

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202193067** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2022.04.12

(51) Int. Cl. *C12N 9/88* (2006.01)  
*C07K 14/705* (2006.01)  
*C07K 14/725* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.06.12

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ SA2 И СПОСОБЫ НАСТРАИВАЕМОЙ РЕГУЛЯЦИИ**

---

(31) 62/860,383

(32) 2019.06.12

(33) US

(86) PCT/US2020/037624

(87) WO 2020/252405 2020.12.17

(71) Заявитель:  
**ОБСИДИАН ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.**  
(US)

(72) Изобретатель:

**Шебеста Майкл, Флери Мишель**  
Луи, Элпек Кутлу Гоксу (US)

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) В изобретении представлены регулируемые системы биосхемы. Такие системы обеспечивают модульные и настраиваемые системы экспрессии белков, способствующие исследованию и разработке терапевтических способов лечения.

**202193067**  
**A1**

**202193067**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572294EA/085

### **КОМПОЗИЦИИ CA2 И СПОСОБЫ НАСТРАИВАЕМОЙ РЕГУЛЯЦИИ**

#### **Ссылка на родственные заявки**

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой США № 62/860383, поданной 12 июня 2019 года. Все содержание вышеупомянутой заявки полностью включено в данный документ посредством ссылки.

#### **Ссылка на список последовательностей**

[0002] Настоящая заявка содержит Список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Указанный файл ASCII, созданный 11 июня 2020 года, называется 268052\_469001\_SL.txt и имеет размер 10046525 байтов.

#### **Область техники, к которой относится настоящее изобретение**

[0003] Настоящее раскрытие относится к доменам дестабилизации (DD), происходящим из карбоангидразы 2 (CA2) человека, которые могут регулировать стабильность белка по меньшей мере для одного груза, и к композициям и способам их использования. В настоящем раскрытии представлены полипептиды систем биосхемы CA2, эффекторные модули CA2, элементы ответа на стимулы (SRE), кодирующие их полинуклеотиды, векторы и клетки, содержащие полипептиды и/или полинуклеотиды, для применения в иммунотерапии рака.

#### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

[0004] Генная и клеточная терапия совершает переворот в медицине и предлагает новые возможности для лечения ранее трудноизлечимых заболеваний. Однако большинство современных технологий не позволяют определять время или уровни индукции белка-мишени. Это сделало трудной или невозможной безопасную и эффективную реализацию многих потенциальных вариантов применения генной и клеточной терапии.

[0005] Неадекватное регулирование экзогенных и/или эндогенных генов является важной проблемой во многих условиях генной и клеточной терапии. Этот недостаток регулирования также затрудняет безопасную экспрессию белков с узкими или неопределенными терапевтическими окнами или белков, требующих более определенной или временной экспрессии.

[0006] Одним из подходов к регулируемой экспрессии или функции белка является использование доменов дестабилизации (DD). Домены дестабилизации - это небольшие белковые домены, которые можно добавить к представляющему интерес белку-мишени. DD делают прикрепленный представляющий интерес белок нестабильным в отсутствие связывающего DD лиганда, и представляющий интерес белок быстро разрушается убиквитин-протеасомной системой клетки. Однако, когда специфический низкомолекулярный связывающий DD лиганд связывается с DD, прикрепленный представляющий интерес белок стабилизируется и обеспечивается функция белка.

[0007] Технология DD формирует основу нового класса клеточной и генной терапии, которая может обеспечивать настраиваемое и временное регулирование экспрессии и функции генов, расширяя спектр белковых терапевтических средств, которые можно безопасно и эффективно включать в методы клеточной и генной терапии.

#### **Сущность настоящего изобретения**

[0008] В настоящем раскрытии представлены новые белковые домены, полученные из карбоангидразы 2 (CA2) человека, демонстрирующие стабильность, зависящую от малых молекул. Такие белковые домены называются доменами дестабилизации (DD). В отсутствие своего связывающего лиганда DD дестабилизируется и вызывает разложение слитого с DD груза (например, представляющего интерес белка (POI), тогда как в присутствии своего связывающего лиганда слитые DD и груз могут быть стабильными, и их стабильность зависит от дозы.

[0009] В данном документе представлены системы биосхемы, содержащие по меньшей мере один эффекторный модуль. Эффекторный модуль может содержать (a) элемент ответа на стимулы (SRE), который может содержать целиком или частично карбоангидразу 2 человека, такую как, но без ограничения (CA2; SEQ ID NO 5810), и (b) по меньшей мере один груз, причем указанный по меньшей мере один груз прикреплен, присоединен или связан с указанным SRE. Грузом может быть целый CD40L или часть CD40L.

[0010] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлен элемент ответа на стимулы (SRE), который может содержать домен дестабилизации (DD), полученный из карбоангидразы 2 человека (CA2; SEQ ID NO 5810), целиком или частично. В одном варианте осуществления DD может содержать целый CA2 (SEQ ID NO 5810). В другом варианте осуществления DD может содержать аминокислоты 2-260 CA2, например, но без ограничения, аминокислоты 2-260 SEQ ID NO 5810.

[0011] В одном аспекте в настоящем раскрытии представлен полипептид, содержащий эффекторный модуль, причем указанный эффекторный модуль содержит: i) элемент ответа на стимулы (SRE), причем SRE содержит реагирующий на лекарственное средство домен (DRD), причем указанный DRD содержит карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO 5810) или ее область и дополнительно содержит одну или несколько мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 5810; и ii) по меньшей мере один груз, который функционально связан с SRE, причем: (a) груз содержит CD40L (SEQ ID NO 6) или его часть; или (b) груз содержит CD40L (SEQ ID NO 6) или его часть, содержащую одну или несколько мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 6.

[0012] В одном варианте осуществления DRD содержит мутацию H122Y в аминокислоте в позиции 122 (H122) SEQ ID NO 5810. В другом варианте осуществления DRD дополнительно содержит: (i) мутацию R27L в аминокислоте в позиции 27 (R27) SEQ ID NO 5810; (ii) мутацию T87I в аминокислоте в позиции 87 (T87) SEQ ID NO 5810; (iii) мутацию N252D в аминокислоте в позиции 252 (N252) SEQ ID NO 5810; или (iv)

комбинацию (i) (ii) и/или (iii).

[0013] В одном варианте осуществления DRD содержит мутацию E106D в аминокислоте в позиции 106 (E106) SEQ ID NO 5810. В одном варианте осуществления DRD содержит мутацию W208S в аминокислоте в позиции 208 (W208) SEQ ID NO 5810. В одном варианте осуществления DRD содержит мутацию E106D или мутацию W208S и дополнительно содержит мутацию C205S в аминокислоте в позиции 205 (C205) SEQ ID NO 5810.

[0014] В одном варианте осуществления DRD содержит мутацию I59N в аминокислоте в позиции 59 (I59) SEQ ID NO 5810. В другом варианте осуществления DRD дополнительно содержит мутацию G102R в аминокислоте в позиции 102 (G102) SEQ ID NO 5810.

[0015] В одном варианте осуществления DRD содержит мутацию L156H в аминокислоте в позиции 156 (L156) SEQ ID NO 5810. В другом варианте осуществления DRD дополнительно содержит: (i) мутацию W4Y в аминокислоте в позиции 4 (W4) SEQ ID NO 5810; (ii) мутацию F225L в аминокислоте в позиции 225 (F225) SEQ ID NO 5810; (iii) делецию аминокислот в позициях 257-260 SEQ ID NO 5810; (iv) делецию аминокислот в позициях 1-5 SEQ ID NO 5810; или (v) делецию аминокислот G234, E235 и P236 SEQ ID NO 5810. В другом варианте осуществления DRD содержит четыре мутации по сравнению с SEQ ID NO 5810, причем указанные мутации соответствуют: (i) L156H, S172C, F178Y и E186D; или (ii) D70N, D74N, D100N и L156H.

[0016] В одном варианте осуществления DRD содержит первую мутацию и вторую мутацию по сравнению с SEQ ID NO 5810, причем: (i) первая мутация представляет собой мутацию S73N в аминокислоте в позиции 73 (S73) SEQ ID NO 5810; а (ii) вторая мутация представляет собой замену F или Y в аминокислотной позиции 89 (R89) SEQ ID NO 5810.

[0017] В одном варианте осуществления DRD содержит замену N или F в аминокислотной позиции 56 (S56) SEQ ID NO 5810. В одном варианте осуществления DRD содержит две замены по сравнению с SEQ ID NO 5810, которые соответствуют S56F и D71S.

[0018] В одном варианте осуществления DRD содержит мутацию S56N в аминокислоте в позиции 56 (S56) SEQ ID NO 5810.

[0019] В одном варианте осуществления DRD содержит одну или несколько замен по сравнению с SEQ ID NO 5810, причем по меньшей мере одна замена представляет собой замену D или N в аминокислотной позиции 63 (G63) SEQ ID NO 5810, и при этом одна или несколько замен соответствуют: G63D; G63D и M240L; G63D, E69V и N231I; или T55K, G63N и Q248N.

[0020] В одном варианте осуществления DRD содержит две или более замены по сравнению с SEQ ID NO 5810, причем одна, две или более замены представляют собой замену L или K в аминокислотной позиции 71 (D71) SEQ ID NO 5810, и при этом указанные две или более замены соответствуют: D71L и T87N; D71L и L250R; D71L, T87N и L250R; или D71K и T192F.

[0021] В одном варианте осуществления DRD содержит две или более замены по сравнению с SEQ ID NO 5810, причем по меньшей мере одной, двумя или более заменами является: (i) замена F в аминокислотной позиции 241 (V241) SEQ ID NO 5810; или (ii) замена F или L в аминокислотной позиции 249 (P249) SEQ ID NO 5810; и при этом две или более замены соответствуют: D72F и V241F; D72F и P249L; D72F и P249F; D72F, V241F и P249L; A77I и P249F; или V241F и P249L.

[0022] В одном варианте осуществления DRD содержит одну или несколько замен по сравнению с SEQ ID NO 5810, выбранных из Y51T, L183S, Y193I, L197P и комбинации V134F и L228F.

[0023] В некоторых вариантах осуществления DRD содержит область CA2 человека, соответствующую аминокислотам 2-260 SEQ ID NO 5810.

[0024] В некоторых вариантах осуществления DRD содержит область CA2 человека, соответствующую полноразмерному CA2, содержащему аминокислоты 1-260 SEQ ID NO 5810.

[0025] В некоторых вариантах осуществления SRE реагирует на один или несколько стимулов. В некоторых вариантах осуществления стимул представляет собой малую молекулу, причем малую молекулу выбирают из ацетазоламида, целекоксиба, вальдекоксиба, рофекоксиба, метазоламида, дорзоламида, бринзоламида, диклофенамида, этосоламида, зонисамида, дансиламида или дихлорфенамида. В некоторых вариантах осуществления малой молекулой является ацетазоламид.

[0026] В некоторых вариантах осуществления грузом является CD40L (SEQ ID NO 6) или его часть, содержащая по меньшей мере одну мутацию.

[0027] В некоторых вариантах осуществления грузом является CD40L (SEQ ID NO 6) или его часть, содержащая по меньшей мере две мутации, причем по меньшей мере две мутации выбирают из: (i) H224G и G226F; (ii) H224G и G226H; (iii) Y172G и G226F; (iv) H125 и G227; (v) Y120G, H224G и G226W; и (vi) S110G, F111G, E112S, M113G, Q114G и K115S.

[0028] В некоторых вариантах осуществления грузом является CD40L (SEQ ID NO: 6).

[0029] В некоторых вариантах осуществления DRD расположен на N-конце груза.

[0030] В некоторых вариантах осуществления DRD отделен от груза линкером.

[0031] В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль дополнительно содержит сигнальный пептид, направляющий и/или проникающий пептид, линкер, белковую метку и/или сайт расщепления белка.

[0032] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлена композиция, содержащая полипептид, описанный в данном документе.

[0033] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлена композиция, содержащая эффекторный модуль, описанный в данном документе.

[0034] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлен полинуклеотид, кодирующий эффекторный модуль, описанный в данном документе,

причем полинуклеотид представляет собой молекулу ДНК или молекулу РНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является моноцистронным, бицистронным или мультицистронным.

[0035] В одном варианте осуществления полинуклеотид является бицистронным и кодирует второй полипептид, причем указанный второй полипептид содержит иммунотерапевтическое средство, выбранное из антитела и его фрагментов и вариантов, Т-клеточного рецептора (TCR) и его вариантов, химерного антигенного рецептора (CAR), химерного рецептора-переключателя, ингибитора коингибиторного рецептора или лиганда, агониста костимулирующего рецептора и лиганда, цитокина, хемокина, цитокинового рецептора, хемокинового рецептора, продукта слияния цитокиновых рецепторов, растворимого фактора роста, метаболического фактора, гена самоубийства или хомингового рецептора. В одном варианте осуществления полинуклеотид является мультицистронным и кодирует по меньшей мере два дополнительных полипептида, причем указанные по меньшей мере два дополнительных полипептида содержат иммунотерапевтическое средство, выбранное из антитела и его фрагментов и вариантов, Т-клеточного рецептора (TCR) и его вариантов, химерного антигенного рецептора (CAR), химерного рецептора-переключателя, ингибитора коингибиторного рецептора или лиганда, агониста костимулирующего рецептора и лиганда, цитокина, хемокина, цитокинового рецептора, хемокинового рецептора, продукта слияния цитокиновых рецепторов, растворимого фактора роста, метаболического фактора, гена самоубийства или хомингового рецептора. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид или по меньшей мере два дополнительных полипептида функционально связаны со вторым SRE. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид или по меньшей мере два дополнительных полипептида функционально не связаны ни с каким SRE.

[0036] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлен вектор, содержащий любой из полинуклеотидов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор или плазмиду. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор, а вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, гамма-ретровирусный вектор, рекомбинантный AAV вектор, аденовирусный вектор или онколитический вирусный вектор.

[0037] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлена клетка, трансдуцированная или трансфицированная вектором, описанным в данном документе.

[0038] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлена клетка, содержащая по меньшей мере одно из: эффекторного модуля, полинуклеотида или вектора, описанного в данном документе.

[0039] В некоторых вариантах осуществления клеткой согласно настоящему раскрытию является иммунная клетка для адоптивного переноса клеток (ACT); или CD8+ Т-клетка, CD4+ Т-клетка, хелперная Т-клетка, натуральная клетка-киллер (NK), NKT-

клетка, цитотоксический Т-лимфоцит (CTL), инфильтрирующий опухоль лимфоцит (TIL), Т-клетка памяти, регуляторная Т-клетка (Treg), цитокин-индуцированная киллерная клетка (CIK), дендритная клетка, лимфокин-активированные клетки-киллеры (LAK), эмбриональные стволовые клетки человека, мезенхимальная стволовая клетка, гемопоэтическая стволовая клетка или их смесь. В некоторых вариантах осуществления указанную клетку модифицируют для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR) или антигенспецифического Т-клеточного рецептора (TCR). В одном варианте осуществления указанной клеткой является Т-клетка или НК-клетка.

[0040] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлена клетка, которая экспрессирует эффекторный модуль и/или содержит полинуклеотид, и/или инфицирована, или трансфицирована вектором, описанным в данном документе, причем указанной клеткой является Т-клетка, модифицированная для экспрессии антигенспецифического Т-клеточного рецептора (TCR) или антигенспецифического химерного антигенного рецептора (CAR).

