J. Virol. 73:2886); посттранскрипционный регуляторный элемент, присутствующий в вирусе гепатита В (HPRE) (Huang et al., Mol Cell. Biol., 5:3864); и тому подобные (Liu et al., 1995, Genes Dev., 9:1766).

Лентивирусные векторы предпочтительно содержат несколько средств повышения безопасности в результате модификации LTR. "Самоинактивирующиеся" (SIN) векторы относятся к дефектным по репликации векторам, например, ретровирусным или лентивирусным векторам, в которых правая (3') область энхансера-промотора LTR, известная как область U3, была модифицирована (например, путем делеции или замены) для предотвращения вирусной транскрипции после первого раунда вирусной репликации. Самоинактивация предпочтительно достигается путем введения делеции в область U3 3'-LTR векторной ДНК, т. е. ДНК, используемой для получения векторной РНК. Таким образом, в ходе обратной транскрипции эта делеция переносится в 5'-LTR провирусной ДНК. В частных вариантах осуществления желательно исключить достаточное количество последовательности U3, чтобы значительно уменьшить или полностью устранить транскрипционную активность LTR, тем самым значительно уменьшая или устраняя продукцию полноразмерной векторной РНК в трансдуцированных клетках. В случае лентивекторов на основе ВИЧ было обнаружено, что такие векторы выдерживают значительные делеции U3, включая удаление блока LTR TATA (например, делеции от -418 до -18), без значительного снижения титров векторов.

Дополнительное средство повышения безопасности обеспечивается заменой области U3 5'-LTR гетерологичным промотором для управления транскрипцией вирусного генома во время продуцирования вирусных частиц. Примеры гетерологичных промоторов, которые могут быть использованы, включают, например, промоторы вируса обезьян 40 (SV40) (например, ранний или поздний), цитомегаловируса (CMV) (например, предранний), вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV), вируса саркомы Рауса (RSV) и вируса простого герпеса (HSV) (тимидинкиназный).

В контексте настоящего документа термины "псевдотип" или "псевдотипирование" относятся к вирусу, белки вирусной оболочки которого были заменены белками другого вируса, обладающего предпочтительными характеристиками. Например, ВИЧ может быть псевдотипирован белками оболочки G-белка вируса везикулярного стоматита (VSV-G), что позволяет ВИЧ инфицировать более широкий диапазон клеток, поскольку белки оболочки ВИЧ (кодируемые геном env) обычно нацеливают вирус на CD4⁺-положительные клетки.

В отдельных вариантах осуществления лентивирусные векторы получают в соответствии с известными способами. См., например, Kutner et al, BMC Biotechnol. 2009;9:10. doi: 10.1186/1472-6750-9-10; Kutner et al. Nat. Protoc. 2009;4(4):495-505. doi: 10.1038/nprot.2009.22.

Согласно отдельным конкретным вариантам осуществления, рассматриваемым в настоящем документе, большинство или все последовательности остова вирусного вектора получены из лентивируса, например, ВИЧ-1. Однако следует понимать, что можно использовать или комбинировать множество различных источников ретровирусных и/или лентивирусных последовательностей, и в некоторых лентивирусных последовательностях может быть сделано множество замен и изменений без ухудшения способности переносящего вектора выполнять функции, описанные в настоящем документе. Кроме того, в

данной области техники известно множество лентивирусных векторов, см. Naldini et al., (1996a, 1996b, and 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, патенты США № 6013516 и 5994136, многие из которых могут быть адаптированы для получения вирусного вектора или переносимой плазмиды, рассматриваемых в настоящем документе.

В различных вариантах осуществления один или более полинуклеотидов вводят в иммунную эффекторную клетку путем трансдукции клетки аденовирусом, содержащим один или более полинуклеотидов.

Аденовирусные векторы способны осуществлять чрезвычайно высокоэффективную трансдукцию во многих типах клеток и не требуют деления клеток. С помощью таких векторов может быть получен высокий титр и высокие уровни экспрессии. Этот вектор может быть получен в больших количествах в относительно простой системе. Большинство аденовирусных векторов сконструированы таким образом, что трансген заменяет гены Ad E1a, E1b и/или E3; затем дефектный по репликации вектор размножается в клетках человека 293, которые обеспечивают функционирование удаленного гена в транспозиции. Ad векторы могут трансдуцировать несколько типов тканей *in vivo*, включая неделящиеся, дифференцированные клетки, такие как клетки, присутствующие в печени, почках и мышцах. Общепринятые Ad векторы отличаются большой переносимой способностью.

Для генерации и размножения современных аденовирусных векторов, дефектных по репликации, может быть использована уникальная линия клеток-помощников, названная 293, которая была трансформирована из клеток почки человеческого эмбриона фрагментами ДНК аденовируса 5 типа и конститутивно экспрессирует белки E1 (Graham et al., 1977). Поскольку область E3 не зависит от генома аденовируса (Jones & Shenk, 1978), современные аденовирусные векторы с помощью клеток 293 несут чужеродную ДНК в области E1, D3 или обеих областях (Graham & Prevec, 1991). Аденовирусные векторы были использованы для экспрессии генов эукариот (Levrero et al., 1991; Gomez-Foix et al., 1992) и разработки вакцин (Grunhaus & Horwitz, 1992; Graham & Prevec, 1992). Исследования по введению рекомбинантного аденовируса в различные ткани включают эндотрахеальную инсталляцию (Rosenfeld et al., 1991; Rosenfeld et al., 1992), внутримышечные инъекции (Ragot et al., 1993), периферические внутривенные инъекции (Herz & Gerard, 1993) и стереотаксическую инокуляцию в головной мозг (Le Gal La Salle et al., 1993). Пример применения Ad вектора в клиническом исследовании включал терапию полинуклеотидами с целью противоопухолевой иммунизации с помощью внутримышечной инъекции (Sterman et al., Hum. Gene Ther. 7:1083-9 (1998)).

В различных вариантах осуществления один или более полинуклеотидов вводят в иммунную эффекторную клетку путем трансдукции клетки вирусом простого герпеса, например, HSV-1, HSV-2, содержащим один или более полинуклеотидов.

Зрелый вирион HSV состоит из "закутанного" икосаэдрического капсида с вирусным геномом, состоящим из линейной двухцепочечной молекулы ДНК размером 152 тысяч п.н. В одном из вариантов осуществления вирусный вектор на основе HSV лишен одного или нескольких существенных или несущественных генов HSV. В одном из вариантов осуществления вирусный вектор на основе HSV является дефектным по репликации. Большинство дефектных по репликации векторов HSV содержат делению для удаления одного или нескольких предранних, ранних или поздних генов HSV для предотвращения репликации. Например, вектор HSV может быть лишен предраннего гена, выбранного из группы, состоящей из ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 и их комбинации. Преимущества вектора HSV заключаются в его способности вступать в латентную стадию, которая может приводить к длительной экспрессии ДНК, и в его большом вирусном ДНК-геноме, который может вмещать экзогенные вставки ДНК размером до 25 тысяч п.н. Векторы на основе HSV описаны, например, в патентах США №№ 5837532, 5846782 и 5804413, и в международных патентных заявках WO 91/02788, WO 96/04394, WO 98/15637 и WO 99/06583, причем каждый из указанных источников включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Г. Генетически модифицированные клетки

В различных вариантах осуществления клетки модифицированы для экспрессии полипептидов преобразователей сигналов TGF β , CTBR, сконструированных TCR, CAR, DARIC, зетакинов и слитых белков, рассматриваемых в настоящем документе, для применения для лечения рака. Клетки могут не быть генетически модифицированными для экспрессии полипептидов, рассматриваемых в настоящем документе, или в частных предпочтительных вариантах осуществления клетки могут быть генетически модифицированы для экспрессии полипептидов, рассматриваемых в настоящем документе. В контексте настоящего документа термин "сконструированный с помощью генной инженерии" или "генетически модифицированный" относится к добавлению дополнительного генетического материала в форме ДНК или РНК в общий генетический материал в клетке. Термины "генетически модифицированные клетки", "модифицированные клетки" и "перенацеленные клетки" используются взаимозаменяемо в частных вариантах осуществления.

В частных вариантах осуществления полипептиды преобразователей сигналов CTBR, рассматриваемых в настоящем документе, вводятся и экспрессируются в иммунных эффекторных клетках для

улучшения устойчивости клеток к иммуносупрессивным сигналам в TME, опосредованным TGF β . В частных вариантах осуществления полипептиды преобразователей сигналов CTBR вводятся и экспрессируются в иммунных эффекторных клетках, перенацеленных на клетку-мишень посредством совместной экспрессии в клетке сконструированного антигенного рецептора.

"Иммунная эффекторная клетка" представляет собой любую клетку иммунной системы, имеющую одну или несколько эффекторных функций (например, активность по уничтожению питоотоксических клеток, секрецию питокинов, индукцию ADCC и/или CDC). Примеры иммунных эффекторных клеток, рассматриваемых в настоящем документе, представляют собой Т-лимфоциты, в частности, питоотоксические Т-клетки (CTL; CD8+ Т-клетки), TIL и хелперные Т-клетки (HTL; CD4+ Т-клетки). В одном из вариантов осуществления иммунные эффекторные клетки включают естественные клетки-киллеры (NK). В одном из вариантов осуществления иммунные эффекторные клетки включают Т-клетки, имеющие свойства естественных киллеров (NKT-клетки). Иммунные эффекторные клетки могут быть аутологичными/аутогенными ("собственными") или неаутологичными ("несобственными"), например аллогенными, сингенными или ксеногенными).

"Аутологичный" в контексте настоящего документа относится к клеткам от одного и того же субъекта. "Аллогенный" в контексте настоящего документа относится к клеткам того же вида, генетически отличающимся от сравниваемой клетки. "Сингенный" в контексте настоящего документа относится к клеткам другого субъекта, генетически идентичным сравниваемой клетке. "Ксеногенный" в контексте настоящего документа относится к клеткам, принадлежащим к виду, отличному от вида сравниваемой клетки. В предпочтительных вариантах осуществления клетки являются аутологичными.

Примеры иммунных эффекторных клеток, подходящих для введения полипептидов преобразователей сигналов CTBR, рассматриваемых в настоящем документе, включают Т-лимфоциты. Термины "Т-клетка" или "Т-лимфоцит" известны в данной области техники и подразумевают под собой тимоциты, незрелые Т-лимфоциты, зрелые Т-лимфоциты, покоящиеся Т-лимфоциты или активированные Т-лимфоциты. Т-клетка может представлять собой хелперную Т-клетку (Th), например, Т-хелпер 1 (Th1) или Т-хелпер 2 (Th2). Т-клетка может представлять собой хелперную Т-клетку CD4⁺ (HTL; CD4⁺ Т-клетку), CD4⁺ Т-клетку, питоотоксическую Т-клетку (CTL; CD8⁺ Т-клетку), CD4⁺CD8⁺ Т cell, CD4⁺CD8⁺ Т-клетку или любое другое подмножество Т-клеток. Другие примеры популяций Т-клеток, подходящих для применения в частных вариантах осуществления, включают наивные Т-клетки и Т-клетки памяти.

Как будет понятно специалисту в данной области техники, другие клетки также могут применяться в качестве иммунных эффекторных клеток с полипептидами преобразователей сигналов CTBR, рассматриваемых в настоящем документе. В частности, иммунные эффекторные клетки также включают НК-клетки, NKT-клетки, нейтрофилы и макрофаги. Иммунные эффекторные клетки также включают предшественники эффекторных клеток, где такие клетки-предшественники могут быть индуцированы к дифференцировке в иммунные эффекторные клетки *in vivo* или *in vitro*. Таким образом, в частных вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка включает предшественники иммунных эффекторных клеток, такие как гемопоэтические стволовые клетки (HSC), содержащиеся в популяции CD34⁺-клеток, полученных из пуповинной крови, костного мозга или мобилизованной периферической крови, которые после введения субъекту дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки, или которые могут быть индуцированы к дифференцировке в зрелые иммунные эффекторные клетки *in vitro*.

В контексте настоящего документа иммунные эффекторные клетки, сконструированные с помощью генной инженерии так, чтобы они содержали определенный химерный рецептор, могут называться "антигенспецифическими перенацеленными иммунными эффекторными клетками".

В контексте настоящего документа термин "CD34⁺-клетка" относится к клетке, экспрессирующей белок CD34 на своей клеточной поверхности. Термин "CD34" в контексте настоящего документа относится к гликопротеину клеточной поверхности (например, белку сиаломуцину), который часто действует как фактор клеточной адгезии и участвует во входе Т-клеток в лимфатические узлы.

Популяция CD34⁺-клеток содержит гемопоэтические стволовые клетки (HSC), которые при введении пациенту дифференцируются и вносят вклад во все гемопоэтические линии, включая Т-клетки, НК-клетки, NKT-клетки, нейтрофилы и клетки линии моноцитов/макрофагов.

Способы получения иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих полипептид преобразователя сигналов TGF β , рассматриваемый в настоящем документе, предложены в частных вариантах осуществления. В одном из вариантов осуществления способ включает трансфекцию или трансдукцию иммунных эффекторных клеток, выделенных от индивидуума, так что иммунные эффекторные клетки экспрессируют один или более полипептидов преобразователей сигналов TGF β , рассматриваемых в настоящем документе. В одном из вариантов осуществления способ включает трансфекцию или трансдукцию иммунных эффекторных клеток, выделенных от индивидуума, так что иммунные эффекторные клетки экспрессируют один или более полипептидов преобразователей сигналов TGF β и сконструированные антигенные рецепторы, рассматриваемые в настоящем документе. В отдельных вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки выделяют от индивидуума и генетически модифицируют без проведения дополнительных манипуляций *in vitro*. Такие клетки затем могут быть непосредственно повторно введе-

ны индивидууму. В дополнительных вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки сначала активируют и стимулируют к пролиферации *in vitro* перед их генетической модификацией. В связи с этим иммунные эффекторные клетки могут быть культивированы до и/или после генетической модификации.

В частных вариантах осуществления перед проведением манипуляции *in vitro* в отношении иммунных эффекторных клеток, описанных в настоящем документе, или их генетической модификации источник клеток получают от субъекта. В частных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки включают Т-клетки.

Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая, не ограничиваясь перечисленным, мононуклеары периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань вилочковой железы, ткань из очага инфекции, асцит, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В отдельных вариантах осуществления Т-клетки могут быть получены из единицы крови, взятой у субъекта с использованием любого количества методов, известных специалисту, таких как седиментация, например, разделение с помощью FICOLL™.