[0041] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, полинуклеотиды, вектор или клетку, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

[0042] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлен способ получения модифицированной клетки, причем указанный способ включает введение в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотид, описанный в данном документе.

[0043] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлен способ модулирования экспрессии, функции и/или уровня груза в клетке, описанной в данном документе, причем указанный способ включает введение в клетку стимула, причем SRE реагирует на стимул, и при этом экспрессия, функция и/или уровень по меньшей мере одного груза модулируется в ответ на стимул.

[0044] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлен способ лечения заболевания и/или индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, причем указанный способ включает: (а) введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из композиций, полипептидов, полинуклеотидов, векторов или клеток, описанных в данном документе, и введение субъекту терапевтически эффективного количества стимула, причем SRE реагирует на стимул, и при этом экспрессия по меньшей мере одного груза модулируется в ответ на стимул, чтобы тем самым лечить заболевание и/или индуцировать иммунный ответ. В одном варианте осуществления заболеванием является рак. В некоторых вариантах осуществления стимул выбирают из ацетазоламида, целекоксиба, вальдекоксиба, рофекоксиба, метазоламида, дорзоламида, бринзоламида, диклофенамида, этоксоламида, зонисамида, дансиламида или дихлорфенамида.

[0045] В другом аспекте настоящего раскрытия представлена сконструированная

клетка, содержащая: (i) первый полинуклеотид, который кодирует первый полипептид, причем указанный первый полипептид содержит: (а) первый элемент ответа на стимулы (SRE), причем первый SRE содержит реагирующий на лекарственное средство домен (DRD), причем указанный DRD содержит карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO 5810) или ее область и дополнительно содержит одну или несколько мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 5810; и (b) первый груз, который функционально связан с первым SRE, причем: (I) первый груз содержит CD40L (SEQ ID NO 6) или его часть; или (II) первый груз содержит CD40L (SEQ ID NO 6) или его часть, содержащую одну или несколько мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 6; и (ii) второй полинуклеотид, который кодирует один или несколько дополнительных полипептидов, причем указанный один или несколько дополнительных полипептидов содержат иммунотерапевтическое средство, выбранное из группы, состоящей из: Т-клеточного рецептора (TCR) и его вариантов или химерного антигенного рецептора (CAR); причем DRD и первый груз дестабилизированы в отсутствие первого стимула, и при этом DRD и первый груз стабилизированы в присутствии первого стимула, и один или несколько дополнительных полипептидов экспрессируются независимо от первого груза.

[0046] В некоторых вариантах осуществления первым грузом является (а) CD40L (SEQ ID NO 6) или его часть, содержащая по меньшей мере одну мутацию; или (b) CD40L (SEQ ID NO 6) или его часть, содержащая по меньшей мере две мутации, причем необязательно по меньшей мере две мутации выбирают из: (i) H224G и G226F; (ii) H224G и G226H; (iii) Y 172G и G226F; (IV) H125 и G227; (v) Y120G, H224G и G226W; и (vi) S110G, F111G, E112S, M113G, Q114G и K115S.

[0047] В некоторых вариантах осуществления один или несколько дополнительных полипептидов связаны со вторым SRE, содержащим второй DRD, причем второй DRD тот же самый или отличается от DRD в первом SRE, второй DRD и один или несколько дополнительных полипептидов дестабилизированы в отсутствие первого или второго стимула, и при этом второй DRD и один или несколько дополнительных полипептидов стабилизированы в присутствии первого или второго стимула.

[0048] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлен DD, содержащий целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO 5810) или ее область и дополнительно содержащий мутацию по сравнению с SEQ ID NO 5810, выбранную из A115L, A116Q, A116V, A133L, A133T, A141P, A152D, A152L, A152R, A173C, A173G, A173L, A173T, A23P, A247L, A247S, A257L, A257S, A38P, A38V, A54Q, A54V, A54X, A65L, A65N, A65V, A77I, A77P, A77Q, C205M, C205R, C205V, C205W, C205Y, D101G, D101M, D110I, D129I, D138G, D138M, D138N, D161\*, D161M, D161V, D164G, D164I, D174\*, D174T, D179E, D179I, D179R, D189G, D189I, D19T, D19V, D242G, D242T, D32T, D34T, D41T, D52I, D52L, D71F, D71G, D71K, D71M, D71S, D71Y, D72I, D72S, D72T, D72X, D75T, D75V, D85M, E106D, E106G, E106S, E117\*, E117N, E14N, E186\*, E186N, E204A, E204D, E204G, E204N, E213\*, E213G, E213N, E220K, E220R, E220S, E233D, E233G, E233R,

E235\*, E235G, E235N, E237K, E237R, E238\*, E238N, E238R, E26S, E69D, E69K, E69S, F130L, F146V, F175I, F175L, F175S, F178L, F178S, F20L, F20S, F225I, F225L, F225S, F225Y, F230I, F230L, F230S, F259L, F259S, F66S, F70I, F70L, F95Y, G102D, G104R, G104V, G128R, G12D, G12E, G131E, G131R, G131W, G139D, G144D, G144V, G150A, G150S, G150W, G155A, G155C, G155D, G155S, G170A, G170D, G182A, G182W, G195A, G195R, G232R, G232W, G234L, G234V, G25E, G63D, G63V, G81E, G81V, G82D, G86A, G86D, G98V, H107I, H107Q, H119T, H119Y, H122T, H122Y, H15L, H15T, H15Y, H17D, H17I, H36I, H36Q, H64M, H94T, H96T, I145F, I145M, I166H, I166L, I209D, I209L, I215H, I215S, I22L, I255N, I255S, I33S, I59F, I59N, I59S, I91F, K111E, K111N, K112R, K113I, K113N, K126N, K132E, K132R, K148E, K148R, K153\*, K153N, K158E, K158N, K167\*, K169N, K169R, K171Q, K171R, K18R, K212N, K212Q, K212R, K212W, K224E, K224N, K227\*, K227N, K24R, K251E, K251R, K256Q, K260F, K260L, K260Q, K39S, K45N, K45S, K80M, K80R, L118F, L120W, L140V, L140W, L143\*, L147\*, L147F, L156F, L156H, L156P, L156Q, L163A, L163W, L183P, L183S, L184F, L184P, L188P, L188W, L197\*, L197M, L197P, L197R, L197T, L202F, L202H, L202I, L202P, L202R, L202S, L203P, L203S, L203W, L211\*, L211A, L211S, L223\*, L223I, L223V, L228F, L228H, L228T, L239\*, L239F, L239T, L250\*, L250P, L250T, L44\*, L44M, L47C, L47V, L57\*, L57X, L60S, L79F, L79S, L84W, L90\*, L90V, M240D, M240L, M240R, M240W, N11D, N11K, N124T, N177\*, N177T, N229\*, N229T, N231D, N231F, N231K, N231L, N231M, N231Q, N231T, N243Q, N243T, N252E, N252T, N61R, N61T, N61Y, N62K, N62M, N67D, N67T, P137L, P13A, P13H, P13L, P13S, P154L, P154R, P154T, P180L, P180S, P185L, P185S, P185V, P194Q, P200A, P200L, P200S, P200T, P201A, P201L, P201R, P201S, P214T, P236L, P236T, P246L, P246Q, P249A, P249F, P249H, P249I, P249X, P30L, P30S, P42L, P83A, Q103K, Q135S, Q136N, Q157R, Q157S, Q221A, Q221R, Q248F, Q248L, Q248S, Q254A, Q254K, Q28S, Q53H, Q53K, Q53N, Q74R, Q92H, Q92S, R181H, R181S, R181V, R226H, R226P, R226V, R245A, R253G, R253Q, R27A, R58G, R89D, R89F, R89I, R89X, R89Y, S105L, S105Q, S151A, S151I, S151Q, S165F, S165P, S172E, S172V, S187I, S187P, S196H, S196L, S216A, S216Q, S218A, S218Q, S219A, S219Q, S258F, S258P, S29C, S29P, S43P, S43T, S48L, S50P, S56F, S56N, S56P, S56X, S73L, S73N, S73X, S99H, T108L, T125I, T125P, T168K, T168N, T168Q, T176H, T176L, T192D, T192F, T192I, T192N, T192P, T192X, T198D, T198I, T198P, T199A, T199H, T199P, T207D, T207I, T207P, T207S, T35I, T35L, T37Q, T55L, T87L, V109M, V109W, V121F, V134C, V134F, V142F, V149G, V149L, V159L, V159S, V160C, V160L, V162A, V162C, V206\*, V206C, V206M, V210C, V217L, V217R, V217S, V222A, V222C, V222G, V241G, V241W, V241X, V31L, V49F, V68L, V68W, V78C, W123G, W123R, W16G, W191\*, W191G, W191L, W208G, W208L, W208S, W244\*, W244G, W244L, W97C, W97G, Y114H, Y114M, Y127M, Y190\*, Y190L, Y190T, Y193C, Y193F, Y193I, Y193L, Y193T, Y193V, Y193X, Y40M, Y51F, Y51M, Y51T, Y51X, Y88T, K9N и S29A. В рамках настоящего изобретения «\*» обозначает трансляцию стоп-кодона, а «X» обозначает любую аминокислоту.

[0049] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлен DD, содержащий целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO 5810) или ее область

и дополнительно содержащий мутацию по сравнению с SEQ ID NO 5810, выбранную из E106D, G63D, H122Y, I59N, L156H, L183S, L197P, S56F, S56N, W208S, Y193I и Y51T.

[0050] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлен DD, содержащий целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO 5810) или ее область и дополнительно содержащий две или более мутации по сравнению с SEQ ID NO 5810. В некоторых вариантах осуществления DD может содержать CA2 (aa 2-260 WT, R27L, H122Y), CA2 (aa 2-260 WT, T87I, H122Y), CA2 (aa 2-260 WT, H122Y, N252D), CA2 (aa 2-260 WT, D72F, V241F), CA2 (aa 2-260 WT, V241F, P249L), CA2 (aa 2-260 WT, D72F, P249L), CA2 (aa 2-260 WT, D71L, L250R), CA2 (aa 2-260 WT, D72F, P249F), CA2 (aa 2-260 WT, T55K, G63N, Q248N), CA2 (aa 2-260 WT, L156H, A257del, S258del, F259del, K260del), CA2 (aa 2-260 WT, L156H, S2del, H3del, H4del, W5del), CA2 (aa 2-260 WT, W4Y, L156H), CA2 (aa 2-260 WT, L156H, G234del, E235del, P236del), CA2 (aa 2-260 WT, L156H, F225L), CA2 (aa 2-260 WT, D70N, D74N, D100N, L156H) (CA2 (aa 2-260 WT, I59N, G102R), CA2 (aa 2-260 WT, G63D, E69V, N231I), CA2 (aa 2-260 WT, R27L, T87I, H122Y, N252D), CA2 (aa 2-260 WT, D72F, V241F, P249L), CA2 (aa 2-260 WT, D71L, T87N, L250R), CA2 (aa 2-260 WT, L156H, S172C, F178Y, E186D), CA2 (aa 2-260 WT, D71F, N231F), CA2 (aa 2-260 WT, A77I, P249F), CA2 (aa 2-260 WT, D71K, P249H), CA2 (aa 2-260 WT, D72F, P249H), CA2 (aa 2-260 WT, Q53N, N61Y), CA2 (aa 2-260 WT, E106D, C205S), CA2 (aa 2-260 WT, C205S, W208S), CA2 (aa 2-260 WT, S73N, R89Y), CA2 (aa 2-260 WT, D71K, T192F), CA2 (aa 2-260 WT, Y193L, K260L), CA2 (aa 2-260 WT, D71F, V241F, P249L), CA2 (aa 2-260 WT, L147F, Q248F), CA2 (aa 2-260 WT, D52I, S258P), CA2 (aa 2-260 WT, D72S, T192N), CA2 (aa 2-260 WT, D179E, T192I), CA2 (aa 2-260 WT, S56N, Q103K), CA2 (aa 2-260 WT, D71Y, Q248L), CA2 (aa 2-260 WT, S73N, R89F), CA2 (aa 2-260 WT, D71K, N231L, E235G, L239F), CA2 (aa 2-260 WT, D72F, P249I), CA2 (aa 2-260 WT, D72X, V241X, P249X), CA2 (aa 2-260 WT, A54X, S56X, L57X, T192X), CA2 (aa 2-260 WT, Y193V, K260F), CA2 (aa 2-260 WT, G63D, M240L), CA2 (aa 2-260 WT, V134F, L228F), CA2 (aa 2-260 WT, D71G, N231K), CA2 (aa 2-260 WT, S56F, D71S), CA2 (aa 2-260 WT, D52L, G128R, Q248F), CA2 (aa 2-260 WT, S73X, R89X), CA2 (aa 2-260 WT, Y51X, D72X, V241X, P249X), CA2 (aa 2-260 WT, D72I, W97C), CA2 (aa 2-260 WT, D71K, T192F, N231F), CA2 (aa 2-260 WT, H36Q, S43T, Y51F, N67D, G131W, R226H), CA2 (aa 2-260 WT, F70I, F146V), CA2 (aa 2-260 WT, K45N, V68L, H119Y, K169R, D179E), CA2 (aa 2-260 WT, H15L, A54V, K111E, E220K, F225I), CA2 (aa 2-260 WT, P13S, P83A, D101G, K111N, F230I), CA2 (aa 2-260 WT, G63D, W123R, E220K), CA2 (aa 2-260 WT, N11D, E69K, G86D, V109M, K113I, T125I, D138G, G155S), CA2 (aa 2-260 WT, I59N, G102R, A173T), CA2 (aa 2-260 WT, L79F, P180S), CA2 (aa 2-260 WT, A77P, G102R, D138N), CA2 (aa 2-260 WT, F20L, K45N, G63D, E69V, N231I), CA2 (aa 2-260 WT, T199N, L202P, L228F), CA2 (aa 2-260 WT, K9N, H122Y, T168K), CA2 (aa 2-260 WT, Q53H, L90V, Q92H, G131E), CA2 (aa 2-260 WT, L44M, L47V, N62K, E69D), CA2 (aa 2-260 WT, D75V, K169N, F259L), CA2 (aa 2-260 WT, T207S, V222A, N231D), CA2 (aa 2-260 WT, I59F, V206M, G232R), CA2 (aa 2-260 WT, P13A, A133T), CA2 (aa 2-260 WT, I59N, R89I), CA2 (aa 2-260 WT, A65N, G86D, G131R, G155D, K158N, V162A, G170D, P236L), CA2 (aa 2-260 WT, G12R, H15Y,

D19V), CA2 (aa 2-260 WT, A65V, F95Y, E106G, H107Q, I145M, F175I), CA2 (aa 2-260 WT, G63D, E69V, N231I), CA2 (aa 2-260 WT, S29A, C205S) и/или CA2 (aa 2-260 WT, S29C, C205S). В рамках настоящего изобретения «X» обозначает любую аминокислоту.