В других вариантах осуществления используется популяция выделенная или очищенная популяция Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления после выделения МНПК питотоксические и хелперные Т-лимфоциты могут быть отсортированы на субпопуляции наивных Т-клеток, Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток до либо после активации, размножения и/или генетической модификации.

В одном из вариантов осуществления выделенная или очищенная популяция Т-клеток экспрессирует один или более маркеров, включая, не ограничиваясь перечисленным, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ или их комбинацию.

В отдельных вариантах осуществления Т-клетки выделяют от индивидуума и сначала активируют и стимулируют к пролиферации *in vitro* перед модификацией для экспрессии полипептида преобразователя сигналов TGF β ,

Для достижения достаточных терапевтических доз композиций на основе Т-клеток, Т-клетки часто подвергают одному или нескольким циклам стимуляции, активации и/или размножения. Т-клетки могут быть активированы и размножены, как правило, с использованием способов, описанных, например, в патентах США №№ 6352694, 6534055, 6905680, 6692964, 5858358, 6887466, 6905681, 7144575, 7067318, 7172869, 7232566, 7175843, 5883223, 6905874, 6797514 и 6867041, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. В частных вариантах осуществления Т-клетки активируют и размножают в течение приблизительно 6 ч, приблизительно 12 ч, приблизительно 18 ч или приблизительно 24 ч до введения векторов или полинуклеотидов, кодирующих полипептиды преобразователей сигналов TGF β , Необязательно в комбинации со сконструированным антигенным рецептором, рассматриваемым в настоящем документе.

В одном из вариантов осуществления Т-клетки активируют одновременно с их модификацией.

В различных вариантах осуществления способ получения иммунной эффекторной клетки включает активацию популяции клеток, содержащей Т-клетки, и размножение популяции Т-клеток. Активация Т-клеток может быть достигнута путем обеспечения первичного стимулирующего сигнала через комплекс TCR/CD3 Т-клеток и путем обеспечения вторичного костимулирующего сигнала через вспомогательную молекулу, например CD28.

Комплекс TCR/CD3 может быть стимулирован путем приведения Т-клетки в контакт с подходящим CD3-связывающим агентом, например, лигандом CD3 или моноклональным антителом к CD3. Иллюстративные примеры антител к CD3 включают, не ограничиваясь перечисленным, OKT3, G19-4, BC3 и 64.1.

Помимо первичного стимулирующего сигнала, обеспечиваемого посредством комплекса TCR/CD3, индукция Т-клеточных ответов требует второго, костимулирующего, сигнала. В частных вариантах осуществления для обеспечения костимулирующего сигнала может быть использован связывающий CD28 агент.

Иллюстративные примеры связывающих CD28 агентов включают, не ограничиваясь перечисленным: природные лиганды CD28, например, природный лиганд CD28 (например, член семейства белков B7, такой как B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86)); и моноклональное антитело к CD28 или его фрагмент, способный перекрестно связывать молекулу CD28, например, моноклональные антитела 9.3, B-T3, XR-CD28, KOLT-2, 15E8, 248.23.2 и EX5.3D10.

В одном из вариантов осуществления молекула, обеспечивающая первичный стимулирующий сигнал, например, молекула, которая обеспечивающая стимуляцию посредством комплекса TCR/CD3, и костимулирующая молекула связаны с одной и той же поверхностью.

В отдельных вариантах осуществления связывающие агенты, обеспечивающие стимулирующие и костимулирующие сигналы, локализованы на поверхности клетки. Это может быть достигнуто путем трансфекции или трансдукции клетки нуклеиновой кислотой, кодирующей связывающий агент в форме, подходящей для его экспрессии на поверхности клетки, или, в качестве альтернативы, путем связывания связывающего агента с поверхностью клетки.

В еще одном варианте осуществления молекула, обеспечивающая первичный стимулирующий сигнал, например, молекула, обеспечивающая стимуляцию посредством комплекса TCR/CD3, и костимулирующая молекула экспонируются на антигенпрезентирующих клетках.

В одном из вариантов осуществления молекула, обеспечивающая первичный стимулирующий сигнал, например, молекула, обеспечивающая стимуляцию посредством комплекса TCR/CD3, и костимулирующая молекула обеспечены на отдельных поверхностях.

В отдельном варианте осуществления один из связывающих агентов, обеспечивающих стимулирующие и костимулирующие сигналы, является растворимым (предоставлен в растворе), а другой(ие) агент(ы) предоставлен(ы) на одной или более поверхностях.

В частном варианте осуществления оба связывающих агента, обеспечивающих стимулирующие и костимулирующие сигналы, предоставлены в растворимой форме (предоставлены в растворе).

В различных вариантах осуществления способы получения Т-клеток, рассматриваемые в настоящем документе, включают активацию Т-клеток антителами к CD3 и к CD28.

В одном из вариантов осуществления размножение Т-клеток, активированных способами, рассматриваемыми в настоящем документе, дополнительно включает культивирование популяции клеток, содержащей Т-клетки, в течение от нескольких часов (приблизительно 3 ч) до от приблизительно 7 дней до приблизительно 28 дней или любого часового целочисленного значения между указанными. В еще одном варианте осуществления композиция, содержащая Т-клетки, может быть культивирована в течение 14 дней. В частном варианте осуществления Т-клетки культивируют в течение приблизительно 21 дня. В еще одном варианте осуществления композиции, содержащие Т-клетки, культивируют в течение приблизительно 2-3 дней. Может также потребоваться несколько циклов стимуляции/активации/размножения, так что время культивирования Т-клеток может составлять 60 дней или более.

В частных вариантах осуществления условия, подходящие для культуры Т-клеток, включают подходящую среду (например, минимальные питательные среды или среду RPMI 1640 или X-vivo 15 (Lonza)) и один или более факторов, необходимых для пролиферации и жизнеспособности, включая, не ограничиваясь перечисленным, сыворотку (например, фетальная бычья или человеческая сыворотка), интерлейкин-2 (IL-2), инсулин, IFN- γ , IL-4, IL-7, IL-21, ГМ-КСФ, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β и TNF- α , или любые другие добавки, подходящие для выращивания клеток, известные специалисту в данной области техники.

Дополнительные иллюстративные примеры сред для культивирования клеток включают, не ограничиваясь перечисленным, RPMI 1640, Clicks, AIM-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 15 и X-Vivo 20, Optimizer, с добавками аминокислот, пирувата натрия и витаминов, бессывороточные либо с добавлением соответствующего количества сыворотки (или плазмы) или определенного набора гормонов, и/или количества питокина(ов), достаточного для роста и размножения Т-клеток.

Антибиотики, например, пенициллин и стрептомицин, включены только в экспериментальные культуры, а не в культуры клеток, предназначенные для инфузии субъекту. Клетки-мишени поддерживают в условиях, необходимых для поддержания роста, например, при соответствующей температуре (например, 37°C) и в соответствующей атмосфере (например, воздух с 5% CO₂).

В частных вариантах осуществления МНПК или выделенные Т-клетки приводят в контакт со стимулирующим агентом и костимулирующим агентом, таким как антитела к CD3 и к CD28, обычно присоединенным к грануле или другой поверхности, в культуральной среде с соответствующими питокинами, такими как IL-2, IL-7 и/или IL-15.

В других вариантах осуществления для контроля стабильной экспрессии и секреции различных костимулирующих молекул и питокинов используют искусственный APC (aAPC), полученный путем конструирования с помощью генной инженерии клеток K562, U937, 721.221, T2 и C1R. В частном варианте осуществления aAPC K32 или U32 используют для контроля экспонирования одной или более стимулирующих молекул на основе антител на клеточной поверхности ААРС. Популяции Т-клеток могут быть размножены с помощью aAPC, экспрессирующих различные костимулирующие молекулы, включая, не ограничиваясь перечисленным, CD137L (4-1BBL), CD134L (OX40L) и/или CD80 или CD86. Наконец, aAPC обеспечивают эффективную платформу для размножения генетически модифицированных Т-клеток и для поддержания экспрессии CD28 на CD8 Т-клетках. aAPC, предложенные в WO 03/057171 и US2003/0147869, включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В частном варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий преобразователь сигналов TGF β и сконструированный антигенный рецептор, вводят в популяцию Т-клеток. В частном варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий преобразователь сигналов TGF, вводят в популяцию Т-клеток, экспрессирующих сконструированный антигенный рецептор. Полинуклеотиды могут быть введены в Т-клетки путем микроинъекции, трансфекции, липофекции, теплового шока, электропорации, трансдукции, генной пушки, микроинъекции, переноса, опосредованного ДЭАЭ-декстраном, и тому подобного.

В предпочтительном варианте осуществления полинуклеотиды вводят в Т-клетку путем вирусной трансдукции.

Иллюстративные примеры вирусных векторных систем, подходящих для введения полинуклеотида в иммунную эффекторную клетку или CD34 -клетку, включают, не ограничиваясь перечисленным, векторы для переноса генов на основе аденоассоциированного вируса (AAV), ретровируса, вируса простого герпеса, аденовируса, вируса осповакцины.

В одном из вариантов осуществления полинуклеотида вводят в Т-клетку путем трансдукции AAV.

В одном из вариантов осуществления полинуклеотида вводят в Т-клетку посредством трансдукции ретровирусом.

В одном из вариантов осуществления полинуклеотида вводят в Т-клетку путем трансдукции лентивирусом.

В одном из вариантов осуществления полинуклеотида вводят в Т-клетку путем трансдукции аденовирусом.

В одном из вариантов осуществления полинуклеотида вводят в Т-клетку путем трансдукции вирусом простого герпеса.

В одном из вариантов осуществления полинуклеотида вводят в Т-клетку путем трансдукции вирусом осповакцины.

Н. Композиции и препараты

Композиции, рассматриваемые в настоящем документе, могут содержать один или более полипептидов, полинуклеотидов, содержащих их векторов, генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток и т. д. Композиции включают, не ограничиваясь перечисленным, фармацевтические композиции. "Фармацевтическая композиция" относится к композиции, приготовленной в фармацевтически приемлемых или физиологически приемлемых растворах для введения в клетку или животному, по отдельности либо в комбинации с одним или более другими видами терапии. Также следует понимать, что при необходимости композиции могут быть введены в комбинации с другими агентами, такими как, например, цитокины, факторы роста, гормоны, малые молекулы, химиотерапевтические средства, пролекарства, лекарственные средства, антитела или другие различные фармацевтически активные вещества. Прочие компоненты, которые также могут быть включены в композиции, практически не ограничены, при условии, что дополнительные агенты не оказывают неблагоприятного воздействия на способность композиции осуществлять доставку предполагаемой терапии.

Фраза "фармацевтически приемлемый" используется в настоящем документе для обозначения таких соединений, веществ, композиций и/или лекарственных форм, которые с медицинской точки зрения подходят для применения в контакте с тканями человека и животных, не вызывая чрезмерной токсичности, раздражающего действия, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерно с разумным соотношением польза/риск.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к разбавителю, адъюванту, эксципиенту или наполнителю, с помощью которых вводятся полипептиды, полинуклеотиды, содержащие их векторы или генетически модифицированные иммунные эффекторные клетки. Иллюстративные примеры таких фармацевтических носителей могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Физиологические растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут быть использованы в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические эксципиенты в частных вариантах осуществления включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и тому подобное. В терапевтических композициях возможно применение любых общепринятых сред или агента, за исключением случаев, когда они несовместимы с активным ингредиентом. В композиции также могут быть включены дополнительные активные ингредиенты.

В одном из вариантов осуществления композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель, является подходящей для введения субъекту. В частных вариантах осуществления композиция, содержащая носитель, подходит для парентерального введения, например внутрисосудистого (внутривенного или внутриартериального), внутрибрюшинного или внутримышечного введения. В частных вариантах осуществления композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель, подходит для внутрижелудочкового, интраспинального или интратекального введения. Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы, среды для культивирования клеток или дисперсии. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. В фармацевтических композициях предполагается применение любых общепринятых сред или агента, за исключением случаев, когда они несовместимы с полипептидами, полинуклеотидами, содержащими их векторами или генетически модифицированными иммунными эффекторными клетками.

В частных вариантах осуществления композиции, рассматриваемые в настоящем документе, содержат генетически модифицированные Т-клетки и фармацевтически приемлемый носитель. Композиция, содержащая композицию на основе клеток, рассматриваемую в настоящем документе, может быть

введена отдельно путем энтерального или парентерального введения, или в комбинации с другими подходящими соединениями для достижения желаемых целей лечения.

Фармацевтически приемлемый носитель должен иметь достаточно высокую чистоту и достаточно низкую токсичность, чтобы быть пригодным для введения человеку, подлежащему лечению. Кроме того, он должен поддерживать или увеличивать стабильность композиции. Фармацевтически приемлемый носитель может быть жидким или твердым, и его выбирают с учетом планируемого способа введения для обеспечения желаемого объема, консистенции и т.д. при сочетании с другими компонентами композиции. Например, фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой, не ограничиваясь перечисленным, связывающий агент (например, предварительно желатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу и т.д.), наполнитель (например, лактозу и другие сахара, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, желатин, сульфат кальция, этилцеллюлозу, полиакрилаты, гидрофосфат кальция и т.д.), смазывающее вещество (например, стеарат магния, тальк, диоксид кремния, коллоидный диоксид кремния, стеариновую кислоту, стеараты металлов, гидрогенизированные растительные масла, кукурузный крахмал, полиэтиленгликоли, бензоат натрия, ацетат натрия и т.д.), разрыхлитель (например, крахмал, крахмалгликолят натрия и т.д.) или смачивающий агент (например, лаурилсульфат натрия и т.д.). Другие подходящие фармацевтически приемлемые носители для композиций, рассматриваемых в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленным, воду, солевые растворы, спирты, полиэтиленгликоли, желатины, амилозы, стеараты магния, тальки, кремниевые кислоты, вязкие парафины, гидроксиметилцеллюлозы, поливинилпирролидоны и тому подобное.

Такие растворы-носители также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. В контексте настоящего документа термин "буфер" относится к раствору или жидкости, химический состав которых нейтрализует кислоты или основания без значительного изменения pH. Примеры буферов, рассматриваемых в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленным, фосфатный солевой буфер (PBS) в модификации Дульбекко, раствор Рингера, 5% раствор декстрозы в воде (D5W), изотонический/физиологический раствор (0,9% NaCl).

Фармацевтически приемлемые носители могут присутствовать в количествах, достаточных для поддержания pH композиции на уровне приблизительно 7. В качестве альтернативы, композиция имеет pH в диапазоне от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,4, например 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 и 7,4. В еще одном варианте осуществления композиция имеет pH приблизительно 7,4.

Композиции, рассматриваемые в настоящем документе, могут содержать нетоксичную фармацевтически приемлемую среду. Композиции могут представлять собой суспензию. В контексте настоящего документа термин "суспензия" относится к неприкрепленным условиям, при которых клетки не прикреплены к твердой подложке. Например, клетки, поддерживаемые в виде суспензии, могут перемешиваться или взбалтываться и не быть прикреплены к подложке, такой как чашка для культивирования.

В частных вариантах осуществления композиции, рассматриваемые в настоящем документе, получены в форме суспензии, в которой модифицированные Т-клетки диспергированы в приемлемой жидкой среде или растворе, например, в физиологическом растворе или бессывороточной среде, в пакете для внутривенного (в/в) введения или тому подобном. Приемлемые разбавители включают, не ограничиваясь перечисленным, воду, PlasmaLyte, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия (физиологический раствор), бессывороточную среду для культивирования клеток и среду, подходящую для хранения при криогенной температуре, например, среду Cryostor®.

В отдельных вариантах осуществления фармацевтически приемлемый носитель по существу не содержит природных белков человеческого или животного происхождения и подходит для хранения композиции, содержащей популяцию модифицированных Т-клеток. Терапевтическая композиция предназначена для введения пациенту-человеку и, таким образом, по существу не содержит компонентов клеточной культуры, таких как бычий сывороточный альбумин, лошадиная сыворотка и эмбриональная бычья сыворотка.

В некоторых вариантах осуществления композиции получены в фармацевтически приемлемой среде для культивирования клеток. Такие композиции подходят для введения людям. В частных вариантах осуществления фармацевтически приемлемая среда для культивирования клеток представляет собой бессывороточную среду.

Бессывороточная среда имеет несколько преимуществ перед средой, содержащей сыворотку, в том числе более простой и лучше установленный состав, уменьшенное содержание загрязняющих веществ, исключение потенциального источника инфекционных агентов и более низкую стоимость. В различных вариантах осуществления бессывороточная среда не содержит компонентов животного происхождения и может необязательно быть безбелковой. Необязательно, среда может содержать биофармацевтически приемлемые рекомбинантные белки. Среда, не содержащая "компонентов животного происхождения", относится к среде, в которой компоненты получены из источников неживотного происхождения. В среде, не содержащей компонентов животного происхождения, природные животные белки заменены рекомбинантными белками, а питательные вещества получены из синтетических, растительных или микробиологических источников. "Безбелковая" среда, напротив, определена как по существу не содержа-

щая белка.

Иллюстративные примеры бессывороточных сред, используемых в конкретных композициях, включают, не ограничиваясь перечисленным, QBSF-60 (Quality Biological, Inc.), StemPro-34 (Life Technologies) и X-VIVO 10.

В предпочтительном варианте осуществления композиции, содержащие модифицированные Т-клетки, получены в PlasmaLyte.

В различных вариантах осуществления композиции, содержащие модифицированные Т-клетки, получены в среде для криоконсервации. Например, среда для криоконсервации с агентами для криоконсервации может быть использована для поддержания высокого уровня жизнеспособности клеток после размораживания оттаиванием. Иллюстративные примеры сред для криоконсервации, используемых в конкретных композициях, включают, не ограничиваясь перечисленным, CryoStor CS10, CryoStor CS5 и CryoStor CS2.

В одном из вариантов осуществления композиции получены в растворе, содержащем PlasmaLyte A и CryoStor CS10 в соотношении 50:50.

В частных вариантах осуществления композиция по существу не содержит микоплазмы, эндотоксина и микробиологических загрязнений. Под выражением "по существу не содержащий" в отношении эндотоксина подразумевается, что на дозу клеток содержится меньше эндотоксина, чем разрешено FDA для биопрепарата, а именно меньше общего содержания эндотоксина, составляющего 5 ЕЭ (единиц эндотоксина)/кг массы тела в сутки, что для среднестатистического человека массой 70 кг составляет 350 ЕЭ на общую дозу клеток. В частных вариантах осуществления композиции, содержащие гемопоэтические стволовые или прогениторные клетки, трансдуцированные ретровирусным вектором, рассматриваемым в настоящем документе, содержат от приблизительно 0,5 до приблизительно 5,0 ЕЭ/мл или приблизительно 0,5 ЕЭ/мл, 1,0 ЕЭ/мл, 1,5 ЕЭ/мл, 2,0 ЕЭ/мл, 2,5 ЕЭ/мл, 3,0 ЕЭ/мл, 3,5 ЕЭ/мл, 4,0 ЕЭ/мл, 4,5 ЕЭ/мл или 5,0 ЕЭ/мл.

В частных вариантах осуществления состав фармацевтически приемлемых растворов носителей хорошо известен специалистам в данной области техники, как и разработка подходящих режимов дозирования и схем лечения при применении конкретных композиций, описанных в настоящем документе, в различных схемах лечения, включая, например, энтеральное и парентеральное, например внутрисосудистое, внутривенное, внутриартериальное, внутрикостное, внутрижелудочковое, интрацеребральное, внутричерепное, интраспинальное, интратекальное и интрамедуллярное введение и соответствующий препарат. Специалисту в данной области будет понятно, что частные варианты осуществления, рассматриваемые в настоящем документе, могут включать другие препараты, такие как препараты, хорошо известные в области фармацевтики и описанные, например, в источнике Remington: The Science and Practice of Pharmacy, том I и том II. 22-е издание. Под редакцией Loyd V. Allen Jr. Philadelphia, PA: Pharmaceutical Press; 2012, включенном в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В частных вариантах осуществления композиции содержат количество иммунных эффекторных клеток, включая CAR Т-клетки, экспрессирующих преобразователь сигналов CTBR, рассматриваемый в настоящем документе. В контексте настоящего документа термин "количество" относится к "количеству, эффективному" или "эффективному количеству" клеток, содержащих преобразователь сигналов CTBR, рассматриваемый в настоящем документе, и т.д., для достижения полезного или желаемого профилактического или терапевтического результата, включая клинические результаты.

"Профилактически эффективное количество" относится к количеству клеток, содержащих преобразователь сигналов CTBR, рассматриваемый в настоящем документе, и т.д., эффективному для достижения желаемого профилактического результата. Обычно, но необязательно, поскольку профилактическая доза используется у субъектов до начала заболевания или на его ранней стадии, профилактически эффективное количество составляет меньше терапевтически эффективного количества.

"Терапевтически эффективное количество" относится к количеству клеток, содержащих преобразователь сигналов CTBR, рассматриваемый в настоящем документе, эффективному для "лечения" субъекта (например, пациента). Когда указано терапевтическое количество, точное количество вводимых композиций может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, весе, размере опухоли, степени инфекционного заболевания или метастазирования и состоянии пациента (субъекта). Как правило, можно утверждать, что фармацевтическая композиция, содержащая иммунные эффекторные клетки, описанные в настоящем документе, может быть введена в дозировке от 10^2 до 10^{10} клеток/кг массы тела, предпочтительно от 10^5 до 10^6 клеток/кг массы тела, включая все целочисленные значения в этих диапазонах. Количество клеток будет зависеть от конечного применения, для которого предназначена композиция, а также от типа содержащихся в ней клеток. Для применений, предложенных в настоящем документе, клетки обычно содержатся в объеме, составляющем литр или менее, например 500 мл или менее, даже 250 или 100 мл, или менее. Следовательно, плотность желаемых клеток обычно превышает 10 клеток/мл и, как правило, превышает 10^7 клеток/мл, обычно она составляет 10^8 клеток/мл или более. Клинически значимое количество иммунных клеток может быть распределено на несколько инфузий, которые в совокупности равны или превышают 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} или 10^{12} клеток. В некоторых вариантах осуществления, в особенности, поскольку все введенные клетки будут перенацеле-

токс); эсперамицины; капепитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых из вышеперечисленных агентов. Это определение также охватывает антигормональные агенты, действующие путем регуляции или ингибирования действия гормонов на злокачественные новообразования, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Fareston) и антиандрогены, такие как флутамид, nilутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых из вышеперечисленных агентов.

Совместно с композициями, описанными в настоящем документе, может быть использован ряд других терапевтических агентов. В одном из вариантов осуществления композицию, содержащую иммунные эффекторские клетки, содержащие конвертер сигналов CTBR, рассматриваемый в настоящем документе, вводят с противовоспалительным агентом. Противовоспалительные агенты или лекарственные средства включают, не ограничиваясь перечисленным, стероиды и глюкокортикоиды (включая бетаметазон, будесонид, дексаметазон, гидрокортизона ацетат, гидрокортизон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон, преднизон, триампинолон, нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), включая аспирин, ибупрофен, напроксен, метотрексат, сульфасалазин, лефлуномид, лекарственные средства против TGF, пиклофосфамид и микофенолат.

Другие примеры НПВП выбраны из группы, состоящей из ибупрофена, напроксена, напроксена натрия, ингибиторов Cox-2, таких как VIOXX® (рофекоксиб) и CELEBREX® (целекоксиб), и салилатов. Примеры анальгезирующих средств выбраны из группы, состоящей из ацетаминофена, оксикодона, трамадола, пропиксифена гидрохлорида. Примеры глюкокортикоидов выбираются из группы, состоящей из кортизона, дексаметазона, гидрокортизона, метилпреднизолона, преднизолона или преднизона. Примеры модификаторов биологического ответа включают молекулы, направленные против маркеров клеточной поверхности (например, CD4, CD5 и т.д.), ингибиторы питокинов, такие как антагонисты TNF (например, этанерцепт (ENBREL®), адалимумаб (HUMIRA®) и инфликсимаб (REMICADE®), ингибиторы хемокинов и ингибиторы молекул адгезии. Модификаторы биологического ответа включают моноклональные антитела, а также рекомбинантные формы молекул. Примеры БПВП включают азатиоприн, пиклофосфамид, циклоспорин, метотрексат, пеницилламин, лефлуномид, сульфасалазин, гидроксихлорохин, золото (пероральное (ауранофин) и внутримышечное) и минопиклин.

Иллюстративные примеры терапевтических антител, подходящих для применения в комбинации с модифицированными Т-клетками, содержащими преобразователь сигналов CTBR, рассматриваемый в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленным, бавитуксимаб, бевапизумаб (авастин), биватузумаб, блинатумумаб, конатумумаб, даратумумаб, дулиготумаб, дацетугумаб, далототугумаб, элотугумаб (HuLuc63), гемтузумаб, ибритумумаб, индатуксимаб, инотугумаб, лорвотугумаб, люкатумумаб, милатугумаб, моксетумумаб, окаратугумаб, офатумумаб, ритуксимаб, силтуксимаб, тепротумумаб и ублитуксимаб.

В отдельных вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем документе, вводят совместно с питокином. Под "питокином" в контексте настоящего документа подразумевается общий термин для белков, высвобождаемых одной популяцией клеток, которые действуют на другую клетку как медиаторы межклеточных взаимодействий. Примерами таких питокинов являются лимфокины, монокины и традиционные полипептидные гормоны. Цитокины включают гормоны роста, такие как человеческий гормон роста, N-метилонил-гормон роста человека, и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (FSH), тиреостимулирующий гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); печеночный фактор роста; простагландин, фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген, белок ОВ; фактор некроза опухоли- α и - β ; мюллерова ингибирующая субстанция; мышинный гонадотропин-ассоциированный пептид; ингибин; активин; сосудистый эндотелиальный фактор роста; интегрин; тромбопоэтин (TPO); факторы роста нервов, такие как NGF- β ; тромбоцитарный фактор роста; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF- α и TGF- β ; инсулиноподобный фактор роста-I и -II; эритропоэтин (EPO); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон- α , - β и - γ ; колониестимулирующие факторы (КСФ), такие как макрофагальный КСФ (М-КСФ); гранулопитарно-макрофагальный КСФ (ГМ-КСФ); и гранулопитарный КСФ (Г-КСФ); интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, фактор некроза опухоли, такой как TNF- α или TNF- β ; и другие полипептидные факторы, включая LIF (фактор, ингибирующий лейкемию) и лиганд kit (KL). В контексте настоящего документа термин "питокин" включает белки из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток и биологически активные эквиваленты питокинов с нативной последовательностью.

I. Терапевтические способы

Иммунные эффекторские клетки, включая CAR Т-клетки, содержащие CTBR, рассматриваемый в настоящем документе, обеспечивают улучшенные способы адоптивной иммунотерапии для применения для профилактики, лечения и уменьшения интенсивности раковых заболеваний, или для предотвращения, лечения или уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома, связанного с раком.

Иммунные эффекторный клетки, содержащие сконструированный рецептор и СТБР, рассматриваемый в настоящем документе, позволяют получать улучшенные лекарственные препараты для применения для предотвращения, лечения или уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома рака, РТПХ (реакции "трансплантат против хозяина"), инфекционного заболевания, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или иммунодефицита. В контексте настоящего документа термин "лекарственный препарат" относится к модифицированным клеткам, полученным с использованием композиций и способов, рассматриваемых в настоящем документе. В частных вариантах осуществления лекарственный препарат содержит генетически модифицированные иммунные эффекторные клетки, Т-клетки, содержащие сконструированный рецептор, или CAR Т-клетки, дополнительно модифицированные для экспрессии преобразователя сигналов СТБР. Кроме того, модифицированные Т-клетки, рассматриваемые в частных вариантах осуществления, обеспечивают более безопасную и более эффективную адоптивную клеточную терапию, поскольку они устойчивы к истощению Т-клеток и демонстрируют повышенную стойкость и выживание в микроокружении опухоли, что может обеспечить долгосрочную терапию.

В частных вариантах осуществления эффективное количество модифицированных иммунных эффекторных клеток или Т-клеток, содержащих сконструированный рецептор и преобразователь сигналов СТБР, вводят субъекту для предотвращения, лечения или уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома рака, РТПХ, инфекционного заболевания, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или иммунодефицита.

В частных вариантах осуществления способ предотвращения, лечения или уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома рака включает введение субъекту эффективного количества модифицированных иммунных эффекторных клеток или Т-клеток, содержащих преобразователь сигналов СТБР и сконструированный TCR, CAR или Daric, или другой терапевтический трансген, для перенаправления клеток на опухоль или злокачественное новообразование. Генетически модифицированные клетки представляют собой более стойкий и жизнеспособный лекарственный препарат, поскольку клетки более устойчивы к иммуносупрессивным сигналам из микроокружения опухоли благодаря преобразованию иммуносупрессивного сигнала TGFβ в иммуностимулирующий сигнал.