[0051] В некоторых вариантах осуществления DD может содержать CA2 (aa 2-260 WT, R27L, H122Y), CA2 (aa 2-260 WT, T87I, H122Y), CA2 (aa 2-260 WT, H122Y, N252D), CA2 (aa 2-260 WT, D72F, V241F), CA2 (aa 2-260 WT, V241F, P249L), CA2 (aa 2-260 WT, D72F, P249L), CA2 (aa 2-260 WT, D71L, L250R), CA2 (aa 2-260 WT, D72F, P249F), CA2 (aa 2-260 WT, T55K, G63N, Q248N), CA2 (aa 2-260 WT, L156H, A257del, S258del, F259del, K260del), CA2 (aa 2-260 WT, L156H, S2del, H3del, H4del, W5del), CA2 (aa 2-260 WT, W4Y, L156H), CA2 (aa 2-260 WT, L156H, G234del, E235del, P236del), CA2 (aa 2-260 WT, L156H, F225L), CA2 (aa 2-260 WT, D70N, D74N, D100N, L156H), (CA2 (aa 2-260 WT, I59N, G102R), CA2 (aa 2-260 WT, G63D, E69V, N231I), CA2 (aa 2-260 WT, R27L, T87I, H122Y, N252D), CA2 (aa 2-260 WT, D72F, V241F, P249L), CA2 (aa 2-260 WT, D71L, T87N, L250R), CA2 (aa 2-260 WT, L156H, S172C, F178Y, E186D), CA2 (aa 2-260 WT, A77I, P249F), CA2 (aa 2-260 WT, E106D, C205S), CA2 (aa 2-260 WT, C205S, W208S), CA2 (aa 2-260 WT, S73N, R89Y), CA2 (aa 2-260 WT, D71K, T192F), CA2 (aa 2-260 WT, S73N, R89F), CA2 (aa 2-260 WT, G63D, M240L), CA2 (aa 2-260 WT, V134F, L228F) и/или CA2 (aa 2-260 WT, S56F, D71S).

[0052] Системы биосхемы, описанные в данном документе, могут отвечать за один или несколько стимулов. Такими стимулами могут быть малые молекулы, например, но без ограничения, ацетазоламид, целекоксиб, вальдекоксиб, рофекоксиб, метазоламид, дорзоламид, бринзоламид, диклофенамид, этоксоламид, зонисамид, дансиламид и дихлорфенамид. В одном варианте осуществления малой молекулой может быть ацетазоламид. В одном варианте осуществления стимулом может быть целекоксиб.

[0053] В некоторых вариантах осуществления грузом может быть целый CD40L или его часть. В одном варианте осуществления грузом может быть целый CD40L (SEQ ID NO 6). В некоторых вариантах осуществления грузом может быть часть CD40L, содержащая: (l) sCD40L (113-261 WT) (SEQ ID NO 5800); (n) CD40L (aa 14-261 WT) (SEQ ID NO,5802); или (m) CD40L (aa 14-261 WT (S110-G116) del) (SEQ ID NO 5804).

[0054] В некоторых вариантах осуществления грузом может быть CD40L с одной или несколькими мутациями по сравнению с (i) sCD40L (113-261 WT) (SEQ ID NO 5800); (n) CD40L (aa 14-261 WT) (SEQ ID NO,5802); или (m) CD40L (aa 14-261 WT (S110-G116) del) (SEQ ID NO 5804).

[0055] В некоторых вариантах осуществления грузом может быть CD40L с одной или несколькими мутациями по сравнению с CD40L дикого типа (аминокислотная последовательность, представленная в виде SEQ ID NO 6). В некоторых аспектах CD40L содержит по меньшей мере одну мутацию, например, но без ограничения, S110G, F111G, E112S, M113G, Q114G, K115S, Y120G, H125G, Y172G, H224G, G226F, G226H, G226W и G227F. Груз CD40L может содержать две мутации, и мутациями могут быть, но без ограничения, H224G и G226F, H224G и G226H, Y172G и G226F или H125 и G227. Груз CD40L может содержать три мутации, и мутациями могут быть, но без ограничения,

Y120G, H224G и G226W. Груз CD40L может содержать четыре мутации. Груз CD40L может содержать пять мутаций. Груз CD40L может содержать шесть мутаций, и мутациями могут быть, но без ограничения, S110G, F111G, E112S, M113G, Q114G и K115S.

[0056] Также в данном документе представлены полинуклеотиды, кодирующие SRE, системы биосхемы, полипептиды и/или композиции, описанные в данном документе, а также векторы, содержащие полинуклеотиды, и клетки, содержащие полинуклеотиды. В настоящем раскрытии также описаны фармацевтические композиции, которые содержат компоненты систем биосхемы CA2, и/или композиции, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

[0057] В настоящем раскрытии представлены подходящие примеры и варианты осуществления, в которых описано применение различных композиций, систем биосхемы и их компонентов для лечения заболевания у нуждающегося в этом человека. Например, способ лечения заболевания и/или индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта включает стадии (а) введения субъекту терапевтически эффективного количества композиции (содержащей: эффекторный модуль, причем эффекторный модуль содержит: i) элемент ответа на стимулы (SRE), причем SRE содержит реагирующий на лекарственное средство домен (DRD), причем указанный DRD содержит карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO 5810) или ее область и дополнительно содержит одну или несколько мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 5810; и ii) по меньшей мере один груз, который функционально связан с SRE, причем (а) груз содержит CD40L (SEQ ID NO 6) или его часть; или (b) груз содержит CD40L (SEQ ID NO 6) или его часть, содержащую одну или несколько мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 6), или полинуклеотид, который кодирует компоненты композиции, или вектор, который содержит такие полинуклеотиды, которые кодируют компоненты композиции, или клетку, которая содержит такой вектор, который способен синтезировать компоненты композиции, описанной в данном документе; и (b) введения субъекту терапевтически эффективного количества стимула, например, ацетазоламида, целекоксиба, вальдекоксиба, рофекоксиба, метазоламида, дорзоламида, бринзоламида, диклофенамида, этоксоламида, зонисамида, дансиламида или дихлорфенамида, причем SRE реагирует на стимул, и при этом экспрессия по меньшей мере одного груза модулируется в ответ на стимул, чтобы тем самым лечить заболевание и/или индуцировать иммунный ответ.

[0058] Иллюстративные заболевания, которые можно лечить и/или предотвращать с использованием систем биосхем и сконструированных клеток в данном документе, могут включать в себя: иммунные заболевания, аутоиммунные заболевания, инфекционные заболевания и гиперпролиферативные заболевания, например, рак.

#### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

[0059] Детали одного или нескольких вариантов осуществления настоящего раскрытия изложены в сопровождении приведенного ниже описания. Хотя при применении или тестировании настоящего раскрытия можно использовать любые материалы и способы,

аналогичные или эквивалентные тем, что описаны в данном документе, далее описаны предпочтительными материалы и способы. Другие признаки, цели и преимущества настоящего раскрытия будут очевидны из описания. В описании формы единственного числа также включают в себя множественное число, если из контекста не следует иное. Если не утверждается иное, все технические и научные термины, используемым в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понятно рядовому специалисту в области, к которой относится настоящее раскрытие. В случае конфликта приоритетным является настоящее описание.

## I. КОМПОЗИЦИИ

### Биосхемы или Системы биосхемы

[0060] Согласно настоящему раскрытию представлены системы биосхемы, которые содержат в своей основе по меньшей мере один эффекторный модуль. Такой эффекторный модуль (модули) независимо имеют связанный или объединенный с ними один или несколько элементов ответа на стимулы (SRE). Обычно элемент ответа на стимулы (SRE) может быть функционально связан с грузом, которым может быть любой представляющий интерес белок (POI) (например, иммунотерапевтическое средство), с образованием эффекторного модуля. SRE при активации конкретным стимулом, например, малой молекулой, может выдавать сигнал или действие, регулирующее транскрипцию и/или уровни белка связанного груза либо вверх, либо вниз, сохраняя стабилизирующий сигнал или дестабилизирующий сигнал или любые других типы регуляции. Более подробное описание системы биосхемы содержится в совместной предварительной заявке на патент США № 62/320864, поданной 11 апреля 2016 года, 62/466596, поданной 3 марта 2017 года, и международной публикации WO2017/180587 (содержание каждой из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки). В соответствии с настоящим раскрытием представлены системы биосхемы, эффекторные модули, SRE и компоненты, которые регулируют уровни экспрессии и активность любых средств, используемых для иммунотерапии.

[0061] В рамках настоящего изобретения «биосхема» или «система биосхемы» определена как схема внутри или применяемая в биологических системах, содержащая стимул и по меньшей мере один эффекторный модуль, реагирующий на стимул, когда ответ на стимул создает по меньшей мере один сигнал или действие внутри, между, в виде индикатора биологической системы или в ней. Под биологическими системами обычно понимают любую клетку, ткань, орган, систему органов или организм, будь то животное, растение, гриб, бактерия или вирус. Также понятно, что биосхемами могут быть искусственные схемы, которые задействуют стимулы или эффекторные модули, описанные в настоящем раскрытии, и воздействуют на сигналы или действия в бесклеточных средах, таких как диагностические, репортерные системы, устройства, анализы или наборы. искусственные схемы могут быть связаны с одним или несколькими электронными, магнитными или радиоактивными компонентами, или частями.

### Эффекторные модули

[0062] Биосхемы раскрытия содержат по меньшей мере один эффекторный модуль. В рамках настоящего изобретения «эффекторный модуль» представляет собой однокомпонентную или многокомпонентную конструкцию или комплекс, содержащий по меньшей мере (а) один или несколько элементов ответа на стимулы (SRE), и (b) один или несколько грузов (например, представляющих интерес белков (POI)).

[0063] Эффекторные модули можно сконструировать так, чтобы они содержали один или несколько грузов, один или несколько SRE, один или несколько сайтов расщепления, одну или несколько сигнальных последовательностей и одну или несколько дополнительных функций, включая присутствие или отсутствия одного или нескольких линкеров. Типичные варианты осуществления эффекторного модуля согласно настоящему раскрытию проиллюстрированы на фиг. 2-6 в международной публикации № WO2017/180587, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки. Биосхемы и компоненты с использованием таких эффекторных молекул представлены на фиг. 7-12 в международной публикации № WO2017/180587, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[0064] Как показано на фиг. 2 в международной публикации № WO2017/180587 проиллюстрированы типичные варианты осуществления эффекторного модуля, содержащего один груз, то есть одно иммунотерапевтическое средство. Каждый компонент эффекторного модуля может быть локализован или расположен в разных положениях без сайта расщепления (A-F) или с ним (G-Z и AA-DD). между каждым компонентом эффекторного модуля можно вставить необязательный линкер.

[0065] На фиг. 3-6 в международной публикации № WO2017/180587 представлены типичные варианты осуществления эффекторного модуля, содержащего два груза, то есть два иммунотерапевтических средства. В некоторых аспектах при регуляции одного и того же SRE (например, одного и того же DD) в эффекторный модуль может быть включено более двух иммунотерапевтических средств (грузов). Два или более средства могут быть либо прямо связаны друг с другом, либо могут быть отделенными. SRE может быть расположен на N-конце конструкции или C-конце конструкции или во внутреннем местоположении.

[0066] Комбинация регуляторных Т-клеток, клеток-супрессоров миелоидного происхождения (MDSC) и обширных стромальных сетей в микросреде опухоли (TME) может ослаблять противоопухолевый иммунный ответ путем предотвращения инфильтрации и/или активации Т-клеток с помощью современных иммунотерапевтических методов (см. Ma et al. A CD40 agonist and PD-1 antagonist antibody reprogram the microenvironment of non-immunogenic tumors to allow T cell-mediated anticancer activity. *Cancer Immunol Res* Jan. 14, 2019; doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0061; содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки). Современные методы лечения CAR Т являются не эффективными, поскольку терапевтические средства отличаются иммуносупрессией, ускользанием от опухолевого антигена, недостаточной экспансией CAR Т и токсичностью для здоровых тканей. Настоящее раскрытие направлено

на решение этих проблем с использованием эффекторного модуля с CD40L в качестве иммунотерапевтического средства, слитого с SRE, описанным в данном документе. CD40L может быть не единственным иммунотерапевтическим средством в эффекторном модуле. Эффекторный модуль также может содержать конструкцию CAR. Комбинация CD40L и CAR в качестве иммунотерапевтического средства и SRE может вызывать любое из следующего, отдельно или в комбинации: (1) реполяризации макрофагов CD40+ в микросреде опухоли до провоспалительного состояния, (2) активации дендритных клеток CD40+ для ускорения распространения эпитопа, что может уменьшить ускользание от опухолевого антигена (например, уменьшить потерю антигенов-мишеней CAR) (3) обратную передачу сигналов и выработку цитокинов для усиления зависимого от антигена размножения Т-клеток и (4) регулируемое продуцирование белка из SRE, которое снижает токсичность терапевтического средства для здоровой ткани. В качестве неограничивающего примера эффекторный модуль, содержащий SRE, слитый с CD40L и иммунотерапевтическим средством с CAR, можно использовать для компенсации потери антигенов-мишеней CAR (например, ускользания от антигена), заставляя дендритные клетки привлекать инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), что приводит к размножению группы специфических противоопухолевых Т-клеток. В качестве неограничивающего примера эффекторный модуль, содержащий SRE, слитый с CD40L и иммунотерапевтическим средством с CAR, можно использовать для уменьшения ограничения микросреды (TME) солидных опухолей путем реполяризации связанных с опухолью макрофагов (TAM) из супрессивного в воспалительный фенотип. В качестве неограничивающего примера эффекторный модуль, содержащий SRE, слитый с CD40L и иммунотерапевтическим средством с CAR, можно использовать для увеличения размножения Т-клеток CAR, вызывая зависимое от антигена размножение Т-клеток.

[0067] В некоторых вариантах осуществления биосхемы согласно настоящему раскрытию можно модифицировать для уменьшения их иммуногенности. Иммуногенность является результатом сложной последовательности реакций на вещество, которое расценивается как чужеродное, и может включать в себя выработку нейтрализующих и ненейтрализующих антител, образование иммунных комплексов, активацию комплемента, активацию тучных клеток, воспаление, реакции гиперчувствительности и анафилаксию. Несколько факторов могут способствовать иммуногенности белка, включая, но без ограничения, последовательность белка, путь и частоту введения и популяцию пациентов. В предпочтительном варианте осуществления можно использовать белковую инженерию для уменьшения иммуногенности композиций согласно раскрытию. В некоторых вариантах осуществления модификации для уменьшения иммуногенности могут включать в себя модификации, которые уменьшают связывание процессированных пептидов, происходящих из исходной последовательности, с белками МНС. Например, модификации аминокислот можно конструировать таким образом, чтобы не было или было минимальное количество иммунных эпитопов, которые, как предполагается, связываются с высокой аффинностью с любыми преобладающими аллелями МНС. В данной области известно

несколько методов идентификации эпитопов, связывающих МНС известных белковых последовательностей, и их можно использовать для оценки эпитопов в композициях согласно настоящему раскрытию. Такие способы раскрыты в публикации патентов США № US 20020119492, US 20040230380 и US 20060148009; содержание каждого из которых полностью включено посредством ссылки.

[0068] Эффекторные модули, содержащие их SRE и грузы, могут быть на основе нуклеиновых кислот, на основе белков или их комбинациями. Они могут быть в виде ДНК, рНК, мРНК, белков, белков слияния или любой комбинации изложенного выше.