В частных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, рассматриваемые в настоящем документе, применяют для лечения солидных опухолей или раковых заболеваний.

В частных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, рассматриваемые в настоящем документе, применяют для лечения солидных опухолей или раковых заболеваний, в том числе, не ограничиваясь перечисленным, рака надпочечников, адренокортикальной карциномы, рака анального канала, рака червеобразного отростка, астроцитомы, атипичной тератоидно-рабдоидной опухоли, базально-клеточной карциномы, рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, рака костей, рака головного мозга/ЦНС (центральной нервной системы), рака молочной железы, бронхиальных опухолей, опухолей сердца, рака шейки матки, холангиокарциномы, хондросаркомы, хордомы, рака ободочной кишки, колоректального рака, краниофарингиомы, протоковой карциномы in situ (DCIS), рака эндометрия, эпендимомы, рака пищевода, эстезионерозпитиомы, саркомы Юинга, экстракраниальной герминогенноклеточной опухоли, внегонадной герминогенноклеточной опухоли, рака глаза, рака фаллопиевых труб, фиброзной гистиосаркомы, фибросаркомы, рака желчного пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, карциноидных опухолей желудочно-кишечного тракта, гастроинтестинальной стромальной опухоли (GIST), герминогенных опухолей, глиомы, глиобластомы, рака головы и шеи, гемангиобластомы, гепатоклеточного рака, гипофарингеального рака, интраокулярной меланомы, саркомы Капоши, рака почки, рака гортани, лейомиосаркомы, рака губы, липосаркомы, рака печени, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, карциноидной опухоли легкого, злокачественной мезотелиомы, медуллярной карциномы, медуллобластомы, менагиомы, меланомы, карциномы из клеток Меркеля, срединной карциномы, рака рта, миксосаркомы, миелодиспластического синдрома, миелолифферативных новообразований, рака носовой полости и околоносовых пазух, рака носоглотки, нейробластомы, олигодендроглиомы, рака полости рта, рака ротовой полости, рака ротоглотки, остеосаркомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, опухолей из клеток панкреатического островка, папиллярной карциномы, параганглиомы, рака парашитовидной железы, рака полового члена, фарингеального рака, феохромоцитомы, пинеаломы, опухоли гипофиза, плеврального бластомы, первичного рака брюшины, рака предстательной железы, рака прямой кишки, ретинобластомы, почечно-клеточной карциномы, рака почечной лоханки и мочеточника, рабдомиосаркомы, рака слюнной железы, карциномы слюнной железы, рака кожи, саркомы мягких тканей, плоскоклеточной карциномы, плоскоклеточного рака легкого, рака тонкой кишки, рака желудка, карциномы потовой железы, синовиомы, рака яичка, рака горла, рака вилочковой железы, рака щитовидной железы, рака уретры, рака матки, саркомы матки, рака влагалища, рака кровеносных сосудов, рака вульвы и опухоли Вильмса.

В частных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, рассматриваемые в настоящем документе, применяют для лечения солидных опухолей или раковых заболеваний, включая, не ограничиваясь перечисленным, рак печени, рак поджелудочной железы, рак легкого,

рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак кости, рак щитовидной железы, рак почки или рак кожи.

В частных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, рассматриваемые в настоящем документе, применяют для лечения различных раковых заболеваний, включая, не ограничиваясь перечисленным, рак поджелудочной железы, мочевого пузыря и легкого.

В частных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, рассматриваемые в настоящем документе, применяют для лечения гемобластозов или гематологических злокачественных новообразований.

В частных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, рассматриваемые в настоящем документе, применяют для лечения В-клеточных злокачественных новообразований, включая, не ограничиваясь перечисленным, лейкозы, лимфомы и множественную миелому.

В частных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, рассматриваемые в настоящем документе, применяют для лечения гемобластозов, включающих, не ограничиваясь перечисленным, лейкозы, лимфомы и множественные миеломы: острый лимфопитерный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный, эритролейкоз, волосатоклеточный лейкоз (HCL), хронический лимфопитерный лейкоз (CLL) и хронический миелоидный лейкоз (CML), хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML) и истинную полицитемию, лимфому Ходжкина, нодулярную лимфому Ходжкина с лимфоидным преобладанием, лимфому Беркитта, мелкоклеточную лимфопитерную лимфому (SLL), диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, иммунобластную крупноклеточную лимфому, лимфобластную лимфому из В-клеток-предшественников, мантийноклеточную лимфому, лимфому маргинальной зоны, грибовидный микоз, анапластическую крупноклеточную лимфому, синдром Сезари, лимфобластную лимфому из Т-клеток-предшественников, множественную миелому, выраженную множественную миелому, вялотекущую множественную миелому, плазмноклеточный лейкоз, несекретирующей миеломы, IgD-миеломы, остеосклеротической миеломы, солитарную плазмопитому кости и экстрамедуллярную плазмцитому.

Предпочтительные клетки для применения в способах, рассматриваемых в настоящем документе, включают аутологичные/аутогенные ("собственные") клетки, предпочтительно гемопоэтические клетки, более предпочтительно Т-клетки и более предпочтительно иммунные эффекторные клетки.

В частных вариантах осуществления предложены способы, включающие введение терапевтически эффективного количества модифицированных иммунных эффекторных клеток, рассматриваемых в настоящем документе, или содержащей их композиции, нуждающемуся в этом пациенту, по отдельности или в комбинации с одним или более терапевтическими агентами. В отдельных вариантах осуществления клетки применяют для лечения пациентов с риском развития рака, РТГХ, инфекционного заболевания, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или иммунодефицита. Таким образом, частные варианты осуществления включают лечение, предотвращение или уменьшение интенсивности по меньшей мере одного симптома рака, инфекционного заболевания, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или иммунодефицита, включающее введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества клеток с отредактированным геномом, рассматриваемых в настоящем документе.

В одном из вариантов осуществления способ лечения рака, РТГХ, инфекционного заболевания, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или иммунодефицита у нуждающегося в этом субъекта включает введение эффективного количества, например терапевтически эффективного количества композиции, содержащей модифицированные иммунные эффекторные клетки, рассматриваемые в настоящем документе. Количество и частота введения будут определяться такими факторами, как состояние пациента, а также тип и тяжесть заболевания пациента, хотя подходящие дозировки могут быть определены в клинических испытаниях.

В одном иллюстративном варианте осуществления эффективное количество модифицированных иммунных эффекторных клеток, вводимое субъекту, составляет по меньшей мере 2×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 3×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 4×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 5×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 6×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 7×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 8×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 9×10^6 клеток/кг или по меньшей мере 10×10^6 или более клеток/кг, включая все промежуточные дозы клеток.

В еще одном иллюстративном варианте осуществления эффективное количество модифицированных иммунных эффекторных клеток, вводимое субъекту, составляет приблизительно 2×10^6 клеток/кг, приблизительно 3×10^6 клеток/кг, приблизительно 4×10^6 клеток/кг, приблизительно 5×10^6 клеток/кг, приблизительно 6×10^6 клеток/кг, приблизительно 7×10^6 клеток/кг, приблизительно 8×10^6 клеток/кг, приблизительно 9×10^6 клеток/кг или приблизительно 10×10^6 или более клеток/кг, включая все промежуточные дозы клеток.

В еще одном иллюстративном варианте осуществления эффективное количество модифицированных иммунных эффекторных клеток, вводимое субъекту, составляет от приблизительно 2×10^6 клеток/кг

до приблизительно 10×10^6 клеток/кг, от приблизительно 3×10^6 клеток/кг до приблизительно 10×10^6 клеток/кг, от приблизительно 4×10^6 клеток/кг до приблизительно 10×10^6 клеток/кг, от приблизительно 5×10^6 клеток/кг до приблизительно 10×10^6 клеток/кг, от 2×10^6 клеток/кг до приблизительно 6×10^6 клеток/кг, от 2×10^6 клеток/кг до приблизительно 7×10^6 клеток/кг, от 2×10^6 клеток/кг до приблизительно 8×10^6 клеток/кг, от 3×10^6 клеток/кг до приблизительно 6×10^6 клеток/кг, от 3×10^6 клеток/кг до приблизительно 7×10^6 клеток/кг, от 3×10^6 клеток/кг до приблизительно 8×10^6 клеток/кг, от 4×10^6 клеток/кг до приблизительно 6×10^6 клеток/кг, от 4×10^6 клеток/кг до приблизительно 7×10^6 клеток/кг, от 4×10^6 клеток/кг до приблизительно 8×10^6 клеток/кг, от 5×10^6 клеток/кг до приблизительно 6×10^6 клеток/кг, от 5×10^6 клеток/кг до приблизительно 7×10^6 клеток/кг, от 5×10^6 клеток/кг до приблизительно 8×10^6 клеток/кг или от 6×10^6 клеток/кг до приблизительно 8×10^6 клеток/кг, включая все промежуточные дозы клеток.

Специалисту в данной области техники будет ясно, что для осуществления желаемой терапии может потребоваться многократное введение композиций, рассматриваемых в частных вариантах осуществления. Например, композиция может быть введена 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более раз в течение 1 недели, 2 недель, 3 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 5 лет, 10 лет или более.

В отдельных вариантах осуществления может быть желательным вводить активированные Т-клетки субъекту и затем впоследствии брать кровь (или проводить аферез), активировать полученные из нее Т-клетки и повторно проводить инфузию пациенту этих активированных и размноженных Т-клеток. Этот процесс может выполняться несколько раз каждые несколько недель. В отдельных вариантах осуществления Т-клетки могут быть активированы из образцов крови объемом от 10 до 400 см^3 . В отдельных вариантах осуществления Т-клетки активируют из образцов крови объемом 20 см^3 , 30 см^3 , 40 см^3 , 50 см^3 , 60 см^3 , 70 см^3 , 80 см^3 , 90 см^3 , 100 см^3 , 150 см^3 , 250 см^3 , 300 см^3 , 350 см^3 или 400 см^3 , или более. Без привязки к какой-либо конкретной теории, использование этого протокола многократного взятия крови/многократной повторной инфузии может служить для отбора определенных популяций Т-клеток.

В одном из вариантов осуществления способ лечения субъекта, у которого диагностирован рак, включает взятие иммунных эффекторных клеток у субъекта, модификацию иммунных эффекторных клеток путем введения одного или более векторов, кодирующих генетически модифицированный антигенный рецептор и преобразователь сигналов TGF β и получения популяции модифицированных иммунных эффекторных клеток, и введение популяции модифицированных иммунных эффекторных клеток этому же субъекту. В предпочтительном варианте осуществления иммунные эффекторные клетки включают Т-клетки.

Способы введения композиций на основе клеток, рассматриваемых в частных вариантах осуществления, включают в себя любой способ, эффективно обеспечивающий повторное введение ex vivo модифицированных иммунных эффекторных клеток или повторное введение модифицированных предшественников иммунных эффекторных клеток, которые при введении субъекту дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки. Один из способов включает модификацию Т-клеток периферической крови ex vivo путем введения одного или более векторов, кодирующих сконструированный антигенный рецептор и преобразователь сигналов TGF β , и повторное введение трансдуцированных клеток субъекту.

Все публикации, патентные заявки и выданные патенты, цитируемые в этом описании, включены в него посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация, патентная заявка или выданный патент был(а) специально и индивидуальным образом включена посредством ссылки.

Хотя вышеизложенные варианты осуществления были описаны с некоторыми подробностями в целях иллюстрации и примера для ясности понимания, для специалиста в данной области техники будет ясно в свете раскрытия, представленного в настоящем документе, что в изобретение могут быть внесены некоторые изменения и модификации без отступления от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения. Следующие примеры приведены только с целью иллюстрации, а не для ограничения. Специалисты в данной области техники легко распознают множество не представляющих важность параметров, которые могут быть изменены или модифицированы для получения по существу схожих результатов.

Примеры

Пример 1. Т-клетки, экспрессирующие преобразователь сигналов TGF β IL-12R (CTBR12) и химерный антигенный рецептор (CAR)

Были разработаны иллюстративные конструкции преобразователя сигналов TGF β на основе IL-12R, как показано на фиг. 1.

Оптимальная передача сигналов рецептором IL-12 инициируется димеризацией внутриклеточных доменов субъединиц IL-12R β 1 и IL-12R β 2 после лигирования IL-12. Для преобразования сигнала TGF β для индукции передачи сигналов рецептора IL-12 после воздействия TGF β внутриклеточные домены рецептора 1 TGF β (TGF β R1) и рецептора 2 TGF β (TGF β R2) были заменены сигнальными доменами IL-12R β 1 и IL-12R β 2 соответственно. Трансмембранный и сигнальный домены IL-12R β 1 и IL-12R β 2 были

клонированы в лентивирусный вектор, кодирующий CAR, и разделены последовательностями саморасщепляющегося полипептида 2A (CAR.CTBR12).

Первичные человеческие Т-клетки из МНПК, взятых от здорового донора, активировали растворимыми антителами к CD3 (1 мкг/мл) и антителами к CD28 (5 мкг/мл) и трансдуцировали наполнителем или лентивирусными векторами, экспрессирующими (i) анти-ROR1 CAR (CAR к ROR1); (ii) анти-ROR1 CAR и доминантно-отрицательный рецептор TGF β (анти-ROR1.DNR); (iii) анти-ROR1 CAR и субъединицу TGF β R2; или (iv) анти-ROR1 CAR и CTBR12 (анти-ROR1.CTBR12). Через 10 дней культивирования в среде для выращивания, содержащей IL-2, определяли экспрессию анти-ROR1 CAR и TGF β R2 на клеточной поверхности с помощью проточной цитометрии. Рекомбинантный человеческий белок ROR1, конъюгированный с R-фикоэритрином (R-PE), использовали для специфического окрашивания Т-клеток, экспрессирующих анти-ROR1 CAR. Для обнаружения CTBR12 использовали коммерчески доступное антитело к TGFBR2. Репрезентативные данные по экспрессии показаны на фиг. 2.

Пятьдесят процентов Т-клеток, трансдуцированных лентивирусным вектором, кодирующим анти-ROR1 CAR и CTBR12, совместно экспрессировали анти-ROR1 CAR и CTBR12 (крайняя правая секция на фиг. 2). Напротив, в нетрансдуцированных Т-клетках не было обнаружено ни анти-ROR1 CAR, ни CTBR12, что указывает на то, что антитело к TGFBR2 не обнаруживает эндогенный TGFBR2.

Пример 2. Иммуносупрессивная передача сигналов TGF β ингибируется CTBR12

Лигирование TGF β 1 с тетрамерным комплексом, содержащим 2 единицы TGF β R1 и 2 единицы TGF β R2, индуцирует фосфорилирование SMAD2 и SMAD3 для распространения иммуносупрессивного сигнала к ядру клетки. Сверхэкспрессия усеченного TGF β R2 (доминантно-отрицательного рецептора TGF β - DNR) приводит к нечувствительности Т-клеток к TGF β , о чем свидетельствует потеря фосфорилирования SMAD2/3 в ответ на обработку TGF β . Таким образом, чтобы установить активацию сигнального пути TGF β , использовали экспрессию фосфо-SMAD2/3.

Первичные человеческие Т-клетки из МНПК, взятых от здорового донора, активировали растворимыми антителами к CD3 (1 мкг/мл) и антителами к CD28 (5 мкг/мл) и трансдуцировали наполнителем или лентивирусными векторами, экспрессирующими (i) анти-ROR1 CAR; (ii) анти-ROR1 CAR и доминантно-отрицательный рецептор TGF β (анти-ROR1.DNR); (iii) анти-ROR1 CAR и субъединицу TGF β R2; или (iv) анти-ROR1 CAR и CTBR12 (анти-ROR1.CTBR12). Через 10 дней культивирования в среде для выращивания, содержащей IL-2, культуры обрабатывали 10 нг/мл рекомбинантного человеческого TGF β 1 в течение 20 минут. Фосфорилирование SMAD2/3 оценивали с помощью антител, специфичных к фосфорилированному SMAD2/3.

Т-клетки, экспрессирующие CTBR12 или DNR, были полностью защищены от фосфорилирования SMAD2/3 (фиг. 3). Эти данные продемонстрировали, что экспрессия CTBR12 приводит к нечувствительности анти-ROR1 CAR Т-клеток к иммуносупрессивной передаче сигналов TGF β .

Пример 3. CTBR12 преобразует сигналы, передаваемые IL-12R, под воздействием TGF β 1

Клеточный ответ на IL-12 инициируется димеризацией рецептора и фосфорилированием STAT4 и STAT5. Поэтому экспрессию фосфо-STAT4 и фосфо-STAT5 использовали для оценки активации сигнального пути рецептора IL-12.

Первичные человеческие Т-клетки из МНПК, взятых от здорового донора, активировали растворимыми антителами к CD3 (1 мкг/мл) и антителами к CD28 (5 мкг/мл) и трансдуцировали наполнителем или лентивирусными векторами, экспрессирующими (i) анти-ROR1 CAR; (ii) анти-ROR1 CAR и доминантно-отрицательный рецептор TGF β (анти-ROR1.DNR); (iii) анти-ROR1 CAR и субъединицу TGF β R2; или (iv) анти-ROR1 CAR и CTBR12 (анти-ROR1.CTBR12). Через 10 дней культивирования в среде для выращивания, содержащей IL-2, культуры обрабатывали 50 нг/мл рекомбинантного человеческого IL-12 или 10 нг/мл рекомбинантного человеческого TGF β 1 в течение 20

Т-клетки, экспрессирующие анти-ROR1 CAR, демонстрировали повышенные уровни фосфорилированного STAT4 (фиг. 4, верхний ряд, 4 крайние правые секции по сравнению с нетрансдуцированным контролем (HTK)). Только CAR Т-клетки, экспрессирующие CTBR12, показали обнаружимые уровни экспрессии фосфо-STAT4 при обработке рекомбинантным человеческим TGF β 1 (фиг. 4, нижний ряд, крайняя правая секция по сравнению с другими секциями). Напротив, CAR Т-клетки, экспрессирующие только часть TGF β R2 преобразователя сигналов, не фосфорилировали STAT4 в ответ на обработку TGF β (фиг. 4, нижний ряд, четвертая секция справа).

CAR Т-клетки, экспрессирующие CTBR12, также демонстрировали обнаружимые уровни фосфо-STAT5 при обработке IL-12 или TGF β 1, что подтверждает, что преобразованный сигнал TGF β вызывает передачу сигналов эндогенным рецептором IL-12 (фиг. 5).

Экспрессию генов CAR Т-клетками, экспрессирующими анти-ROR1.CTBR12, измеряли в анализе последовательного размножения с контролем антигенами в присутствии или в отсутствие TGF β 1. Вкратце, GFP-меченные клетки-мишени K562, экспрессирующие человеческий антиген ROR1, использовали для серийного размножения CAR Т-клеток в присутствии или в отсутствие рекомбинантного человеческого TGF β 1. CAR Т-клетки стимулировали клетками-мишенями в соотношении 1:1 один раз каждые

семь дней в присутствии или в отсутствие 5 нг/мл рекомбинантного человеческого TGFβ1. Т-клетки собирали и выделяли иРНК для анализа экспрессии генов на 21 день после первоначальной стимуляции. Анализ экспрессии генов проводили с использованием панели для иммунологического анализа от Nanoscripting. В клетках, экспрессирующих анти-ROR1.СТBR12, были идентифицированы значительные изменения экспрессии генов, вызванные обработкой TGFβ1 (фиг. 6, левая панель), включая повышающую регуляцию известных IL-12R-регулируемых транскриптов IFNG, SELL, IL18RAP, IL18R1 и IL21R (фиг. 6, правая секция).

Пример 4. CAR Т-клетки, экспрессирующие СТBR12, секретируют повышенное количество IFNγ при воздействии антигена и TGFβ1

Передача сигналов рецептором IL-12 в человеческих Т-клетках стимулирует дифференцировку TH1 и повышает эффекторную функцию. Передача сигналов рецептором IL-12 может совместно с сигналами TCR вызывать увеличение высвобождения IFNγ в ответ на стимуляцию антигеном.

Преобразователь сигналов R2/R1 усиливал продукцию IFNγ при стимуляции Т-клеток посредством TCR или CAR в присутствии рекомбинантного человеческого TGFβ1. Первичные человеческие Т-клетки из МНПК, взятых от здорового донора, активировали растворимыми антителами к CD3 (1 мкг/мл) и антителами к CD28 (5 мкг/мл) и трансдуцировали наполнителем или лентивирусными векторами, экспрессирующими (i) анти-ROR1 CAR; (ii) анти-ROR1 CAR и доминантно-отрицательный рецептор TGFβ (анти-ROR1.DNR) или (iii) анти-ROR1 CAR и СТBR12 (анти-ROR1.СТBR12). После 10 дней культивирования в среде для выращивания, содержащей IL-2, клетки высевали на планшет на связанное с планшетом антитело к CD3 (1 мкг/мл) или рекомбинантный человеческий белок ROR1 (100 нг/мл) в присутствии или в отсутствие 5 нг/мл рекомбинантного человеческого TGFβ1. Через сорок восемь часов после высевания на планшет супернатанты собирали и анализировали с помощью Lumiplex на содержание растворимых пептидов.

Клетки, экспрессирующие СТBR12, продуцировали значительно большее количество IFNγ, чем другие типы клеток, при стимуляции посредством TCR или CAR в присутствии рекомбинантного человеческого TGFβ1 (фиг. 7).

Пример 5. CAR Т-клетки, экспрессирующие СТBR12, являются устойчивыми к иммуносупрессивным сигналам TGFβ1

Передача сигналов TGFβ снижает размножение Т-клеток в ответ на стимуляцию антигеном. Напротив, передача сигналов IL-12 увеличивает пролиферацию Т-клеток и снижает гипофункцию Т-клеток в результате продолжительного воздействия антигена.

Первичные человеческие Т-клетки из МНПК, взятых от здорового донора, активировали растворимыми антителами к CD3 (1 мкг/мл) и антителами к CD28 (5 мкг/мл) и трансдуцировали наполнителем или лентивирусными векторами, экспрессирующими (i) анти-ROR1 CAR; (ii) анти-ROR1 CAR и доминантно-отрицательный рецептор TGFβ (анти-ROR1.DNR) или (iii) анти-ROR1 CAR и СТBR12 (анти-ROR1.СТBR12). После 10 дней культивирования в среде для выращивания, содержащей IL-2, клетки подвергали анализу последовательной повторной стимуляции *in vitro*.

Вкратце, GFP-меченные клетки-мишени K562, экспрессирующие человеческий антиген ROR1, использовали для серийного размножения CAR Т-клеток в присутствии или в отсутствие рекомбинантного человеческого TGFβ1. CAR Т-клетки стимулировали клетками-мишенями в соотношении 1:1 один раз каждые семь дней в присутствии или в отсутствие 5 нг/мл рекомбинантного человеческого TGFβ1. Контрольные анти-ROR1 CAR-Т клетки демонстрировали минимальное размножение в присутствии 5 нг/мл рекомбинантного человеческого TGFβ1 в течение анализа. Напротив, анти-ROR1 CAR Т-клетки, также экспрессирующие TGFβ DNR или СТBR12, были в значительной степени защищены от опосредованной TGFβ1 передачи иммуносупрессивных сигналов. Фиг. 8. Эти результаты коррелировали со способностью как DNR, так и СТBR12 блокировать фосфорилирование SMAD (фиг. 8).

Пример 6. Т-клетки, экспрессирующие преобразователь сигналов TGFβ-IL-7R2/R1 (СТBR7) и химерный антигенный рецептор (CAR)

Были разработаны иллюстративные конструкции преобразователя сигналов TGFβ на основе IL-7R, как показано на фиг. 1.

Оптимальная передача сигналов рецептором IL-7 инициируется димеризацией внутриклеточных доменов IL-7Rα и общей гамма-цепи (γс; IL-2Rγ) после лигирования IL-7. Для преобразования сигнала TGFβ для индукции передачи сигналов рецептора IL-7 после воздействия TGFβ внутриклеточные домены рецептора 1 TGFβ (TGFβR1) и рецептора 2 TGFβ (TGFβR2) были заменены сигнальными доменами IL-2Rγ и IL-7Rα, соответственно, с получением химерного рецептора TGFβ, передающего сигналы IL-7 (СТBR7). Трансмембранный и сигнальный домены IL-2Rγ и IL-7Rα были клонированы в лентивирусный вектор, кодирующий CAR и разделены последовательностями саморасщепляющегося полипептида 2A (CAR.СТBR7).

Первичные человеческие Т-клетки из МНПК, взятых от здорового донора, активировали растворимыми антителами к CD3 (1 мкг/мл) и антителами к CD28 (5 мкг/мл) и трансдуцировали наполнителем

или лентивирусными векторами, экспрессирующими (i) анти-ROR1 CAR; (ii) анти-ROR1 CAR и доминантно-отрицательный рецептор TGF β (анти-ROR1.DNR); (iii) анти-ROR1 CAR и CTBR7 (анти-ROR1.CTBR7). Через 10 дней культивирования в среде для выращивания, содержащей IL-2, определяли экспрессию анти-ROR1 CAR и TGF β R2 на клеточной поверхности с помощью проточной цитометрии. Рекombинантный человеческий белок ROR1, конъюгированный с R-фикоэритрином (R-PE), использовали для специфического окрашивания Т-клеток, экспрессирующих анти-ROR1 CAR. Для обнаружения CTBR7 использовали коммерчески доступное антитело к TGFBR2. Репрезентативные данные по экспрессии показаны на фиг. 9.

Сорок процентов Т-клеток, трансдуцированных лентивирусным вектором, кодирующим анти-ROR1 CAR и CTBR7, совместно экспрессировали анти-ROR1 CAR и CTBR7 (крайняя правая секция на фиг. 9). Напротив, в нетрансдуцированных Т-клетках не было обнаружено ни анти-ROR1 CAR, ни CTBR7, что указывает на то, что антитело к TGFBR2 не обнаруживает эндогенный TGFBR2.

Пример 7. Иммуносупрессивная передача сигналов TGF β ингибируется CTBR7

Лигирование TGF β 1 с тетрамерным комплексом, содержащим 2 единицы TGF β R1 и 2 единицы TGF β R2, индуцирует фосфорилирование SMAD2 и SMAD3 для распространения иммуносупрессивного сигнала к ядру клетки. Сверхэкспрессия усеченного TGF β R2 (доминантно-отрицательного рецептора TGF β - DNR) приводит к нечувствительности Т-клеток к TGF β , о чем свидетельствует потеря фосфорилирования SMAD2/3 в ответ на обработку TGF β . Таким образом, чтобы установить активацию сигнального пути TGF β , использовали экспрессию фосфо-SMAD2/3.

Первичные человеческие Т-клетки из МНПК, взятых от здорового донора, активировали растворимыми антителами к CD3 (1 мкг/мл) и антителами к CD28 (5 мкг/мл) и трансдуцировали наполнителем или лентивирусными векторами, экспрессирующими (i) анти-ROR1 CAR; (ii) анти-ROR1 CAR и доминантно-отрицательный рецептор TGF β (анти-ROR1.DNR); (iii) анти-ROR1 CAR и CTBR7 (анти-ROR1.CTBR7). Через 10 дней культивирования в среде для выращивания, содержащей IL-2, культуры обрабатывали 10 нг/мл рекombинантного человеческого TGF β 1 в течение 20 мин. Фосфорилирование SMAD2/3 оценивали с помощью антител, специфичных к фосфорилированному SMAD2/3. Т-клетки, экспрессирующие CTBR7 или DNR, были защищены от фосфорилирования SMAD2/3 (фиг. 10). Эти данные продемонстрировали, что экспрессия CTBR7 приводит к нечувствительности анти-ROR1 CAR Т-клеток к иммуносупрессивной передаче сигналов TGF β .

Пример 8. CTBR7 преобразует сигналы, передаваемые IL-7R, под воздействием TGF β 1

Клеточный ответ на IL-7 инициируется димеризацией рецептора и фосфорилированием STAT5. Поэтому экспрессию фосфо-STAT5 использовали для оценки активации сигнального пути рецептора IL-7 для Т-клеток, экспрессирующих CTBR7.

Первичные человеческие Т-клетки из МНПК, взятых от здорового донора, активировали растворимыми антителами к CD3 (1 мкг/мл) и антителами к CD28 (5 мкг/мл) и трансдуцировали наполнителем или лентивирусными векторами, экспрессирующими (i) анти-ROR1 CAR; (ii) анти-ROR1 CAR и доминантно-отрицательный рецептор TGF β (анти-ROR1.DNR); (iii) анти-ROR1 CAR и CTBR7 (анти-ROR1.CTBR7). Через 10 дней культивирования в среде для выращивания, содержащей IL-2, культуры обрабатывали 10 нг/мл рекombинантного человеческого TGF β 1 в течение 20 мин. Только CAR Т-клетки, экспрессирующие CTBR7, показали обнаружимые уровни экспрессии фосфо-STAT5 при обработке рекombинантным человеческим TGF β 1 (фиг. 11, крайняя правая секция по сравнению с другими секциями).