#### Элемент ответа на стимулы (SRE)

[0069] В рамках настоящего изобретения «элемент ответа на стимулы» (SRE) представляет собой компонент эффекторного модуля, который объединен, присоединен, связан или ассоциирован с одним или несколькими грузами, а в некоторых случаях отвечает за отзывчивую природу эффекторного модуля на один или несколько стимулов. В рамках настоящего изобретения «отзывчивая» природа SRE на стимул может характеризоваться ковалентным или нековалентным взаимодействием, прямым или косвенным связыванием или структурной или химической реакцией на стимул. Кроме того, ответ любого SRE на стимул может зависеть от степени или вида. Ответ может представлять собой частичный ответ. Ответ может представлять собой обратимый ответ. В конечном итоге, ответ может привести к регулируемому сигналу или результату. Такой выходной сигнал может иметь относительный характер по отношению к стимулу, например, производить модулирующий эффект от 1% до 100% или увеличение или уменьшение с коэффициентом, например, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз или более. В некоторых вариантах осуществления SRE представляет собой полипептид, слитый с грузом полипептида.

[0070] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлены способы модулирования экспрессии, функции или уровня белка. В некоторых аспектах модулирование экспрессии, функции или уровня белка относится к модулированию экспрессии, функции или уровня по меньшей мере приблизительно на 20%, например, по меньшей мере приблизительно на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% и 100% или по меньшей мере 20-30%, 20-40%, 20-50%, 20-60%, 20-70%, 20-80%, 20-90%, 20-95%, 20-100%, 30-40%, 30-50%, 30-60%, 30-70%, 30-80%, 30-90%, 30-95%, 30-100%, 40-50%, 40-60%, 40-70%, 40-80%, 40-90%, 40-95%, 40-100%, 50-60%, 50-70%, 50-80%, 50-90%, 50-95%, 50-100%, 60-70%, 60-80%, 60-90%, 60-95%, 60-100%, 70-80%, 70-90%, 70-95%, 70-100%, 80-90%, 80-95%, 80-100%, 90-95%, 90-100% или 95-100%.

[0071] Эффекторные модули, содержащие их SRE и грузы, могут индивидуально, совместно или независимо содержать пептиды, полипептиды или белки. На уровне белка таким грузом может быть любой природный или искусственный пептид или полипептид или их фрагмент. природные пептиды или полипептидные компоненты груза могут происходить из любого известного белка любого вида.

[0072] Эффекторные модули можно сконструировать для работы в группах из одного, двух, трех, четырех или более модулей. при использовании в биосхеме более одного

эффекторного модуля она известна как система эффекторных модулей этой биосхемы.

#### Домены дестабилизации

[0073] Домены дестабилизации (DD) представляют собой небольшие белковые домены, которые можно присоединить к представляющему интерес белку-мишени. Термин домен дестабилизации (DD) взаимозаменяем с термином реагирующий на лекарственное средство домен (DRD). DD делают представляющий интерес присоединенный белок нестабильным в отсутствие связывающего DD лиганда, так что белок быстро разрушается убиквитин-протеасомной системой клетки (Stankunas, K. et al, Mol. Cell, 2003, 12: 1615-1624; Banaszynski, et al, Cell; 2006, 126(5): 995-1004; обзор в Banaszynski, L.A. и Wandless, T.J. Chem. Biol., 2006, 13:11-21 и Rakhit R et al, Chem Biol. 2014; 21(9): 1238-1252). Однако, когда конкретный низкомолекулярный лиганд связывает свой предполагаемый DD в качестве партнера по связыванию лиганда, нестабильность резко изменяется, и функция белка восстанавливается. Условный характер стабильности DD позволяет быстро и без проблем переключаться со стабильного белка на нестабильный субстрат для разложения. Кроме того, его зависимость от концентрации своего лиганда дополнительно обеспечивает настраиваемое регулирование скорости разложения.

[0074] В одном варианте осуществления SRE представляет собой домен дестабилизации (DD). Присутствие, отсутствия или количество низкомолекулярного лиганда, который связывается или взаимодействует с DD, при таком связывании или взаимодействии может модулировать стабильность груза (грузов) и, следовательно, функцию груза. В зависимости от степени связывания и/или взаимодействия измененная функция груза может меняться, следовательно, обеспечивая «настройку» функции груза.

[0075] В некоторых вариантах осуществления нужная характеристика DD может включать в себя, но без ограничения, низкие уровни белка в отсутствие лиганда DD (например, низкую основную стабильность), большой динамический диапазон, надежное и прогнозируемое поведение с зависимым от дозы ответом и быструю кинетику разложения. предпочтительными могут быть DD, которые связываются с нужным лигандом, но не эндогенные молекулы.

[0076] В некоторых вариантах осуществления DD согласно настоящему раскрытию могут развиваться из известных белков, упоминаемых в данном документе как исходный белок. В некоторых вариантах осуществления домены дестабилизации CA2, описанные в данном документе или известные в данной области, можно использовать в качестве SRE в системах биосхемы согласно настоящему раскрытию в сочетании с любым из грузов (например, представляющих интерес белков или иммунотерапевтических средств), приведенных в данном документе.

[0077] Области или части или домены белков дикого типа (например, CA2) можно использовать в качестве SRE/DD целиком или частично. Их можно объединять или перемещать для создания новых пептидов, белков, областей или доменов, любой из которых можно использовать в качестве SRE/DD или исходной точки для конструирования дополнительных SRE и/или DD.

[0078] В одном варианте осуществления SRE происходит из области исходного белка (например, CA2) или из мутантного белка. Область исходного белка может быть 5-50, 25-75, 50-100, 75-125, 100-150, 125-175, 150-200, 175-225, 200-250, 225-275, 250-300, 275-325, 300-350, 325-375, 350-400, 375-425 или 400-450 аминокислот в длину. В качестве неограничивающего примера область исходного белка может быть 250-270 аминокислот в длину. В качестве неограничивающего примера область исходного белка может быть 225-250 аминокислот в длину. В качестве неограничивающего примера область исходного белка может быть 225-260 аминокислот в длину.

[0079] В одном варианте осуществления SRE происходит из исходного белка (например, CA2) или из мутантного белка и содержит область исходного белка. SRE может содержать область исходного белка, которая составляет 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-100%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-100%, 10-30%, 20-40%, 30-50%, 40-60%, 50-70%, 60-80%, 70-90%, 80-100%, 10-40%, 20-50%, 30-60%, 40-70%, 50-80%, 60-90%, 70-100%, 10-50%, 20-60%, 30-70%, 40-80%, 50-90%, 60-100%, 10-60%, 20-70%, 30-80%, 40-90%, 50-100%, 10-70%, 20-80%, 30-90%, 40-100%, 10-80%, 20-90%, 30-100%, 10-90%, 20-100%, 25-50%, 50-75% или 75-100% исходного белка или мутантного белка.

[0080] В одном варианте осуществления SRE происходит из исходного белка (например, CA2) или из мутантного белка и может иметь 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-100%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-100%, 10-30%, 20-40%, 30-50%, 40-60%, 50-70%, 60-80%, 70-90%, 80-100%, 10-40%, 20-50%, 30-60%, 40-70%, 50-80%, 60-90%, 70-100%, 10-50%, 20-60%, 30-70%, 40-80%, 50-90%, 60-100%, 10-60%, 20-70%, 30-80%, 40-90%, 50-100%, 10-70%, 20-80%, 30-90%, 40-100%, 10-80%, 20-90%, 30-100%, 10-90%, 20-100%, 25-50%, 50-75% или 75-100% идентичность с исходным белком или мутантным белком.

[0081] Предполагаемую последовательность домена дестабилизации, идентифицированную из белковых доменов исходных белков (в качестве матрицы), можно подвергать мутации для получения библиотек мутантов на основании предполагаемой последовательности домена матрица. стратегии мутагенеза, используемые для получения библиотек DD, могут включать в себя сайт-направленный мутагенез, например, за счет использования направляемой структурой информации; или случайный мутагенез, например, с использованием ПЦР сниженной точности, или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления домены дестабилизации, идентифицированные с использованием случайного мутагенеза, можно использовать для идентификации структурных свойств предполагаемых DD, которые могут быть необходимы для

дестабилизации, которые затем можно использовать для дальнейшего создания библиотек мутаций с использованием сайт-направленного мутагенеза.

[0082] В некоторых вариантах осуществления библиотеки мутантных DD можно скринировать на мутации с измененной, предпочтительно, повышенной аффинностью связывания с лигандом, по сравнению с белком дикого типа. библиотеки DD также можно скринировать с использованием двух или более лигандов, и предпочтительно можно выбрать мутации DD, стабилизированные с помощью некоторых лигандов, но не других. также можно выбрать мутации DD, которые предпочтительно связываются с лигандом по сравнению с природным белком. Такие способы можно использовать для оптимизации выбора лигандов и аффинности связывания лигандов DD. Кроме того, такие подходы можно использовать для минимизации вредных эффектов, вызванных связыванием не лиганда-мишени.

[0083] В некоторых вариантах осуществления подходящие DD можно идентифицировать путем скрининга библиотек мутантов с использованием штрих-кодов. Такие способы можно использовать для обнаружения, идентификации и количественной оценки отдельных мутантных клонов в библиотеке гетерогенных мутантов. Каждый мутант DD в библиотеке может иметь различные последовательности штрих-кода (относительно друг друга). В других случаях полинуклеотиды также могут иметь разные последовательности штрих-кода в отношении 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более оснований нуклеиновых кислот. Каждый мутант DD в библиотеке может также содержать множество последовательностей штрих-кода. при использовании во множестве, можно использовать так, чтобы каждый штрих-код был уникальным по отношению к любому другому штрих-коду. Альтернативно, каждый используемый штрих-код может быть не уникальным, но используемая комбинация штрих-кодов может создавать уникальную последовательность, которую можно отслеживать индивидуально. последовательность штрих-кода можно поместить перед SRE, после SRE или в некоторых случаях можно поместить внутри SRE. Мутанты DD можно идентифицировать по штрих-коду с использованием таких подходов секвенирования, как секвенирование по Сэнгеру и секвенирование следующего поколения, но также с помощью полимеразной цепной реакции и количественной полимеразной цепной реакции. В некоторых вариантах осуществления праймеры полимеразной цепной реакции, которые амплифицируют продукт разного размера для каждого штрих-кода, можно использовать для идентификации каждого штрих-кода на агарозном геле. В других случаях каждый штрих-код может иметь уникальную количественную последовательность зонда полимеразной цепной реакции, которая обеспечивает целенаправленную амплификацию каждого штрих-кода.

[0084] В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE согласно настоящему раскрытию могут содержать по меньшей мере один домен дестабилизации (DD). Эффекторные модули и/или SRE могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более DD. Когда имеется более одного DD, каждый из DD может происходить из одного и того же исходного белка, из разных исходных белков, может быть продуктом слияния двух

разных исходных белков или может быть искусственным.

[0085] В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE согласно настоящему раскрытию могут содержать 2 DD. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE согласно настоящему раскрытию могут содержать 3 DD. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE согласно настоящему раскрытию могут содержать 4 DD. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE согласно настоящему раскрытию могут содержать 5 DD. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE согласно настоящему раскрытию могут содержать 6 DD. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE согласно настоящему раскрытию могут содержать 7 DD. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE согласно настоящему раскрытию могут содержать 8 DD. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE согласно настоящему раскрытию могут содержать 9 DD. В одном варианте осуществления эффекторные модули и/или SRE согласно настоящему раскрытию могут содержать 10 DD. DD могут происходить из любого исходного белка, известного в данной области и/или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления DD происходят из одного и того же исходного белка. В некоторых вариантах осуществления DD происходят из разных областей одного и того же исходного белка. В некоторых вариантах осуществления DD происходят из разных исходных белков.

#### Домены дестабилизации CA2

[0086] В некоторых вариантах осуществления DD согласно настоящему раскрытию могут быть получены из карбоангидразы 2 CA2 человека, которая является членом карбоангидраз (CA, EC 4.2.1.1), суперсемейства металлоферментов, присутствующих во всех живых царствах. CA уравнивают реакцию между тремя химическими соединениями: CO<sub>2</sub>, бикарбонатом и протонами. CA конвергентно эволюционировали с семьей генетически различными семействами CA, которые развивались независимо у бактерий, архей и эукариот, α-, β-, γ-, δ-, ζ-, η- и θ-CA. В некоторых вариантах осуществления DD, описанные в настоящем документе, могут происходить по меньшей мере из одного исходного белка, выбранного, но без ограничения, из карбоангидразы 2 (CA2), карбоангидразы 1 (CA1), карбоангидразы 3 (CA3), карбоангидразы 4 (CA4), карбоангидразы 5A (CA5A), карбоангидразы 5B (CA5B), карбоангидразы 6 (CA6), карбоангидразы 7 (CA7), карбоангидразы 8 (CA8), карбоангидразы 9 (CA9), карбоангидразы 10 (CA10), карбоангидразы 11 (CA11), карбоангидразы 12 (CA12), карбоангидразы 13 (CA13) и карбоангидразы 14 (CA14).

[0087] В одном варианте осуществления DD могут происходить из цитозольных CA, например, но без ограничения, карбоангидразы 2 (CA2), карбоангидразы 1 (CA1), карбоангидразы 3 (CA3), карбоангидразы 7 (CA7) и карбоангидразы 13 (CA13). В одном варианте осуществления DD могут происходить из митохондриальных CA, например, но без ограничения, карбоангидразы 5A (CA5A) и карбоангидразы 5B (CA5B). В одном варианте осуществления DD могут происходить из секретируемых CA, например, но без

ограничения, карбоангидразы 6 (CA6). В одном варианте осуществления DD могут происходить из ассоциированных с мембраной CA, например, но без ограничения, карбоангидразы 4 (CA4), карбоангидразы 9 (CA9), карбоангидразы 12 (CA12) и карбоангидразы 14 (CA14). В одном варианте осуществления DD происходит из CA2. В другом аспекте DD могут происходить из CA9.

[0088] В некоторых вариантах осуществления DD согласно настоящему раскрытию могут происходить из CA2 (SEQ ID NO 5810; Uniprot ID: P00918), которая может быть стабилизирована лигандами, такими как низкомолекулярные ингибиторы CA2. В рамках настоящего изобретения термин «CA2 WT» относится к последовательности белка CA2 дикого типа человека, которая определена как SEQ ID NO 5810, с учетным номером GenBank P00918, имеющая аминокислотную последовательность:

```
MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQ
ATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGLDGTYRLIQFHFHWGSLDGGQSEHTVDK
KKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKT
KGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL
NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK.
```

[0089] В некоторых вариантах осуществления DD согласно настоящему раскрытию можно идентифицировать с использованием смеси ингибиторов CA2. В других случаях подходящие DD можно идентифицировать путем скрининга сперва одним ингибитором CA2, а затем скрининга вторым ингибитором CA2.