Чтобы дополнительно исследовать преобразованную передачу сигналов IL-7R, была определена способность клеток, экспрессирующих CTBR7, повышающе регулировать экспрессию белка Bcl-2 в ответ на непрерывное воздействие TGF β 1. Контрольные CAR Т-клетки или CAR Т-клетки, также экспрессирующие DNR (анти-ROR1.DNR) или CTBR7 (анти-ROR1.CTBR7), подвергали анализу серийного размножения с контролем антигенами в отсутствие поддержки экзогенных цитокинов и либо в присутствии, либо в отсутствие TGF β 1. Вкратце, GFP-меченные клетки-мишени K562, экспрессирующие человеческий антиген ROR1, использовали для серийного размножения CAR Т-клеток в присутствии или в отсутствие рекombинантного человеческого TGF β 1. CAR Т-клетки стимулировали клетками-мишенями в соотношении 1:1 один раз каждые семь дней в присутствии или в отсутствие 5 нг/мл рекombинантного человеческого TGF β 1. Через шесть дней после второй стимуляции анти-ROR1 CAR, анти-ROR1 CAR.DNR или анти-ROR1 CAR.CTBR7 Т-клетки были исследованы на предмет экспрессии белка Bcl-2 с помощью проточной цитометрии. Только Т-клетки CAR, экспрессирующие CTBR7, демонстрировали повышенные уровни экспрессии белка Bcl-2 при размножении в присутствии TGF β 1 (фиг. 12).

Пример 9. CAR Т-клетки, также экспрессирующие CTBR7, демонстрируют устойчивую эффекторную активность в отсутствие экзогенного IL-2 и в присутствии TGF β 1

Передача сигналов TGF β снижает размножение Т-клеток в ответ на стимуляцию антигеном. Напротив, передача сигналов IL-7 может вызвать пролиферацию и выживание Т-клеток - активность, которая особенно очевидна для популяций Т-клеток памяти. Чтобы оценить, может ли передача сигналов CTBR7 повышать эффекторную активность CAR Т-клеток в присутствии TGF β 1, авторы сравнили размножение

CAR.CTBR7 и противоопухолевую активность с контрольными CAR Т-клетками и CAR.DNR Т-клетками в серийном анализе повторной стимуляции без поддержки экзогенных питокинов IL-2.

Первичные человеческие Т-клетки из МНПК, взятых от здорового донора, активировали растворимыми антителами к CD3 (1 мкг/мл) и антителами к CD28 (5 мкг/мл) и трансдуцировали наполнителем или лентивирусными векторами, экспрессирующими (i) анти-ROR1 CAR; (ii) анти-ROR1 CAR и доминантно-отрицательный рецептор TGF β (анти-ROR1.DNR); (iii) анти-ROR1 CAR и CTBR7 (анти-ROR1.CTBR7). После 10 дней культивирования в среде для выращивания, содержащей IL-2, клетки подвергали анализу последовательной повторной стимуляции *in vitro* без поддержки экзогенного цитокина IL-2.

Вкратце, GFP-меченные клетки-мишени K562, экспрессирующие человеческий антиген ROR1, использовали для серийного размножения CAR Т-клеток в присутствии или в отсутствие рекомбинантного человеческого TGF β 1. CAR Т-клетки стимулировали клетками-мишенями в соотношении 1:1 один раз каждые семь дней в присутствии или в отсутствие 5 нг/мл рекомбинантного человеческого TGF β 1. В этом анализе не использовали экзогенного IL-2 для поддержки. Контрольные анти-ROR1 CAR-Т клетки демонстрировали минимальное размножение в присутствии 5 нг/мл рекомбинантного человеческого TGF β 1 в течение анализа. CAR Т-клетки, также экспрессирующие DNR, также демонстрировали сниженное размножение при размножении в присутствии TGF β 1. Напротив, анти-ROR1 CAR Т-клетки, также экспрессирующие CTBR7, демонстрировали повышенное размножение с теми же клетками, размножаемыми в отсутствие TGF β 1 (фиг. 13). Эти данные продемонстрировали, что активная передача сигналов CTBR7 увеличивает размножение Т-клеток по сравнению с CAR по отдельности.

CAR Т-клетки, также экспрессирующие CTBR7, устраняют клетки из культуры в описанном выше серийном анализе повторной стимуляции без поддержки IL-2. После второго цикла стимуляции только CAR Т-клетки, также экспрессирующие CTBR7 и обработанные TGF β 1, полностью очищали популяцию опухолевых клеток (как определено по наличию GFP-положительных опухолевых клеток, оставшихся в культуре) (фиг. 13). Эти данные продемонстрировали, что передача сигналов CTBR7 была достаточной для поддержки эффекторной функции в условиях, когда передачи сигналов одним лишь CAR было недостаточно.

Пример 10. Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR) И CTBR12 или CTBR7

Были разработаны иллюстративные конструкции преобразователя сигналов TGF β IL-12R или TGF β IL-7R, как показано на фиг. 1.

Трансмембранный и сигнальный домены IL-12R β 1 и IL-12R β 2 были клонированы в лентивирусный вектор, кодирующий анти-EGFR CAR, и разделены последовательностями саморасщепляющегося полипептида 2A (анти-EGFR.CTBR12).

Трансмембранный и сигнальный домены IL-2R γ и IL-7R α были клонированы в лентивирусный вектор, кодирующий анти-EGFR CAR, и разделены последовательностями саморасщепляющегося полипептида 2A (анти-EGFR.CTBR7).

Первичные человеческие Т-клетки из МНПК, взятых от здорового донора, активировали растворимыми антителами к CD3 (1 мкг/мл) и антителами к CD28 (5 мкг/мл) и трансдуцировали наполнителем или лентивирусными векторами, экспрессирующими (i) анти-EGFR CAR; (ii) анти-EGFR CAR и доминантно-отрицательный рецептор TGF β (анти-EGFR.DNR); (iii) анти-EGFR CAR и CTBR12 (анти-EGFR.CTBR12); и (iv) анти-EGFR CAR и CTBR7 (анти-EGFR.CTBR7). Через 10 дней культивирования в среде для выращивания, содержащей IL-2, определяли экспрессию анти-EGFR CAR и TGF β 2 на клеточной поверхности с помощью проточной цитометрии. Репрезентативные данные по экспрессии показаны на фиг. 15 (верхняя секция).

Пример 11. Иммуносупрессивная передача сигналов TGF β ингибируется Т-клетками, экспрессирующими АНТИ-EGFR CAR и CTBR12 или АНТИ-EGFR CAR И CTBR7

Первичные человеческие Т-клетки из МНПК, взятых от здорового донора, активировали растворимыми антителами к CD3 (1 мкг/мл) и антителами к CD28 (5 мкг/мл) и трансдуцировали наполнителем или лентивирусными векторами, экспрессирующими (i) анти-EGFR CAR; (ii) анти-EGFR CAR и доминантно-отрицательный рецептор TGF β (анти-EGFR.DNR); (iii) анти-EGFR CAR и CTBR12 (анти-EGFR.CTBR12); и (iv) анти-EGFR CAR и CTBR7 (анти-EGFR.CTBR7). Через 10 дней культивирования в среде для выращивания, содержащей IL-2, культуры обрабатывали 10 нг/мл рекомбинантного человеческого TGF β 1 в течение 20 мин. Фосфорилирование SMAD2/3 оценивали с помощью антител, специфичных к фосфорилированному SMAD2/3. Т-клетки, экспрессирующие DNR, CTBR12 или CTBR7, были полностью защищены от фосфорилирования SMAD2/3 (фиг. 15, нижняя секция). Эти данные продемонстрировали, что экспрессия CTBR12 или CTBR7 приводит нечувствительности анти-EGFR CAR Т-клеток к иммуносупрессивной передаче сигналов TGF β .

Пример 12. CTBR преобразует сигналы, передаваемые IL-R, при воздействии TGF β 1

Клеточный ответ на IL-12 инициируется димеризацией рецептора и фосфорилированием STAT4 и STAT5. Экспрессию фосфо-STAT4 использовали для оценки активации сигнального пути рецептора IL-

12 для Т-клеток, экспрессирующих анти-EGFR.СТBR12.

Клеточный ответ на IL-7 инициируется димеризацией рецептора и фосфорилированием STAT5. Поэтому экспрессию фосфо-STAT5 использовали для оценки активации сигнального пути рецептора IL-7 для Т-клеток, экспрессирующих анти-EGFR.СТBR7.

Первичные человеческие Т-клетки из МНПК, взятых от здорового донора, активировали растворимыми антителами к CD3 (1 мкг/мл) и антителами к CD28 (5 мкг/мл) и трансдуцировали наполнителем или лентивирусными векторами, экспрессирующими (i) анти-EGFR CAR; (ii) анти-EGFR CAR и СТBR12 (анти-EGFR.СТBR12) и (iii) анти-EGFR CAR и СТBR7 (анти-EGFR.СТBR7). После 10 дней культивирования в среде для выращивания, содержащей IL-2, культуры Т-клеток обрабатывали рекомбинантным человеческим IL-12 или рекомбинантным человеческим TGFβ1 в течение 20 мин (фиг. 16), или рекомбинантным человеческим IL-7 или рекомбинантным человеческим TGFβ1 в течение 20 мин (фиг. 17).

Т-клетки, экспрессирующие анти-EGFR CAR или анти-EGFR.СТBR 12, демонстрируют повышенные уровни фосфорилированного STAT4 в присутствии IL-12 (фиг. 16, левые секции), но только Т-клетки, экспрессирующие анти-EGFR.СТBR 12, демонстрируют повышенные уровни фосфорилированного STAT4 в присутствии TGFβ1 (фиг. 16, нижняя правая секция).

Т-клетки, экспрессирующие анти-EGFR CAR или анти-EGFR.СТBR7, демонстрируют повышенные уровни фосфорилированного STAT5 в присутствии IL-7 (фиг. 17, левые секции), но только Т-клетки, экспрессирующие анти-EGFR.СТBR7, демонстрируют повышенные уровни фосфорилированного STAT4 в присутствии TGFβ1 (фиг. 17, нижняя правая секция).

Пример 13. CAR Т-клетки, экспрессирующие СТBR12, секретируют повышенное количество IFNγ при воздействии антигена и TGFβ1

Первичные человеческие Т-клетки из МНПК, взятых от здорового донора, активировали растворимыми антителами к CD3 (1 мкг/мл) и антителами к CD28 (5 мкг/мл) и трансдуцировали наполнителем или лентивирусными векторами, экспрессирующими (i) анти-EGFR CAR; (ii) анти-EGFR CAR и доминантно-отрицательный рецептор TGFβ (anti-EGFR.DNR) или (iii) анти-EGFR CAR и СТBR12 (анти-EGFR.СТBR12). После 10 дней культивирования в среде для выращивания, содержащей IL-2, Т-клетки, экспрессирующие CAR и СТBR, культивировали с клетками Jurkat (EGFR(-)), клетками A549 (EGFR(+)) или клетками HT1080 (EGFR(+)) в течение 48 ч в присутствии или в отсутствие 5 нг/мл рекомбинантного человеческого TGFβ1. Супернатанты собирали и анализировали с помощью Luminex на содержание растворимых цитокинов.

Экспрессирующие СТBR12 клетки продуцировали значительно большие количества IFNγ при культивировании с клеточными линиями EGFR(+) по сравнению с клеточными линиями EGFR(-) в присутствии рекомбинантного человеческого TGFβ1 (фиг. 18).

Пример 14. Т-клетки с CAR к EGFR, также экспрессирующие СТBR, демонстрируют устойчивую эффекторную активность в отсутствие экзогенного IL-2 и в присутствии TGFβ1

Первичные человеческие Т-клетки из МНПК CD3 (1 мкг, взятых от здорового донора, активировали растворимыми антителами к CD3 (1 мкг/мл) и антителами к CD28 (5 мкг/мл) и трансдуцировали наполнителем или лентивирусными векторами, экспрессирующими (i) анти-EGFR CAR; (ii) анти-EGFR CAR и доминантно-отрицательный рецептор TGFβ (anti-EGFR.DNR); (iii) анти-EGFR CAR (CAR к EGFR) и СТBR12 (анти-EGFR.СТBR12); и (iv) CAR к EGFR и СТBR7 (анти-EGFR.СТBR7). После 10 дней культивирования в среде для выращивания, содержащей IL-2, клетки подвергали анализу последовательной повторной стимуляции *in vitro* без поддержки экзогенного цитокина IL-2.

Вкратце, GFP-меченные клетки-мишени, экспрессирующие человеческий антиген EGFR, использовали для серийного размножения CAR Т-клеток в присутствии или в отсутствие рекомбинантного человеческого TGFβ1. CAR Т-клетки стимулировали клетками-мишенями в соотношении 1:1 один раз каждые семь дней в присутствии или в отсутствие 5 нг/мл рекомбинантного человеческого TGFβ1. В этом анализе не использовали экзогенного IL-2 для поддержки. Контрольные Т-клетки с CAR к EGFR продемонстрировали минимальное размножение в присутствии 5 нг/мл рекомбинантного человеческого TGFβ1 после первой стимуляции, и далее их не культивировали. Т-клетки с CAR, также экспрессирующие DNR, также демонстрировали сниженное размножение при размножении в присутствии TGFβ1. Напротив, Т-клетки с CAR к EGFR, также экспрессирующие СТBR12 или СТBR7, демонстрировали повышенное размножение с теми же клетками, размножаемыми в отсутствие TGFβ1 (фиг. 19). Эти данные продемонстрировали, что активная передача сигналов СТBR12 или СТBR7 увеличивает размножение Т-клеток по сравнению с CAR по отдельности.

Пример 15. Y-ESO1 TCR Т-клетки, также экспрессирующие СТBR, демонстрируют устойчивую эффекторную активность в отсутствие экзогенного IL-2 и в присутствии TGFβ1

Были разработаны иллюстративные конструкции преобразователя сигналов TGFβ IL-12R или TGFβ IL-7R на основе TCR, как показано на фиг. 20.

Трансмембранный и сигнальный домены IL-12Rβ1 и IL-12Rβ2 были клонированы в лентивирусный вектор, кодирующий TCR к NY-ESO1, и разделены последовательностями саморасщепляющегося полипеп-

тида 2A (NY-ESO1.CTBR12).

Трансмембранный и сигнальный домены IL-2R γ и IL-7R α были клонированы в лентивирусный вектор, кодирующий NY-ESO1 TCR, и разделены последовательностями саморасщепляющегося полипептида 2A (NY-ESO1.CTBR7).

Первичные человеческие Т-клетки из МНПК, взятых от здорового донора, активировали растворимыми антителами к CD3 (1 мкг/мл) и антителами к CD28 (5 мкг/мл) и трансдуцировали наполнителем или лентивирусными векторами, экспрессирующими (i) NY-ESO1 TCR; (ii) NY-ESO1 TCR и доминантно-отрицательный рецептор TGF β (NY-ESO1.DNR); (iii) NY-ESO1 TCR и CTBR12 (NY-ESO1.CTBR12); и (iv) NY-ESO1 TCR и CTBR7 (NY-ESO1.CTBR7). Через 10 дней культивирования в среде для выращивания, содержащей IL-2, определяли экспрессию NY-ESO1 TCRR и TGF β 2R на клеточной поверхности с помощью проточной цитометрии. Все конструкции экспрессировались.

Пример 16. Иммуносупрессивная передача сигналов TGF β ингибируется Т-клетками, экспрессирующими NY-ESO TCR и CTBR12 или NY-ESO TCR и CTBR7

Первичные человеческие Т-клетки из МНПК, взятых от здорового донора, активировали растворимыми антителами к CD3 (1 мкг/мл) и антителами к CD28 (5 мкг/мл) и трансдуцировали наполнителем или лентивирусными векторами, экспрессирующими (i) NY-ESO1 TCR; (ii) NY-ESO1 TCR и доминантно-отрицательный рецептор TGF β (NY-ESO1.DNR); (iii) NY-ESO1 TCR и CTBR12 (NY-ESO1.CTBR12); и (iv) NY-ESO1 TCR и CTBR7 (NY-ESO1.CTBR7). Через 10 дней культивирования в среде для выращивания, содержащей IL-2, культуры обрабатывали 10 нг/мл рекомбинантного человеческого TGF β 1 в течение 20 мин. Фосфорилирование SMAD2/3 оценивали с помощью антител, специфичных к фосфорилированному SMAD2/3. Т-клетки, экспрессирующие DNR, CTBR12 или CTBR7, были полностью защищены от фосфорилирования SMAD2/3 (фиг. 21). Эти данные продемонстрировали, что экспрессия CTBR12 или CTBR7 приводит нечувствительности NY-ESO1 TCR Т-клеток к иммуносупрессивной передаче сигналов TGF β .

Пример 17. CTBR преобразует сигналы, передаваемые IL-R, при воздействии TGF β 1

Клеточный ответ на IL-12 инициируется димеризацией рецептора и фосфорилированием STAT4 и STAT5. Экспрессию фосфо-STAT4 использовали для оценки активации сигнального пути рецептора IL-12 для Т-клеток, экспрессирующих NY-ESO1.CTBR12.

Клеточный ответ на IL-7 инициируется димеризацией рецептора и фосфорилированием STAT5. Поэтому экспрессию фосфо-STAT5 использовали для оценки активации сигнального пути рецептора IL-7 для Т-клеток, экспрессирующих NY-ESO1.CTBR7.

Первичные человеческие Т-клетки из МНПК, взятых от здорового донора, активировали растворимыми антителами к CD3 (1 мкг/мл) и антителами к CD28 (5 мкг/мл) и трансдуцировали наполнителем или лентивирусными векторами, экспрессирующими (i) NY-ESO1 TCR и CTBR12 (NY-ESO1.CTBR12); и (iv) NY-ESO1 TCR и CTBR7 (NY-ESO1.CTBR7). После 10 дней культивирования в среде для выращивания, содержащей IL-2, культуры Т-клеток обрабатывали рекомбинантным человеческим IL-7 или рекомбинантным человеческим TGF β 1 в течение 20 мин (фиг. 22, верхняя секция) или рекомбинантным человеческим IL-12 или рекомбинантным человеческим TGF β 1 в течение 20 мин (фиг. 22, нижняя секция).

Пример 18. CAR Т-клетки, экспрессирующие CTBR12, секретируют повышенное количество IFN γ при воздействии антигена и TGF β 1

Первичные человеческие Т-клетки из МНПК, взятых от здорового донора, активировали растворимыми антителами к CD3 (1 мкг/мл) и антителами к CD28 (5 мкг/мл) и трансдуцировали наполнителем или лентивирусными векторами, экспрессирующими: (i) NY-ESO1 TCR; (ii) NY-ESO1 TCR и доминантно-отрицательный рецептор TGF β (NY-ESO1.DNR); (iii) NY-ESO1 TCR и CTBR12 (NY-ESO1.CTBR12); и (iv) NY-ESO1 TCR и CTBR7 (NY-ESO1.CTBR7). После 10 дней культивирования в среде для выращивания, содержащей IL-2, Т-клетки, экспрессирующие CAR и CTBR, культивировали с клетками SaOs2 (A2, NY-ESO1(+)) или A549.A2.NY-ESO1 (A2, NY-ESO1(+)) при соотношении Т-клеток и клеток-мишеней 5:1 в течение 48 ч в присутствии либо в отсутствие 5 нг/мл рекомбинантного человеческого TGF β 1. Супернатанты собирали и анализировали с помощью Luminex на содержание растворимых цитокинов.

Экспрессирующие CTBR12 клетки продуцировали значительно большие количества IFN γ при культивировании с клеточными линиями A2 и NY-ESO1 (+) в присутствии рекомбинантного человеческого TGF β 1 по сравнению с клеточными линиями A2 и NY-ESO1 (+) (фиг. 23). Экспрессирующие CTBR клетки демонстрируют устойчивость к иммуносупрессивной передаче сигналов TGF β .

В целом, термины, используемые в следующей формуле изобретения, не должны толковаться как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в описании и формуле изобретения, но должны толковаться как включающие все возможные варианты осуществления вместе с полным объемом эквивалентов, на которые распространяется такая формула изобретения. Соответственно, формула изобретения не ограничена описанием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий слитый полипептид, содержащий:

- (a) полипептид TGF β R2, содержащий:
 - (i) внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2;
 - (ii) трансмембранный домен IL-12R β 2 и
 - (iii) внутриклеточный сигнальный домен IL-12R β 2;
- (b) саморасщепляющийся вирусный пептид 2A и
- (c) полипептид TGF β R1, содержащий:
 - (i) внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1;
 - (ii) трансмембранный домен IL-12R β 1 и
 - (iii) внутриклеточный сигнальный домен IL-12R β 1.

2. Лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий слитый полипептид, содержащий:

- (a) полипептид TGF β R2, содержащий:
 - (i) внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R2;
 - (ii) трансмембранный домен IL-12R β 1 и
 - (iii) внутриклеточный сигнальный домен IL-12R β 1;
- (b) саморасщепляющийся вирусный пептид 2A и
- (c) полипептид TGF β R1, содержащий:
 - (i) внеклеточный TGF β 1-связывающий домен TGF β R1;
 - (ii) трансмембранный домен IL-12R β 2 и
 - (iii) внутриклеточный сигнальный домен IL-12R β 2.

3. Лентивирусный вектор по п.1 или 2, где саморасщепляющийся вирусный пептид 2A выбран из группы, состоящей из пептида вируса ящура (FMDV) (F2A), пептида вируса ринита лошадей A (ERAV) (E2A), пептида вируса *Thosea asigna* (TaV) (T2A), пептида тешовируса-1 свиней (PTV-1) (P2A), пептида 2A тейловируса и пептида 2A вируса энцефаломиокардита.

4. Лентивирусный вектор по любому из пп.1-3, дополнительно содержащий сконструированный антигенный рецептор и второй саморасщепляющийся вирусный полипептид 2A.

5. Лентивирусный вектор по п.4, где сконструированный антигенный рецептор выбран из группы, состоящей из сконструированного Т-клеточного рецептора (TCR), химерного антигенного рецептора (CAR), рецептора DARIC или его компонентов и химерного цитокинового рецептора; необязательно, где сконструированный антигенный рецептор распознает антиген, выбранный из группы, состоящей из рецептора фолликулярной кислоты альфа, 5T4, интегрина $\alpha v \beta 6$, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, семейства EGFR, включая ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EphA2, EpCAM, FAP, фетального AchR, GD2, GD3, глипикана-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, лямбда, антигена Y системы Льюис, каппа, мезотелина, Muc1, Muc16, NCAM, лигандов NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, сурвивина, TAG72, TEM, VEGFR2 и WT-1.

6. Лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий слитый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 26-30.

7. Клетка для лечения субъекта с раком, содержащая лентивирусный вектор по любому из пп.1-6.

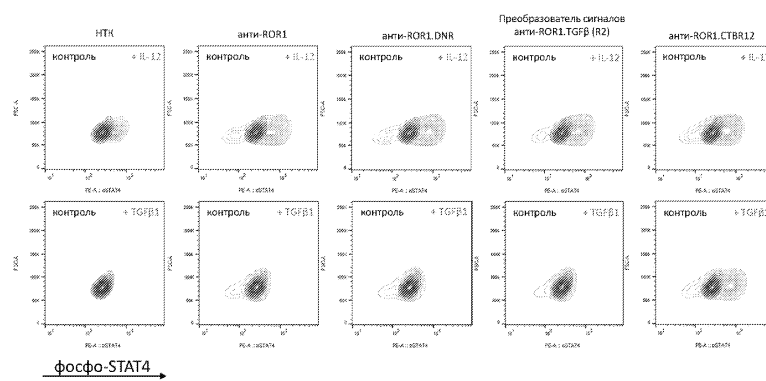
8. Клетка по п.7, где:

- (a) клетка представляет собой гемопоэтическую клетку;
- (b) клетка представляет собой Т-клетку;
- (c) клетка представляет собой клетку CD3+, CD4+ и/или CD8+;
- (d) клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку;
- (e) клетка представляет собой цитотоксический Т-лимфоцит (CTL), опухоль-инфильтрирующий лимфоцит (TIL) или хелперную Т-клетку или
- (f) клетка представляет собой естественную клетку-киллер (НК-клетку) или Т-клетку, имеющую свойства естественного киллера (НКТ-клетку).

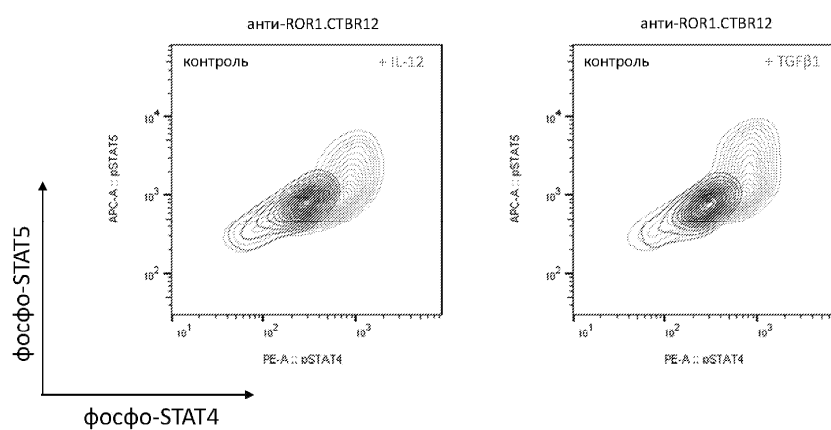
9. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и лентивирусный вектор по любому из пп.1-6 или клетку по п.7 или 8.

10. Способ лечения, предотвращения или уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома рака, солидного рака или гематологического злокачественного новообразования, включающий введение субъекту эффективного количества композиции по п.9.