[0090] Аминокислотные последовательности доменов дестабилизации, включенные в раскрытие, имеют идентичность по меньшей мере приблизительно 40%, 50 или 60%, дополнительно идентичность по меньшей мере приблизительно 70%, предпочтительно идентичность по меньшей мере приблизительно 75% или 80%, более предпочтительно идентичность по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90% и дополнительно предпочтительно идентичность по меньшей мере приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью, приведенной в данном документе. Процентную идентичность можно определить, например, путем сравнения информации о последовательностях с использованием усовершенствованной компьютерной программы BLAST, включая версию Magic-BLAST 1.2.0, поставляемую Национальным институтом здравоохранения. Программа BLAST основана на методе выравнивания, описанном в Karl и Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 87:2264-68 (содержание которого полностью включено посредством ссылки).

[0091] В некоторых вариантах осуществления DD, происходящие из CA2, могут содержать аминокислоты 2-260 исходной последовательности CA2. В настоящем документе это называется мутацией M1del. В одном варианте осуществления DD, происходящие из CA2, могут содержать аминокислоты 2-237 исходной последовательности CA2.

[0092] В таблице 1, таблице 2, таблице 3, таблице 4 и таблице 6 представлены мутанты CA2, идентифицированные с помощью мутагенеза, такого как случайный

скрининг мутагенеза, с использованием комбинации мутагенеза нуклеотидных аналогов и ПЦР сниженной точности, для получения библиотеки мутантов; или насыщающего мутагенеза. Дестабилизирующие мутанты CA2 также можно идентифицировать с помощью направляемого структурой мутагенеза и представлены в таблице 1. Позиции мутировавших аминокислот, приведенных в таблице 1, таблице 2, таблице 3, таблице 4, таблице 5 и таблице 6, приведены относительно полной длины CA2 SEQ ID NO 5810.

Таблица 1: DD CA2

Библиотека ID	Описание	AA ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	AA SEQ ID NO.	NA SEQ ID NO.
-	CA2 (aa 2-260 WT)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5651	5652
-	CA2 (aa 2-260 WT, W208S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VTSIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5653	5654
LibC000103	CA2 (aa 2-260 WT, Y51N)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSNDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5655	5656
LibC000101	CA2 (aa 2-260 WT, S56N)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATNLR ILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG	5657	5658

		KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		
LibC000098	CA2 (aa 2- 260 WT, Y51T)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSTDQATSLRI LNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGT YRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDK KKYA AELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5659	5660
LibC000097				5661
LibC000095	CA2 (aa 2- 260 WT, D72F, V241F, P249L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDFSQKAVLKGGPLDGT YRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDK KKYA AELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMFDNWRPAQLLKNRQIKASFK	5662	5663
LibC000084	CA2 (aa 2- 260 WT, D71F, N231F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFFSDQKAVLKGGPLDGT YRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDK KKYA AELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FFGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5664	5665
LibC000079	CA2 (aa 2- 260 WT, S56F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATFLR ILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGT YRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDK KKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5666	5667
LibC000078				5668
LibC000073	CA2 (aa 2-	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR	5669	5670

	260 WT, D71L, T87N, L250R)	ILNNGHAFNVEFLDSQDKAVLKGGPLDGNYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPRKNRQIKASFK		
LibC000090	CA2 (aa 2- 260 WT, L183S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGSLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5671	5672
LibC000076	CA2 (aa 2- 260 WT, A77I, P249F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSQDKIVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYA AELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQFLKNRQIKASFK	5673	5674
LibC000099	CA2 (aa 2- 260 WT, D71K, P249H)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFKDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQHLLKNRQIKASFK	5675	5676
LibC000081	CA2 (aa 2- 260 WT, D72F, P249H)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDFSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYA AELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN	5677	5678
LibC000065				5679

		NGEGEPEELMVDNWRPAQFLKNRQIKASFK		
LibC000082	CA2 (aa 2-260 WT, Q53N, N61Y)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDNATSLR ILYNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5680	5681
-	CA2 (aa 2-260 WT, E106D, C205S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGS DHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLES VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5682	5683
-	CA2 (aa 2-260 WT, C205S, W208S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGS EHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLES VTSIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5684	5685
-	CA2 (aa 2-260 WT, C205S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGS EHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLES VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5686	5687
LibC000066	CA2 (aa 2-260 WT,	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGS EHTVDKKKY	5688	5689

LibC000069	Y193I)	AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTIPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN N GEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		5690
LibC000056	CA2 (aa 2-260 WT, S73N, R89Y)	SHHWGYGKHN GPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDNQDKAVLKG GPLDGTYYLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5691	5692
LibC000057	CA2 (aa 2-260 WT, D71K, T192F)	SHHWGYGKHN GPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFKDSQDKAVLKG GPLDGTYYRIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWFYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5693	5694
LibC000061	CA2 (aa 2-260 WT, E238*)	SHHWGYGKHN GPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSDQDKAVLKG GPLDGTYYRIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPE*LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5695; 5811	5696
LibC000061	CA2 (aa 2-260 WT, G144D)	SHHWGYGKHN GPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSDQDKAVLKG GPLDGTYYRIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLDIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5697	5698

LibC000092	CA2 (aa 2-260 WT, Y193L, K260L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTLPGLSTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN NGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFL	5699	5700
LibC000053	CA2 (aa 2-260 WT, V206M)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGLSTTPP LLECMTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5701	5702
LibC000054	CA2 (aa 2-260 WT, D71F, V241F, P249L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFFDSQKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYA AELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGLSTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN NGEGEPEELMFDNWRPAQLLKNRQIKASFK	5703	5704
LibC000055	CA2 (aa 2-260 WT, Y193F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTFFGLSTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN NGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5705	5706
LibC000058	CA2 (aa 2-260 WT, L147F,	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG	5707	5708

	Q248F)	KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAFPLKNRQIKASFK		
LibC000059	CA2 (aa 2- 260 WT, D52I, S258P)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYIQATSLRI LNNGHAFNVEFDSDQDKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDKKKYA AELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKAPFK	5709	5710
LibC000060	CA2 (aa 2- 260 WT, D72S, T192N)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDSSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDKKKYA AELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWNYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5711	5712
LibC000062	CA2 (aa 2- 260 WT, D179E, T192I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDSDQDKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKG KSADFTNFEPRGLLPESLDYWIYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5713	5714
LibC000063	CA2 (aa 2- 260 WT, Y193L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDSDQDKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTLPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5715	5716
LibC000064	CA2 (aa 2-	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATNLR	5717	5718

	260 WT, S56N, Q103K)	ILNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPLDGT YRLIQFHFHWGSLDGKGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		
LibC000067	CA2 (aa 2- 260 WT, D71Y, Q248L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFYDSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPALPLKNRQIKASFK	5719	5720
LibC000068	CA2 (aa 2- 260 WT, S73N, R89F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDNQDKAVLKGGPLDGT YFLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5721	5722
LibC000070	CA2 (aa 2- 260 WT, D71K, N231L, E235G, L239F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFKDSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FLGEGGPEEFMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5723	5724
LibC000071	CA2 (aa 2- 260 WT, D71F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFFSDQDKAVLKGGPLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYA AELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGK	5725	5726

		SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN NGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		
LibC000072	CA2 (aa 2- 260 WT, D72F, P249I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDFSQDKAVLKGGLDGTYRLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKCKKYA AELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN NGEGEPEELMVDNWRPAQILKNRQIKASFK	5727	5728
LibC000074	CA2 (aa 2- 260 WT, T192N)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGLDGTYRLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKCKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWNYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5729	5730
LibC000075	CA2 (aa 2- 260 WT, D72X, V241X, P249X)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDXSQDKAVLKGGLDGTYRLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKCKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNNGEGEPEELMXDNWRPAQXLKNRQIKASFK	5731	5732
LibC000077	CA2 (aa 2- 260 WT, A54X, S56X, L57X, T192X)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQXTXX RILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGLDGTYRLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKCKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTK GKSADFTNFDPRGLLPESLDYWXYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5733	5734
LibC000080	CA2 (aa 2-	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR	5735	5736

	260 WT, Y193V, K260F)	ILNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRG LLPESLDYWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFF		
LibC000085	CA2 (aa 2- 260 WT, G63D, M240L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNDHAFNVEFDDSDKAVLKGGPLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRG LLPESLDYWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELLVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5737	5738
LibC000086	CA2 (aa 2- 260 WT, V134F, L228F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAFQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRG LLPESLDYWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKFN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5739	5740
LibC000087	CA2 (aa 2- 260 WT, D71G, N231K)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFGDSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRG LLPESLDYWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FKGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5741	5742
LibC000088	CA2 (aa 2- 260 WT, S56F, D71S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATFLR ILNNGHAFNVEFSDSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYA AELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRG LLPESLDYWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN	5743	5744

		NGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		
LibC000089	CA2 (aa 2-260 WT, D52L, G128R, Q248F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYLQATSLRI LNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYA AELHLVHWNTKYRDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN NGEGEPEELMVDNWRPAFPLKNRQIKASFK	5745	5746
LibC000091	CA2 (aa 2-260 WT, S73X, R89X)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDXQDKAVLKGGPLDGTYXLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5747	5748
LibC000093	CA2 (aa 2-260 WT, Y193X)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTXPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5749	5750
LibC000096	CA2 (aa 2-260 WT, Y51X, D72X, V241X, P249X)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSXDQATSLR ILNNGHAFNVEFDXSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMXDNWRPAQXLKNRQIKASFK	5751	5752
LibC000100	CA2 (aa 2-260 WT,	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDISQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHCGSLDGQGSEHTVDKKKYA	5753	5754

	D72I, W97C)	AELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGK SADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN NGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		
LibC000102	CA2 (aa 2-260 WT, D71K, T192F, N231F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFKDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWFYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FFGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5755	5756
-	CA2 (aa 2-260 WT, I59N, G102R)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR NLNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDRQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5757	5758
LibC000210				5813
LibC000184				5814
LibC000187				5815
-	CA2 (aa 2-260 WT, L156H)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGHQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5759	5760
LibC000208				5816
-	CA2 (L156H)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSL RILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKK YAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGHQKVVDVLDSIKTK GKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKL NFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5761	5762

LibC000061 усеченная	CA2 (aa 2-237 WT)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLR ILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDKKKY AAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKG KSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLN FNGEPE	5695	5812
-------------------------	-------------------	--	------	------

[0093] Дополнительные домены дестабилизации CA2 представлены в таблице 2.

Таблица 2: DD CA2

Библиотека ID	Описание	AA ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	AA SEQ ID NO.	NA SEQ ID NO.
LibC000229	CA2 (aa 2-260 WT, H36Q, S43T, Y51F, N67D, G131W, R226H)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTQTAKYDPTLKPLSVSFDQATS LRILNNGHAFDVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDK KKYAAELHLVHWNTKYGDFWKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVL SIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISVSSEQV LKFHKLNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5817	5818
LibC000228	CA2 (aa 2-260 WT, F70I, F146V)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNGHAFNVEIDDSQKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDK KKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIVLKVGS AKPGLQKVVDVL SIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISVSSEQV LKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5819	5820
LibC000226	CA2 (aa 2-260 WT, R27L,	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGELQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGIYRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDK	5821	5822

	T87I, H122Y, N252D)	KKYAAELHLVYWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQV LKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKDRQIKASFK		
LibC000225	CA2 (aa 2-260 WT, K45N, V68L, H119Y, K169R, D179E)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLNPLSVSYDQATS LRILNNGHAFNLEFDDSQDKAVLKGGLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDK KKYAAELYL VHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKTRGKSADFTNFEPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQV LKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5823	5824
LibC000224	CA2 (aa 2-260 WT, H15L, A54V, K111E, E220K, F225I)	SHHWGYGKHNGPELWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQVTS LRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDE KKYAAELHL VHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSKQ VLKIRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5825	5826
LibC000221	CA2 (aa 2-260 WT, P13S, P83A, D101G, K111N, F230I)	SHHWGYGKHNGSEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGLDGTYRLIQFHFHWGSLGGQGSEHTVD NKKYAAELHL VHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVL DSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQ VLKFRKLNINGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5827	5828
LibC000220	CA2 (aa 2-260 WT, L47R)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPRSVSYDQATS LRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDK KKYAAELHL VHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQV LKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5829	5830

LibC000219	CA2 (aa 2-260 WT, G63D, W123R, E220K)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNDHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVdk KKYAAELHLVHRNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDS IKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLKEPISVSSKQV LKFRKLNfNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKnrQIKASFK	5831	5832
LibC000217	CA2 (aa 2-260 WT, N11D, E69K, G86D, V109M, K113I, T125I, D138G, G155S)	SHHWGYGKHHDGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNGHAFNVKfDDSQDKAVLKGGPLDDTYrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTMD KKIYAAELHLVHWNiKYGDFGKAVQQPGGLAVLGIFLKVGSAPSLQKVVDVLDS IKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLKEPISVSSEQV LKFRKLNfNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKnrQIKASFK	5833	5834
LibC000214	CA2 (aa 2-260 WT, I59N, G102R, A173T)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRNLNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDRQGSEHTVD KKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVL DSIKTKGKSTDFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLKEPISVSSEQ VLKFRKLNfNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKnrQIKASFK	5835	5836
LibC000213	CA2 (aa 2-260 WT, L79F, P180S)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVfKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVdk KKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKTKGKSADFTNFDSRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLKEPISVSSEQV LKFRKLNfNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKnrQIKASFK	5837	5838
LibC000212	CA2 (aa 2-260)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS	5839	5840

	WT, S73F)	LRILNNGHAFNVEFDDFQDKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDK KKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQV LKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		
LibC000211	CA2 (aa 2-260 WT, G12R)	SHHWGYGKHNRPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNGHAFNVEFDDSDQDKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDK KKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQV LKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5841	5842
LibC000209	CA2 (aa 2-260 WT, A77P, G102R, D138N)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNGHAFNVEFDDSDQDKPVLKGGPLDGTYRLIQHFHFWGSLDRQGSEHTVDK KKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPNGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQV LKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5843	5844
LibC000183	CA2 (aa 2-260 WT, F20L, K45N, G63D, E69V, N231I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDLPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLNPLSVSYDQATS LRILNNDHAFNVVFDSDQDKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVD KKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVL DSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQ VLKFRKLNFIGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5845	5846
LibC000207	CA2 (aa 2-260 WT, T199N, L202P, L228F)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNGHAFNVEFDDSDQDKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDK KKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTNPPPLECVTWIVLKEPISVSSEQ	5847	5848

		VLKFRKFNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		
LibC000206	CA2 (aa 2-260 WT, K9N, H122Y, T168K)	SHHWGYGNHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDK KKYAAELHLVYWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKKKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQ VLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5849	5850
LibC000205	CA2 (aa 2-260 WT, Q53H, L90V, Q92H, G131E)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDHATS LRILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTYRVIHFHFWGSLDGQGSEHTVD KKKYAAELHLVHWNTKYGDFEKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVL DSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQ VLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5851	5852
LibC000204	CA2 (aa 2-260 WT, L44M, L47V, N62K, E69D)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSMKPVSYSYDQAT SLRILNKGHAFNVDFDDSDQKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVD KKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVL DSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQ VLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5853	5854
LibC000203	CA2 (aa 2-260 WT, F20L, K45N, G104R, A116V)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDLPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLNPLSVSYDQATS LRILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFWGSLDGQRSEHTVDK KKYAVELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQV LKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5855	5856
LibC000202	CA2 (aa 2-260 WT, D75V,	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNGHAFNVEFDDSQVKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDK	5857	5858