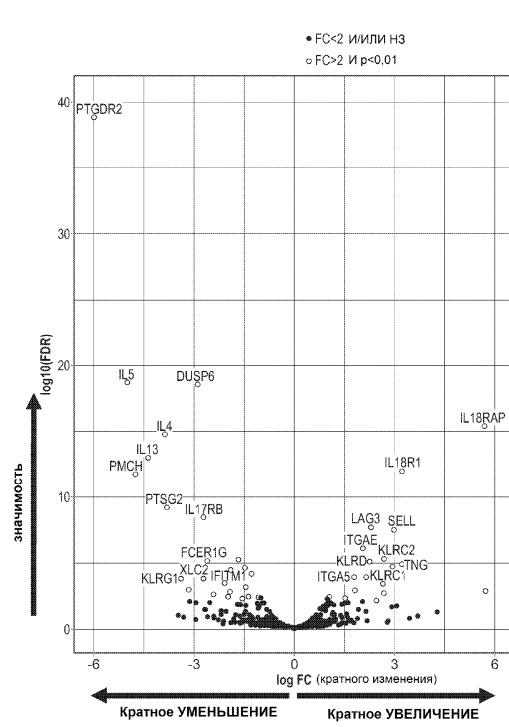




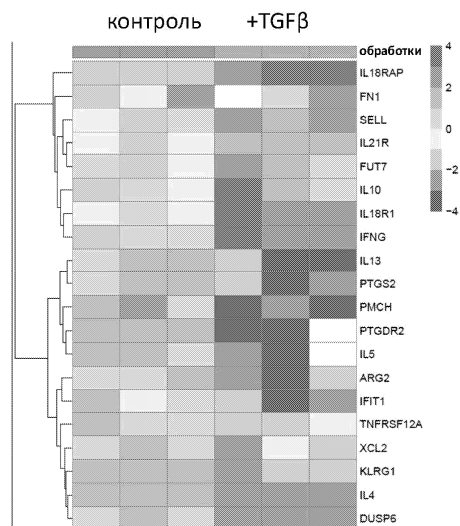
Фиг. 4



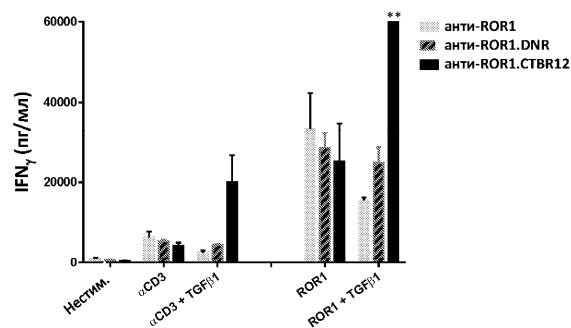
Фиг. 5



*FDR – уровень ложноположительных результатов
FC – кратное изменение



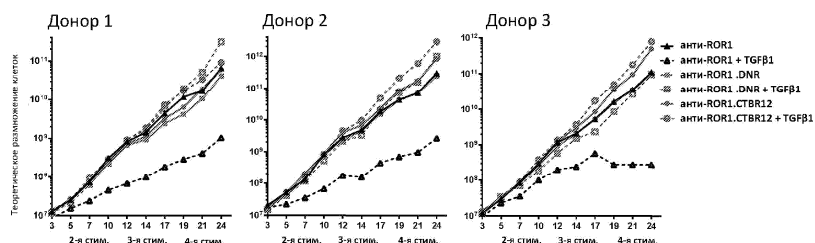
Фиг. 6



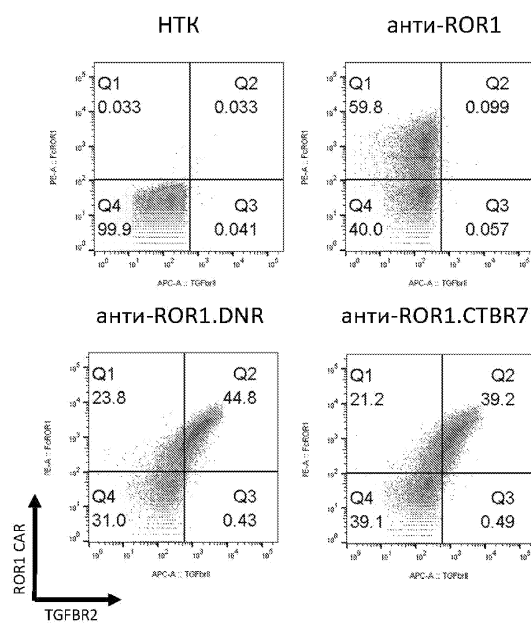
*объединенные данные от 3 доноров

**значение за пределами шкалы – вне линейного диапазона анализа

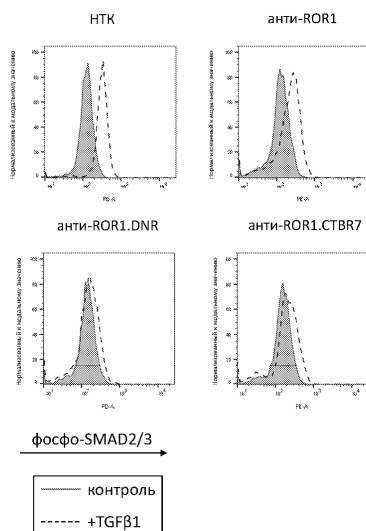
Фиг. 7



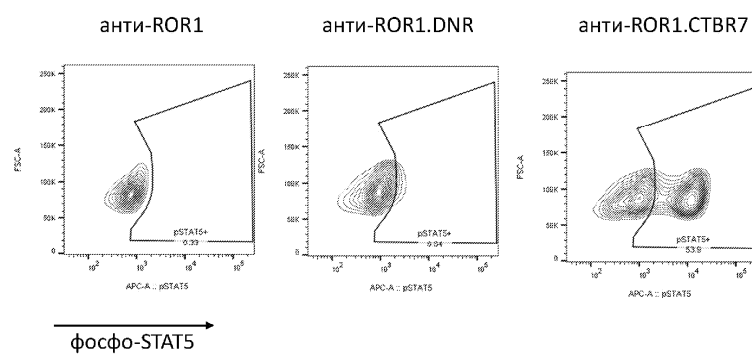
Фиг. 8



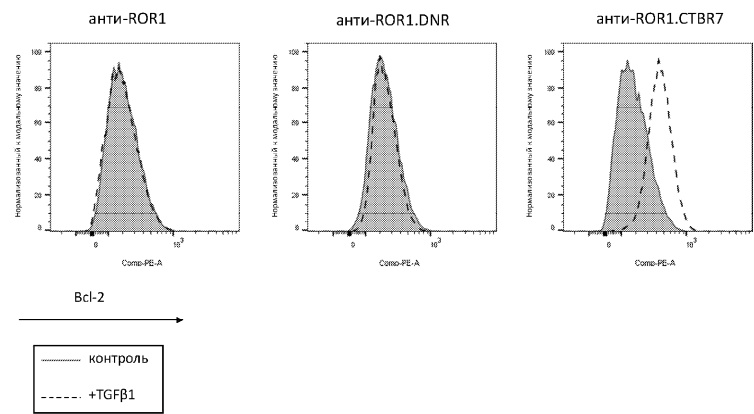
Фиг. 9



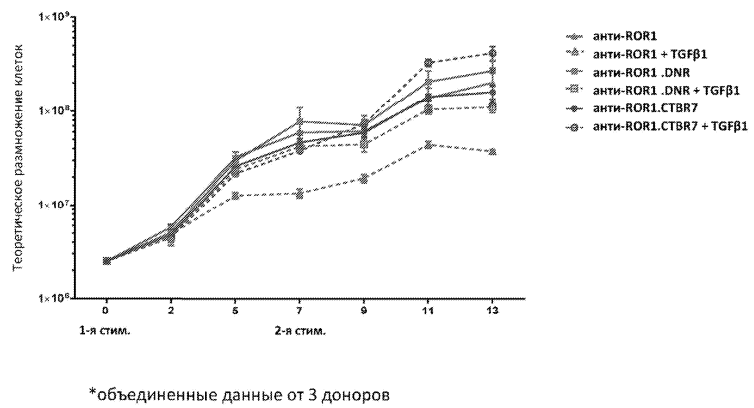
Фиг. 10



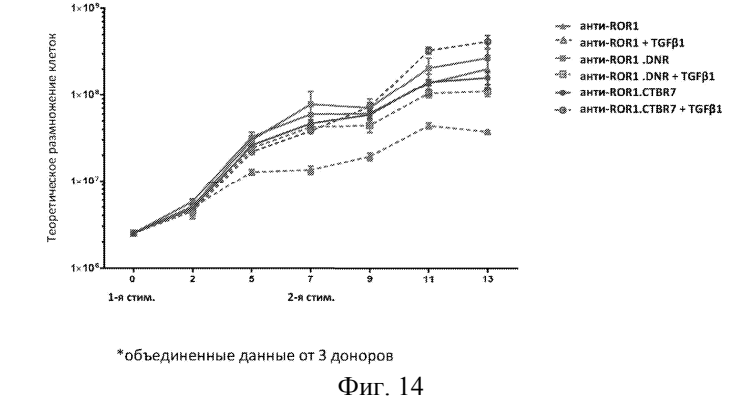
Фиг. 11



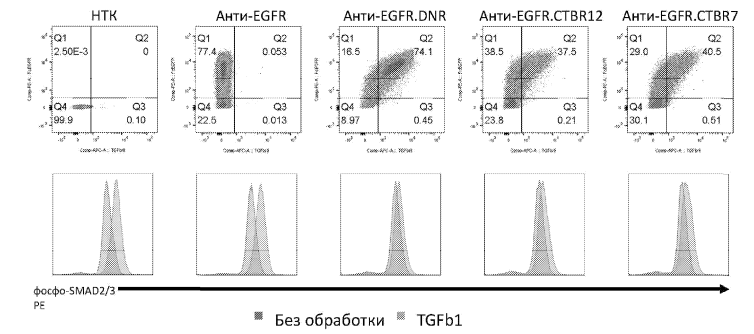
Фиг. 12



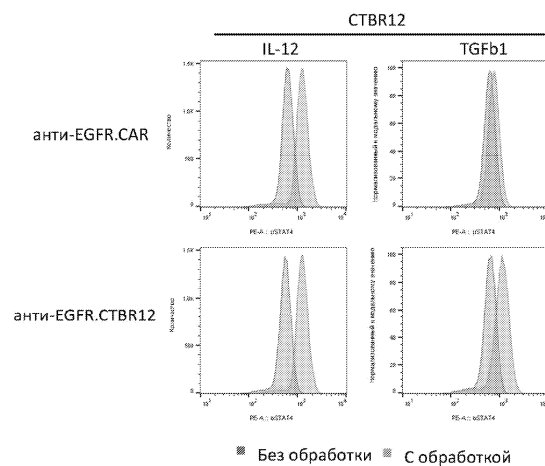
Фиг. 13



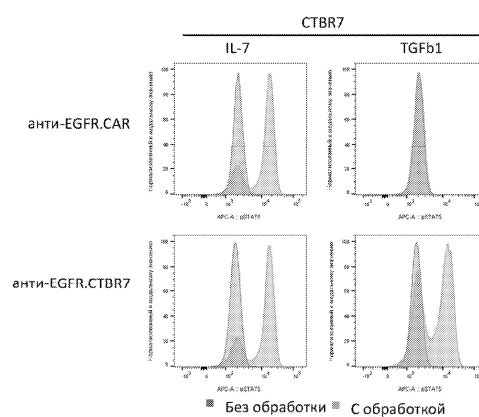
Фиг. 14



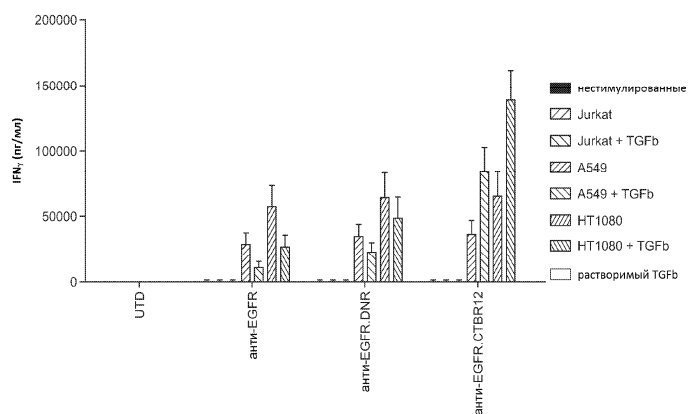
Фиг. 15



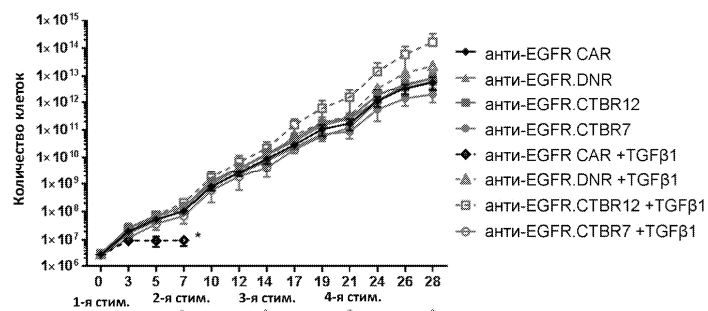
Фиг. 16



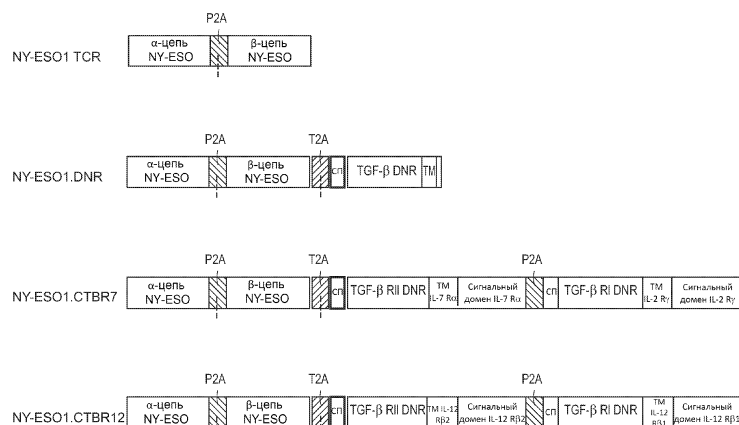
Фиг. 17



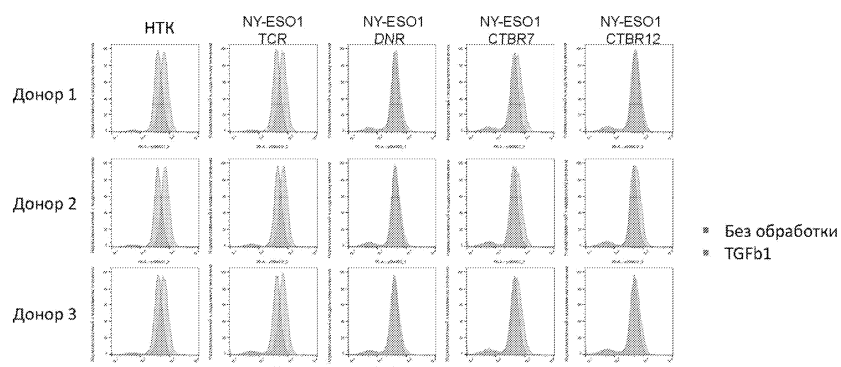
Фиг. 18



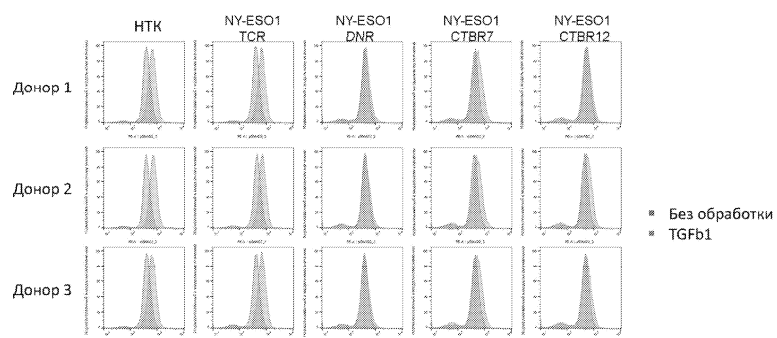
Фиг. 19



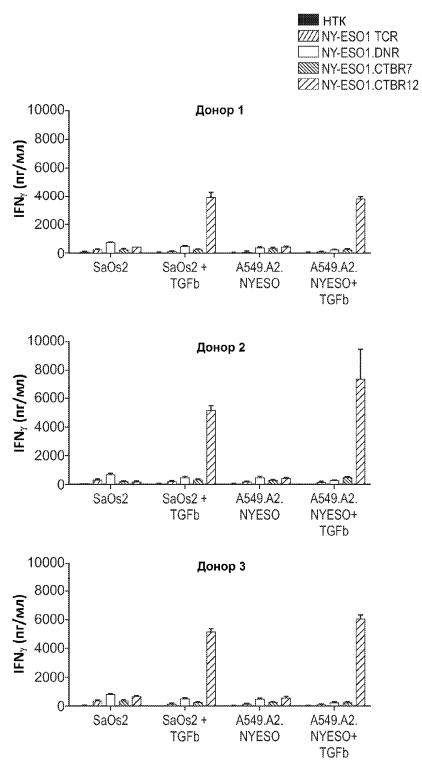
Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23