	K169N, F259L)	KKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKTNGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQV LKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASLK		
LibC000182	CA2 (aa 2-260 WT, T207S, V222A, N231D)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVdk KKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvSWIVLKEPISVSSEQA LKFRKLNFDGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5859	5860
LibC000201	CA2 (aa 2-260 WT, I59F, V206M, G232R)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRFLNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVD KKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVL DSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECMTWIVLKEPISVSSE QVLKFRKLNFNREGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5861	5862
LibC000199	CA2 (aa 2-260 WT, P13A, A133T)	SHHWGYGKHNGAEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQAT SLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVD KKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKTVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVL DSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLKEPISVSSEQ VLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5863	5864
LibC000198	CA2 (aa 2-260 WT, N61R, K80M, K212N, N231T, L250P)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILRNNGHAFNVEFDDSQDKAVLMGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVD KKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVL DSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLNEPISVSSEQ VLKFRKLNFTGEGEPEELMVDNWRPAQPPKNRQIKASFK	5865	5866

LibC000196	CA2 (aa 2-260 WT, G63D, E69V, N231I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNDHAFNVVFDSDQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVD KKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVL DSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQ VLKFRKLNFIGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5867	5868
LibC000181	CA2 (aa 2-260 WT, I59N, R89I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRNLNNGHAFNVEFDDSDQDKAVLKGGPLDGTYILIQFHFHWGSLDGQGSEHTVVK KKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQV LKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5869	5870
LibC000194	CA2 (aa 2-260 WT, A65N, G86D, G131R, G155D, K158N, V162A, G170D, P236L)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNGHNFNVEFDDSDQDKAVLKGGPLDDTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVVK KKYAAELHLVHWNTKYGDFRKA VQQPDGLAVLGIFLKVGSAPDLQNVVDALD SIKTKDKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQV LKFRKLNFNNGEGELEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5871	5872
LibC000192	CA2 (aa 2-260 WT, G12R, H15Y, D19V)	SHHWGYGKHNRPEYWHKVFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNGHAFNVEFDDSDQDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVVK KKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQV LKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5873	5874

LibC000193	CA2 (aa 2-260 WT, L156H, S172C, F178Y, E186D)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDK KKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGHQKVVDVLD SIKTKGKCADFTNYDPRGLLPDSDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQ VLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5875	5876
LibC000189	CA2 (aa 2-260 WT, A65V, F95Y, E106G, H107Q, I145M, F175I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNGHVFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTYRLIQFHYHWGSLDGQGSQTVD KKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGMFLKVGSAPGLQKVVDV LDSIKTKGKSADITNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSE QVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5877	5878
LibC000186	CA2 (aa 2-260 WT, L197P)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDK KKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLD SIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSPTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQ LKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5879	5880
-	CA2 (aa 2-260 WT, G63D, E69V, N231I)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATS LRILNNDHAFNVVFDSDQKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVD KKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVL DSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQ VLKFRKLNFIGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	5881	5882

[0094] В некоторых вариантах осуществления DD CA2, описанные в данном документе, могут содержать любую из последовательностей, представленных в таблице 3. В таблице 3 «\*» представляет трансляцию стоп-кодона. Когда аминокислотная последовательность в таблице 3 содержит один или несколько стоп-кодонов, в столбце «AA SEQ ID NO» представлена SEQ ID NO

компонентов человека, предшествующая и следующая за стоп-кодоном в порядке, в котором они встречаются в аминокислотной последовательности.

Таблица 3: DD CA2

Библиотека ID	Описание	AA ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	AA SEQ ID NO.	NA SEQ ID NO.
LibC000223	CA2 (aa 2-260 WT, G12E, A38V, A65V, G98V, S99H, D101M, G102D, Q103K, G104V, S105Q, E106S, H107I, T108L, V109W, D110I, K112R, K113N, Y114M, A115L, A116Q, E117N, L118F, H119T, L120W, V121F, H122T, W123G, N124T, T125P, K126N, Y127M, D129I, F130L, K132E, A133L, V134C, Q135S, Q136N, P137L, D138M, G139D, L140W, A141P, V142F, L143*, G144V, I145F, L156Q, V162A)	SHHWGYGKHNEPEHWHKDFPIAKGERQSPVD IDTHTVKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHV FNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQHFHFW VHLMKDVQSILWIKRNMLQNFTWFTGTPNMG ILGELCSNLMDWPF*VFFLKVGS AKPGQKVV DALDSIKTKGKSADFTNFDPRG LLPESLDYWT YPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFR KLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKA SFK	5883; 5884	5885
LibC000185	CA2 (aa 2-260 WT, F20L, K45N, G104R, A116V, A173G, W191*)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDLPIAKGERQSPVD IDTHTAKYDPSLNPLSVSYDQATSLRILNNGHA FNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQHFHFW GSLDGQRSEHTVDK KKYAVELHLVHWNTKY GDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQK VVDVLDSIKTKGKSGDFTNFDPRG LLPESLDY* TYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKF	5886; 5887	5888

		RKLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIK ASFK		
LibC000215	CA2 (aa 2-260 WT, H17D, P30S, G81V, K132R, S151I, A152D, A173G, W191*)	SHHWGYGKHNGPEHWKDFPIAKGERQSSVD IDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHA FNVEFDDSQDKAVLKVGPLDGT YRLIQFHFHW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKY GDFGRAVQQPDGLAVLGIFLKVGIDK PGLQKV VDVLDSIKTKGKSGDFTNFDPRGLLPESLDY*T YPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFR KLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKA SFK	5889; 5887	5890
LibC000191	CA2 (aa 2-260 WT, H17D, P30S, G81V, K132R, S151I, A152D, A173G, W191*)	SHHWGYGKHNGPEHWKDFPIAKGERQSSVD IDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHA FNVEFDDSQDKAVLKVGPLDGT YRLIQFHFHW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKY GDFGRAVQQPDGLAVLGIFLKVGIDK PGLQKV VDVLDSIKTKGKSGDFTNFDPRGLLPESLDY*T YPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFR KLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKA SFK	5889; 5887	5891
LibC000200	CA2 (aa 2-260 WT, I59N, L90*, G102R)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVD IDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRNLNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGT YR*IQFHFH	5892; 5893	5894

		<p>WGSLDRQGSEHTVDK KKYAAELHLVHWNTK  YDGF GKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQ  KVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRG LLPESLD  YWTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQV  LKFRKLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLKNR  QIKASFK</p>		
LibC000197	CA2 (aa 2-260 WT, T35I, Y114H, P154L, D161V, P200A, Q221R, F225L, E233D, W244*)	<p>SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVD  IDIHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHA  FNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQHFHFW  GSLDGQGSEHTVDK KKHAAELHLVHWNTKY  GDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKLGLQK  VVVVLDSIKTKGKSADFTNFDPRG LLPESLDY  WTYPGSLTTAP LLECVTWIVLKEPISVSSERVL  KLRKLNFN GGDGEPEELMVDN*RPAQPLKNRQI  KASFK</p>	5895; 5896	5897
LibC000195	CA2 (aa 2-260 WT, S105L, L140V, G155C, Y190*)	<p>SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVD  IDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHA  FNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQHFHFW  GSLDGQGLEHTVDK KKYAAELHLVHWNTKY  GDFGKAVQQPDGVAVLGIFLKVGS AKPCLQK  VVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRG LLPESLD*  WTYPGSLTTPP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVL  KFRKLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQI</p>	5898; 5899	5900

		KASFK		
LibC000188	CA2 (aa 2-260 WT, T35I, Y114H, P154L, D161V, P200A, F225L, E233D, W244*)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVD IDIHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHA FNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFW GSLDGQGSEHTVDKKKHAAELHLVHWNTKY GDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKLGLQK VVVVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDY WTYPGSLTTAPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVL KLRKLNFNNGDGEPEELMVDN*RPAQPLKNRQI KASFK	5901; 5896	5902
LibC000180	CA2 (aa 2-260 WT, K167*, R181H, E213*, V217L, L228H)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVD IDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHA FNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKY GDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQK VVDVLD SI*TKGKSADFTNFDPHGLLPESLDY WTYPGSLTTPPLEC VTWIVLK*PISLSSEQVLK FRKHNFNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQI KASFK	5903; 5904; 5905	5906
LibC000190	CA2 (aa 2-259 WT, K167*, R181H, P194Q, G195A, S196H, L197*, T198P, T199P, P200L, P201L, L202F, L203W, E204N, C205V, V206*, T207P, W208G, I209L, V210C, L211S, K212R, E213N, I215S, S216A, V217S,	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVD IDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHA FNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHFW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKY	5903; 5907; 5908; 5909;	5913

	S218A, S219A, E220S, Q221R, V222C, L223*, K224N, F225S, R226V, K227N, N229T, F230S, N231M, E233R, G234L, E235N, E237K, E238N, L239*, M240W, V241W, D242T, N243T, W244G, R245A, P246Q, A247L, Q248S, P249H, L250*, K251R, N252T, R253G, Q254K, I255S, A257L, S258P, F259S)	GDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQK VVDVLDSI*TKGKSADFTNFDPHGLLPESLDY WTYQAH*PPLLFWNV*PGLCSRNPASASAASRC *NSVNLTSMGRLNPKN*WWTTGAQLSH*RTG KSKLPS	5910; 5911; 5912	
LibC000227	CA2 (aa 2-259 WT, P13H, E117*, G150S, L184F, P185L, E186N, S187P, L188W, D189I, Y190T, W191G, T192P, Y193T, P194Q, G195A, S196H, L197*, T198P, T199P, P200L, P201L, L202F, L203W, E204N, C205V, V206*, T207P, W208G, I209L, V210C, L211*, K212R, E213N, I215S, S216A, V217S, S218A, S219A, E220S, Q221R, V222C, L223*, K224N, F225S, R226V, K227N, N229T, F230S, N231M, E233R, G234V, E235N, E237K, E238N, L239*, M240W, V241W, D242T, N243T, W244G, R245A, P246Q, A247L, Q248S, P249H, L250*, K251R, N252T, R253G, Q254K, I255S, A257L, S258P, F259S)	SHHWGYGKHNGHEHWHKDFPIAKGERQSPVD IDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHA FNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQHFHFW GSLDGQGSEHTVDKKKYAA*LHLVHWNTKY GDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVSSAKPGLQKV VDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLFLNPWITGP TQAH*PPLLFWNV*PGLC*RNPSASAASRC*NS VNLTSMGRVNPKN*WWTTGAQLSH*RTGKSK LPS	5914; 5915; 5908; 5916; 5917; 5918; 5911; 5912	5919
LibC000218	CA2 (aa 2-260 WT, A133T, L147F, K148E, V149G, G150W, S151Q, A152R, K153*, P154T, L156P, Q157S, K158E, V159S, V160C, D161*, V162C, L163A, D164G, S165F, I166H, K167*, T168N, K171Q, S172E, A173C, D174*, F175L, T176H, N177*, F178L, D179R, P180S,	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVD IDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHA FNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQHFHFW GSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKY GDFGKTVQQPDGLAVLGIFFEWQR*TGPSSES	5920; 5921; 5922; 5923; LH;	5928

	R181S, G182W, L183P, L184P, P185S, E186*, S187I, L188P, D189G, Y190L, W191L, T192D, Y193L, G195R, S196L, L197T, T198D, T199H, P201S, L202S, L203S, E204G, C205M, V206C, T207D, W208L, I209D, V210C, L211A, K212Q, E213G, P214T, I215H, S216Q, V217R, S218Q, S219Q, E220R, Q221A, V222G, L223V, K224E, F225I, R226P, K227*, L228T, N229*, F230L, N231Q, G232W, E233G, E235*, P236T, E237R, E238R, L239T, M240D, V241G, D242G, N243Q, W244L, R245A, A247S, Q248S, P249A, L250T, K251E, N252E, R253Q, Q254A, I255N, K256Q, A257S, S258F, F259L, K260Q)	C*CAGFH*NKGQEC*LH*LRSSWPPS*IPGLLDL PRLTDHPSSSGMCDLDCAQGTHQRQQRAGVEI P*T*LQWGG*TRRTDGGQLAPSSATEEQANQS FLQ	5924; 5925; T; 5926; 5927	
LibC000216	CA2 (aa 2-260 WT, F20L, K45N, G104R, A116V, L147F, K148E, V149G, G150W, S151Q, A152R, K153*, P154T, L156P, Q157S, K158E, V159S, V160C, D161*, V162C, L163A, D164G, S165F, I166H, K167*, T168N, K171Q, S172E, A173C, D174*, F175L, T176H, N177*, F178L, D179R, P180S, R181S, G182W, L183P, L184P, P185S, E186*, S187I, L188P, D189G, Y190L, W191L, T192D, Y193L, G195R, S196L, L197T, T198D, T199H, P201S, L202S, L203S, E204G, C205M, V206C, T207D, W208L, I209D, V210C, L211A, K212Q, E213G, P214T, I215H, S216Q, V217R, S218Q, S219Q, E220R, Q221A, V222G, L223I, K224E, F225I, R226P, K227*, L228T,	SHHWGYGKHNGPEHWHKDLPIAKGERQSPVD IDTHTAKYDPSLNPLSVSYDQATSLRILNNGHA FNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHW GSLDGQRSEHTVDKkkYAVELHLVHWNTKY GDFGKAVQQPDGLAVLGIFFEGWQR*TGpSES C*CAGFH*NKGQEC*LH*LRSSWPPS*IPGLLDL PRLTDHPSSSGMCDLDCAQGTHQRQQRAGIEI P*T*LQWGG*TRRTDGGQLAPSSATEEQANQS FLQ	5929; 5921; 5922; 5923; LH; 5924; 5930; T; 5926; 5927	5931

	N229*, F230L, N231Q, G232W, E233G, E235*, P236T, E237R, E238R, L239T, M240D, V241G, D242G, N243Q, W244L, R245A, A247S, Q248S, P249A, L250T, K251E, N252E, R253Q, Q254A, I255N, K256Q, A257S, S258F, F259L, K260Q)			
LibC000222	CA2 (aa 2-259 WT, N11K, G12D, P13L, E14N, H15T, W16G, H17I, K18R, D19T, F20S, I22L, A23P, K24R, G25E, E26S, R27A, Q28S, S29P, P30L, V31L, D32T, I33S, D34T, T35L, H36I, T37Q, A38P, K39S, Y40M, D41T, P42L, S43P, L44*, K45S, L47C, S48L, V49F, S50P, Y51M, D52I, Q53K, A54Q, T55L, S56P, L57*, R58G, I59S, L60S, N61T, N62M, G63V, H64M, A65L, F66S, N67T, V68W, E69S, F70L, D71M, D72T, S73L, Q74R, D75T, A77Q, V78C, L79S, K80R, G81E, G82D, L84W, D85M, G86A, T87L, Y88T, R89D, L90*, I91F, Q92S, H94T, H96T, W97G, G98V, S99H, D101M, G102D, Q103K, G104V, S105Q, E106S, H107I, T108L, V109W, D110I, K112R, K113N, Y114M, A115L, A116Q, E117N, L118F, H119T, L120W, V121F, H122T, W123G, N124T, T125P, K126N, Y127M, D129I, F130L, A133L, V134C, Q135S, Q136N, P137L, D138M, G139D, L140W, A141P, V142F, L143*, G144V, I145F, L147*, K148R, V149L, G150A, S151A, A152L, K153N, P154R,	SHHWGYGKHKDLNTGIRTSPLPRESASPLLTST LIQPSMTLP*SPCLFPMIKQLP*GSSTMVMLST WSLMTLRTKQCSREDPWMALTD*FSFTFTGVH LMDKVQSILWIKRNMLQNFTWFTGTPNMGIL GKLCSNLMDWPF*VFF*RLAALNRAFRKLLMC WIPLKQRARVLTSLTSILVASFVNPWITGPTQA H*PPLLFWNV*PGLCSWNPSASAASRC*NYVN LTSMGRVNPKN*RWTTGALLSH*RTGKSKLPS	5932; 5933; 5934; 5935; VFF; 5936; 5908; 5937; 5938; 5939; 5912	5940

	G155A, L156F, Q157R, V159L, V160L, D161M, V162C, L163W, D164I, S165P, I166L, T168Q, K169R, G170A, K171R, S172V, A173L, D174T, F175S, T176L, N177T, F178S, D179I, P180L, R181V, G182A, L183S, L184F, P185V, E186N, S187P, L188W, D189I, Y190T, W191G, T192P, Y193T, P194Q, G195A, S196H, L197*, T198P, T199P, P200L, P201L, L202F, L203W, E204N, C205V, V206*, T207P, W208G, I209L, V210C, L211S, K212W, E213N, I215S, S216A, V217S, S218A, S219A, E220S, Q221R, V222C, L223*, K224N, F225Y, R226V, K227N, N229T, F230S, N231M, E233R, G234V, E235N, E237K, E238N, L239*, M240R, V241W, D242T, N243T, W244G, R245A, P246L, A247L, Q248S, P249H, L250*, K251R, N252T, R253G, Q254K, I255S, A257L, S258P, F259S)			
--	---	--	--	--

[0095] В таблице 4 представлены дополнительные домены дестабилизации CA2. Дестабилизирующие мутанты CA2, представленные в таблице 4, идентифицированы как описано выше, например, путем направляемого структурой мутагенеза или путем комбинирования одиночных мутантов.

Таблица 4: DD CA2

Описание	AA Последовательность	AA SEQ ID NO.	NA SEQ ID NO.
CA2 (M1del,	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH	6073	6109

E106D) - вариант 1	AFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGT YRLIQHFHFGSLDGQGS DHTVDK KKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRG LLLPESL DYWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK		
CA2 (M1del, I59N, G102R) - вариант 2	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRNLNNGH AFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGT YRLIQHFHFGSLDRQGSEHTVDK KKYAAELHLVHWNTK YGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRG LLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLKNR QIKASFK	6074	6110
CA2 (M1del, L197P) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGT YRLIQHFHFGSLDGQGS EHTVDK KKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRG LLLPESL DYWTYPGSPTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	6075	6111
CA2 (M1del, L156H, S172C, F178Y, E186D) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGT YRLIQHFHFGSLDGQGS EHTVDK KKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGHQKVVDVLDSIKTKGK CADFTNYDPRG LLLPDSL DYWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	6076	6112
CA2 (M1del, L156H) - вариант 2	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGT YRLIQHFHFGSLDGQGS EHTVDK KKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRG LLLPESL DYWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLKN	6077	6113

	RQIKASFK		
CA2 (M1del, R27L, T87I, H122Y, N252D) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGELQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSDKAVLKGGPLDGIYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVYWNTK YGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKDR QIKASFK	6078	6114
CA2 (I59N) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRNLNNGH AFNVEFDDSDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	6079	6115
CA2 (G63D) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNDH AFNVEFDDSDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	6080	6116
CA2 (M1del, H122Y) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVYWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	6081	6117

CA2 (M1del, G63D, M240L) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNDH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQHFHFGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTPP LLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN GEGEPEELLVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	6082	6118
CA2 (M1del, A77I, P249F) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKIVLKGGPLDGT YRLIQHFHFGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTK YGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPP LLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQFLKNR QIKASFK	6083	6119
CA2 (M1del, D71K, T192F) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFKDSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQHFHFGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWFYPGSLTTPP LLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	6084	6120
CA2 (M1del, L156H)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQHFHFGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTPP LLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	6085	6121
CA2 (M1del, R27L, H122Y) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGELQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQHFHFGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVYWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL	6086	6122

	DYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK		
CA2 (M1del, T87I, H122Y) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGIYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVYWNTK YGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNR QIKASFK	6087	6123
CA2 (M1del, H122Y, N252D) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVYWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKD RQIKASFK	6088	6124
CA2 (M1del, D72F, V241F) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDFSQKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTK YGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMFDNWRPAQPLKNR QIKASFK	6089	6125
CA2 (M1del, V241F, P249L) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSDQKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMFDNWRPAQLLKN RQIKASFK	6090	6126

CA2 (M1del, D72F, P249L) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDFSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTK YGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQLLKNR QIKASFK	6091	6127
CA2 (M1del, D71L, T87N) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFLDSQDKAVLKGGPLDGNRYRLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	6092	6128
CA2 (M1del, D71L, L250R) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFLDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTK YGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPRKNR QIKASFK	6093	6129
CA2 (Y51T) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSTDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	6094	6130
CA2 (S73N, R89F) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDNQDKAVLKGGPLDGTYFLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL	6095	6131

	DYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK		
CA2 (D72F, P249F) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDFSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTK YGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL YWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQFLKNR QIKASFK	6096	6132
CA2 (T55K, G63N, Q248N) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQAKSLRILNNNH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPANPLKN RQIKASFK	6097	6133
CA2 (Y193I) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTIPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	6098	6134
CA2 (S56F) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATFLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	6099	6135

CA2 (S56F, D71S) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATFLRILNNGH AFNVEFSDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTK YGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNR QIKASFK	6100	6136
CA2 (S73N, R89Y) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDNQDKAVLKGGPLDGTYYLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	6101	6137
CA2 (V134F, L228F) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAFQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD YWTYPGSLTTPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNR QIKASFK	6102	6138
CA2 (M1del, L156H, A256del, S257del, F258del, K259del) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIK	6103	6139
CA2 (M1del, S2del, H3del, H4del, W5del,	GYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVE FDDSQDKAVLKGGPLDGTYRLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDF GKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTY	6104	6140

L156H) - вариант 1	PGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		
CA2 (M1del, W5Y, L156H) - вариант 1	SHHYGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGHQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	6105	6141
CA2 (M1del, L156H, G234del, E235del, P236del) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGHQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEEELMVDNWRPAQPLKNRQI KASFK	6106	6142
CA2 (M1del, L156H, F225L) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGHQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKLRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	6107	6143
CA2 (M1del, D71N, D75N, D101N, L156H) - вариант 1	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGH AFNVEFNDSQNKAVLKGGPLDGTyrLIQHFHWGSLNGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHWNT KYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGHQKVVDVLDsIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTPPILLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKN RQIKASFK	6108	6144

[0096] В некоторых вариантах осуществления область или часть CA2 WT можно использовать в качестве матрицы для получения

DD CA2. В некоторых вариантах осуществления DD CA2 могут исключать лизин в позиции 260 SEQ ID NO 5810. В некоторых аспектах области CA2 могут содержать, но без ограничения, области, описанные в таблице 5.

Таблица 5: области CA2

<b>Описание</b>	<b>AA ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ</b>	<b>AA SEQ ID NO.</b>	<b>NA SEQ ID NO.</b>
CA2 (aa 1-142 WT)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNN GHAFNVEFDDSQDKAVLKGGLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVH WNTKYGDFGKAVQQPDGLAV	5941	-
CA2 (aa 2-142 WT)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNG HAFNVEFDDSQDKAVLKGGLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHW NTKYGDFGKAVQQPDGLAV	5942	-
CA2 (aa 1-190 WT)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNN GHAFNVEFDDSQDKAVLKGGLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVH WNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKGKSADFTNFDPRGL LPESLDY	5943	-
CA2 (aa 2-190 WT)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNG HAFNVEFDDSQDKAVLKGGLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHW NTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSEIKTKGKSADFTNFDPRGLLP ESLDY	5944	-
CA2 (aa 1-89 WT)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNN GHAFNVEFDDSQDKAVLKGGLDGTYR	5945	-

CA2 (aa 2-89 WT)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNG HAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyr	5946	-
CA2 (aa 1-243 WT)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNN GHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKkkYAAELHLVH WNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSakPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGL LPESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNfNGEGEPEELMVDN	5947	-
CA2 (aa 2-243 WT)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNG HAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKkkYAAELHLVHW NTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSakPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLP ESLDYWTYPGSLTTPPLLECvtWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNfNGEGEPEELMVDN	5948	-
CA2 (aa 1-166 WT)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNN GHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKkkYAAELHLVH WNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSakPGLQKVVDVLDSI	5949	-
CA2 (aa 2-166 WT)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNG HAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKkkYAAELHLVHW NTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSakPGLQKVVDVLDSI	5903	5950
CA2 (aa 1-116 WT)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNN GHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKkkYAA	5951	-
CA2 (aa 2-116 WT)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNG HAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKkkYAA	5952	-
CA2 (aa 1-152 WT)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNN GHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGTyrLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKkkYAAELHLVH WNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSA	5953	-

CA2 (aa 2-152 WT)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNG HAFNVEFDDSQDKAVLKGGLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELHLVHW NTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS	5954	-
CA2 (aa 1-43 WT)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS	5955	-
CA2 (aa 2-43 WT)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKYDPS	5956	-

[0097] Для получения DD CA2 можно использовать любые из областей CA2, описанных в данном документе. В таблице 6 представлены DD CA2, происходящие из областей CA2.

Таблица 6: DD CA2, происходящие из областей CA2

Описание	AA ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	AA SEQ ID NO.	NA SEQ ID NO.
CA2 (aa 2-142 WT, G12E, A38V, A65V, G98V, S99H, D101M, G102D, Q103K, G104V, S105Q, E106S, H107I, T108L, V109W, D110I, K112R, K113N, Y114M, A115L, A116Q, E117N, L118F, H119T, L120W, V121F, H122T, W123G, N124T, T125P, K126N, Y127M, D129I, F130L, K132E, A133L, V134C, Q135S, Q136N, P137L, D138M, G139D, L140W, A141P, V142F)	SHHWGYGKHNEPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTVKY DPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHVFNVEFDDSQDKAVLK GGPLDGTYRLIQFHFHWVHLMDKVQSILWIKRNMLQNFT WFTGTPNMGILGELCSNLMDWPF	5883	5957
CA2 (aa 2-190 WT, F20L, K45N, G104R, A116V, A173G)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDLPIAKGERQSPVDIDTHTAKY DPSLNPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLK GGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQRSEHTVDKKKYAVELH LVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQ KVVDVLDSIKTKGKSGDFTNFDPRGLLPESLDY	5886	5958

CA2 (aa 2-190 WT, H17D, P30S, G81V, K132R, S151I, A152D, A173G)	SHHWGYGKHNGPEHWDKDFPIAKGERQSSVDIDHTAKY DPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLK VGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAELH LVHWNTKYGDFGRAVQQPDGLAVLGIFLKV GIDKPGLQK VVDVLD SIKTKGKSGDFTNFDPRGLLPESLDY	5889	5959
CA2 (aa 2-89 WT, I59N)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKY DPSLKPLSVSYDQATSLRNLNNGHAFNVEFDDSQDKAVL KGGPLDGTYR	5892	5960
CA2 (aa 2-243 WT, T35I, Y114H, P154L, D161V, P200A, Q221R, F225L, E233D)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDIHTAKY DPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLK GGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKHAAELH LVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKLGLQ KVVVLD SIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSL TTAPLLEC VTWIVLKEPISVSSERVLKLRKLNFN GDGEPEE LMVDN	5895	5961
CA2 (aa 2-189 WT, S105L, L140V, G155C)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKY DPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLK GGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGLEHTVDKKKYAAELH LVHWNTKYGDFGKAVQQPDGVAVLGIFLKVGS AKPCLQ KVVVLD SIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLD	5898	5962
CA2 (aa 2-243 WT, T35I, Y114H, P154L, D161V, P200A, F225L, E233D)	SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDIHTAKY DPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLK GGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKHAAELH	5901	5963

	LVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGS AKLGLQ KVVVVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSL TTAPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKLRKLNFNNGDGEPEE LMVDN		
CA2 (aa 2-116 WT, P13H)	SHHWGYGKHNHGHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAK YDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDQKAVL KGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDK KKYAA	5914	5964
CA2 (aa 2-152 WT, A133T, L147F, K148E, V149G, G150W, S151Q, A152R)	SHHWGYGKHNHGHWHKDFPIAKGERQSPVDIDTHTAKY DPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLK GGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDK KKYAAELH LVHWNTKYGDFGKTVQQPDGLAVLGIFFEWQR	5920	5965
CA2 (aa 2-152 WT, F20L, K45N, G104R, A116V, L147F, K148E, V149G, G150W, S151Q, A152R)	SHHWGYGKHNHGHKDLPIAKGERQSPVDIDTHTAKY DPSLNPLSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEFDDSDQKAVLK GGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQRSEHTVDK KKYAVELH LVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFFEWQR	5929	5966
CA2 (aa 2-43 WT, N11K, G12D, P13L, E14N, H15T, W16G, H17I, K18R, D19T, F20S, I22L, A23P, K24R, G25E, E26S, R27A, Q28S, S29P, P30L, V31L, D32T, I33S, D34T, T35L, H36I, T37Q, A38P, K39S, Y40M, D41T, P42L, S43P)	SHHWGYGKHKDLNTGIRTSPLPRESASPLLTSTLIQPSMTL P	5932	5967

[0098] В некоторых вариантах осуществления DD, происходящие из CA2, могут содержать одну, две, три, четыре, пять или более мутаций, описанных в предыдущих таблицах.

[0099] В некоторых вариантах осуществления DD, происходящий из CA2, содержит по меньшей мере одну мутацию по сравнению с аминокислотной последовательностью CA2 дикого типа, причем эта мутация в отсутствие стимула дестабилизирует DD и по меньшей мере один груз, который функционально связан с DD или SRE, содержащим DD. В присутствии стимула DD и по меньшей мере один груз стабилизированы. В некоторых вариантах осуществления DD, происходящий из CA2, включает в себя одну, две, три, четыре или более мутации, которые в отсутствие стимула дестабилизируют DD и по меньшей мере один функционально связанный груз. В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующее соотношение DD, происходящего из CA2, содержащей по меньшей мере одну мутацию, ниже дестабилизирующего соотношения CA2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующее соотношение DD, происходящего из CA2, содержащей по меньшей мере одну мутацию, выше стабилизирующего соотношения CA2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления DD может содержать одну или несколько дополнительных мутаций, которые не оказывают значительного влияния на дестабилизирующее и стабилизирующее соотношения.

[0100] В некоторых вариантах осуществления мутация может быть консервативной (с физикохимическими свойствами, похожими на аминокислоту в сайте мутации), полуконсервативной (например, отрицательный заряд аминокислоты на положительный) или неконсервативной (аминокислота с другими физикохимическими свойствами, чем у аминокислоты в сайте мутации). В некоторых вариантах осуществления аминокислоту лизин можно подвергнуть мутации в глутаминовую кислоту или аргинин; аминокислоту фенилаланин можно подвергнуть мутации в лейцин; аминокислоту лейцин можно подвергнуть мутации в фенилаланин; или аминокислоту аспарагин можно подвергнуть мутации в серин. Области или части или домены белков дикого типа можно использовать в качестве SRE/DD целиком или частично. Их можно объединять или перемещать для создания новых пептидов, белков, областей или доменов, любой из которых можно использовать в качестве SRE/DD или исходной точки для конструирования дополнительных SRE и/или DD.

[0101] Домены дестабилизации, описанные в данном документе, также могут содержать аминокислотные и нуклеотидные замены, которые не влияют на стабильность, включая консервативные, неконсервативные замены и/или полиморфизмы. В некоторых вариантах осуществления DD CA2, описанными в данном документе, также могут быть фрагменты указанных выше доменов дестабилизации, включая фрагменты, содержащие варианты аминокислотных последовательностей. Предпочтительные фрагменты являются нестабильными в отсутствие стимула и стабилизированными при добавлении стимула. Предпочтительные фрагменты сохраняют способность взаимодействовать со стимулом с такой же эффективностью как DD, описанные в данном документе.

[0102] В одном варианте осуществления SRE содержит область белка CA2. Область белка CA2 может иметь 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 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, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260 или более 260 аминокислот в длину. Область исходного белка может иметь 5-50, 25-75, 50-100, 75-125, 100-150, 125-175, 150-200, 175-225, 200-250, 225-260 аминокислот в длину.

[0103] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлен DD, содержащий целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO 5810) или ее область и дополнительно содержащий мутацию по сравнению с SEQ ID NO 5810, выбранную из A115L, A116Q, A116V, A133L, A133T, A141P, A152D, A152L, A152R, A173C, A173G, A173L, A173T, A23P, A247L, A247S, A257L, A257S, A38P, A38V, A54Q, A54V, A54X, A65L, A65N, A65V, A77I, A77P, A77Q, C205M, C205R, C205V, C205W, C205Y, D101G, D101M, D110I, D129I, D138G, D138M, D138N, D161\*, D161M, D161V, D164G, D164I, D174\*, D174T, D179E, D179I, D179R, D189G, D189I, D19T, D19V, D242G, D242T, D32T, D34T, D41T, D52I, D52L, D71F, D71G, D71K, D71M, D71S, D71Y, D72I, D72S, D72T, D72X, D75T, D75V, D85M, E106D, E106G, E106S, E117\*, E117N, E14N, E186\*, E186N, E204A, E204D, E204G, E204N, E213\*, E213G, E213N, E220K, E220R, E220S, E233D, E233G, E233R, E235\*, E235G, E235N, E237K, E237R, E238\*, E238N, E238R, E26S, E69D, E69K, E69S, F130L, F146V, F175I, F175L, F175S, F178L, F178S, F20L, F20S, F225I, F225L, F225S, F225Y, F230I, F230L, F230S, F259L, F259S, F66S, F70I, F70L, F95Y, G102D, G104R, G104V, G128R, G12D, G12E, G131E, G131R, G131W, G139D, G144D, G144V, G150A, G150S, G150W, G155A, G155C, G155D, G155S, G170A, G170D, G182A, G182W, G195A, G195R, G232R, G232W, G234L, G234V, G25E, G63D, G63V, G81E, G81V, G82D, G86A, G86D, G98V, H107I, H107Q, H119T, H119Y, H122T, H122Y, H15L, H15T, H15Y, H17D, H17I, H36I, H36Q, H64M, H94T, H96T, I145F, I145M, I166H, I166L, I209D, I209L, I215H, I215S, I22L, I255N, I255S, I33S, I59F, I59N, I59S, I91F, K111E, K111N, K112R, K113I, K113N, K126N, K132E, K132R, K148E, K148R, K153\*, K153N, K158E, K158N, K167\*, K169N, K169R, K171Q, K171R, K18R, K212N, K212Q, K212R, K212W, K224E, K224N, K227\*, K227N, K24R, K251E, K251R, K256Q, K260F, K260L, K260Q, K39S, K45N, K45S, K80M, K80R, L118F, L120W, L140V, L140W, L143\*, L147\*, L147F, L156F, L156H, L156P, L156Q, L163A, L163W, L183P, L183S,

L184F, L184P, L188P, L188W, L197\*, L197M, L197P, L197R, L197T, L202F, L202H, L202I, L202P, L202R, L202S, L203P, L203S, L203W, L211\*, L211A, L211S, L223\*, L223I, L223V, L228F, L228H, L228T, L239\*, L239F, L239T, L250\*, L250P, L250T, L44\*, L44M, L47C, L47V, L57\*, L57X, L60S, L79F, L79S, L84W, L90\*, L90V, M240D, M240L, M240R, M240W, N11D, N11K, N124T, N177\*, N177T, N229\*, N229T, N231D, N231F, N231K, N231L, N231M, N231Q, N231T, N243Q, N243T, N252E, N252T, N61R, N61T, N61Y, N62K, N62M, N67D, N67T, P137L, P13A, P13H, P13L, P13S, P154L, P154R, P154T, P180L, P180S, P185L, P185S, P185V, P194Q, P200A, P200L, P200S, P200T, P201A, P201L, P201R, P201S, P214T, P236L, P236T, P246L, P246Q, P249A, P249F, P249H, P249I, P249X, P30L, P30S, P42L, P83A, Q103K, Q135S, Q136N, Q157R, Q157S, Q221A, Q221R, Q248F, Q248L, Q248S, Q254A, Q254K, Q28S, Q53H, Q53K, Q53N, Q74R, Q92H, Q92S, R181H, R181S, R181V, R226H, R226P, R226V, R245A, R253G, R253Q, R27A, R58G, R89D, R89F, R89I, R89X, R89Y, S105L, S105Q, S151A, S151I, S151Q, S165F, S165P, S172E, S172V, S187I, S187P, S196H, S196L, S216A, S216Q, S218A, S218Q, S219A, S219Q, S258F, S258P, S29C, S29P, S43P, S43T, S48L, S50P, S56F, S56N, S56P, S56X, S73L, S73N, S73X, S99H, T108L, T125I, T125P, T168K, T168N, T168Q, T176H, T176L, T192D, T192F, T192I, T192N, T192P, T192X, T198D, T198I, T198P, T199A, T199H, T199P, T207D, T207I, T207P, T207S, T35I, T35L, T37Q, T55L, T87L, V109M, V109W, V121F, V134C, V134F, V142F, V149G, V149L, V159L, V159S, V160C, V160L, V162A, V162C, V206\*, V206C, V206M, V210C, V217L, V217R, V217S, V222A, V222C, V222G, V241G, V241W, V241X, V31L, V49F, V68L, V68W, V78C, W123G, W123R, W16G, W191\*, W191G, W191L, W208G, W208L, W208S, W244\*, W244G, W244L, W97C, W97G, Y114H, Y114M, Y127M, Y190\*, Y190L, Y190T, Y193C, Y193F, Y193I, Y193L, Y193T, Y193V, Y193X, Y40M, Y51F, Y51M, Y51T, Y51X, Y88T, K9N и S29A. В рамках настоящего изобретения «\*» обозначает трансляцию стоп-кодона, а «X» обозначает любую аминокислоту.

[0104] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлен DD, содержащий целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO 5810) или ее область и дополнительно содержащий мутацию по сравнению с SEQ ID NO 5810, выбранную из E106D, G63D, H122Y, I59N, L156H, L183S, L197P, S56F, S56N, W208S, Y193I и Y51T.

[0105] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлен DD, содержащий целую карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO 5810) или ее область и дополнительно содержащий две или более мутации по сравнению с SEQ ID NO 5810. В некоторых вариантах осуществления DD может содержать CA2 (aa 2-260 WT, R27L, H122Y), CA2 (aa 2-260 WT, T87I, H122Y), CA2 (aa 2-260 WT, H122Y, N252D), CA2 (aa 2-260 WT, D72F, V241F), CA2 (aa 2-260 WT, V241F, P249L), CA2 (aa 2-260 WT, D72F, P249L), CA2 (aa 2-260 WT, D71L, L250R), CA2 (aa 2-260 WT, D72F, P249F), CA2 (aa 2-260 WT, T55K, G63N, Q248N), CA2 (aa 2-260 WT, L156H, A257del, S258del, F259del, K260del), CA2 (aa 2-260 WT, L156H, S2del, H3del, H4del, W5del), CA2 (aa 2-260 WT, W4Y, L156H), CA2 (aa 2-260 WT, L156H, G234del, E235del, P236del), CA2 (aa 2-260 WT, L156H, F225L), CA2 (aa 2-260 WT, D70N, D74N, D100N, L156H) (CA2 (aa 2-260 WT, I59N, G102R), CA2 (aa 2-

260 WT, G63D, E69V, N231I), CA2 (aa 2-260 WT, R27L, T87I, H122Y, N252D), CA2 (aa 2-260 WT, D72F, V241F, P249L), CA2 (aa 2-260 WT, D71L, T87N, L250R), CA2 (aa 2-260 WT, L156H, S172C, F178Y, E186D), CA2 (aa 2-260 WT, D71F, N231F), CA2 (aa 2-260 WT, A77I, P249F), CA2 (aa 2-260 WT, D71K, P249H), CA2 (aa 2-260 WT, D72F, P249H), CA2 (aa 2-260 WT, Q53N, N61Y), CA2 (aa 2-260 WT, E106D, C205S), CA2 (aa 2-260 WT, C205S, W208S), CA2 (aa 2-260 WT, S73N, R89Y), CA2 (aa 2-260 WT, D71K, T192F), CA2 (aa 2-260 WT, Y193L, K260L), CA2 (aa 2-260 WT, D71F, V241F, P249L), CA2 (aa 2-260 WT, L147F, Q248F), CA2 (aa 2-260 WT, D52I, S258P), CA2 (aa 2-260 WT, D72S, T192N), CA2 (aa 2-260 WT, D179E, T192I), CA2 (aa 2-260 WT, S56N, Q103K), CA2 (aa 2-260 WT, D71Y, Q248L), CA2 (aa 2-260 WT, S73N, R89F), CA2 (aa 2-260 WT, D71K, N231L, E235G, L239F), CA2 (aa 2-260 WT, D72F, P249I), CA2 (aa 2-260 WT, D72X, V241X, P249X), CA2 (aa 2-260 WT, A54X, S56X, L57X, T192X), CA2 (aa 2-260 WT, Y193V, K260F), CA2 (aa 2-260 WT, G63D, M240L), CA2 (aa 2-260 WT, V134F, L228F), CA2 (aa 2-260 WT, D71G, N231K), CA2 (aa 2-260 WT, S56F, D71S), CA2 (aa 2-260 WT, D52L, G128R, Q248F), CA2 (aa 2-260 WT, S73X, R89X), CA2 (aa 2-260 WT, Y51X, D72X, V241X, P249X), CA2 (aa 2-260 WT, D72I, W97C), CA2 (aa 2-260 WT, D71K, T192F, N231F), CA2 (aa 2-260 WT, H36Q, S43T, Y51F, N67D, G131W, R226H), CA2 (aa 2-260 WT, F70I, F146V), CA2 (aa 2-260 WT, K45N, V68L, H119Y, K169R, D179E), CA2 (aa 2-260 WT, H15L, A54V, K111E, E220K, F225I), CA2 (aa 2-260 WT, P13S, P83A, D101G, K111N, F230I), CA2 (aa 2-260 WT, G63D, W123R, E220K), CA2 (aa 2-260 WT, N11D, E69K, G86D, V109M, K111I, T125I, D138G, G155S), CA2 (aa 2-260 WT, I59N, G102R, A173T), CA2 (aa 2-260 WT, L79F, P180S), CA2 (aa 2-260 WT, A77P, G102R, D138N), CA2 (aa 2-260 WT, F20L, K45N, G63D, E69V, N231I), CA2 (aa 2-260 WT, T199N, L202P, L228F), CA2 (aa 2-260 WT, K9N, H122Y, T168K), CA2 (aa 2-260 WT, Q53H, L90V, Q92H, G131E), CA2 (aa 2-260 WT, L44M, L47V, N62K, E69D), CA2 (aa 2-260 WT, D75V, K169N, F259L), CA2 (aa 2-260 WT, T207S, V222A, N231D), CA2 (aa 2-260 WT, I59F, V206M, G232R), CA2 (aa 2-260 WT, P13A, A133T), CA2 (aa 2-260 WT, I59N, R89I), CA2 (aa 2-260 WT, A65N, G86D, G131R, G155D, K158N, V162A, G170D, P236L), CA2 (aa 2-260 WT, G12R, H15Y, D19V), CA2 (aa 2-260 WT, A65V, F95Y, E106G, H107Q, I145M, F175I), CA2 (aa 2-260 WT, G63D, E69V, N231I), CA2 (aa 2-260 WT, S29A, C205S) и/или CA2 (aa 2-260 WT, S29C, C205S). В рамках настоящего изобретения «X» обозначает любую аминокислоту.

[0106] В некоторых вариантах осуществления DD может содержать CA2 (aa 2-260 WT, R27L, H122Y), CA2 (aa 2-260 WT, T87I, H122Y), CA2 (aa 2-260 WT, H122Y, N252D), CA2 (aa 2-260 WT, D72F, V241F), CA2 (aa 2-260 WT, V241F, P249L), CA2 (aa 2-260 WT, D72F, P249L), CA2 (aa 2-260 WT, D71L, L250R), CA2 (aa 2-260 WT, D72F, P249F), CA2 (aa 2-260 WT, T55K, G63N, Q248N), CA2 (aa 2-260 WT, L156H, A257del, S258del, F259del, K260del), CA2 (aa 2-260 WT, L156H, S2del, H3del, H4del, W5del), CA2 (aa 2-260 WT, W4Y, L156H), CA2 (aa 2-260 WT, L156H, G234del, E235del, P236del), CA2 (aa 2-260 WT, L156H, F225L), CA2 (aa 2-260 WT, D70N, D74N, D100N, L156H) (CA2 (aa 2-260 WT, I59N, G102R), CA2 (aa 2-260 WT, G63D, E69V, N231I), CA2 (aa 2-260 WT, R27L, T87I, H122Y, N252D), CA2 (aa 2-260 WT, D72F, V241F, P249L), CA2 (aa 2-260 WT, D71L, T87N, L250R), CA2 (aa

2-260 WT, L156H, S172C, F178Y, E186D), CA2 (aa 2-260 WT, A77I, P249F), CA2 (aa 2-260 WT, E106D, C205S), CA2 (aa 2-260 WT, C205S, W208S), CA2 (aa 2-260 WT, S73N, R89Y), CA2 (aa 2-260 WT, D71K, T192F), CA2 (aa 2-260 WT, S73N, R89F), CA2 (aa 2-260 WT, G63D, M240L), CA2 (aa 2-260 WT, V134F, L228F) и/или CA2 (aa 2-260 WT, S56F, D71S).

[0107] В некоторых вариантах осуществления CA2 может происходить из карбоангидраз *Homo sapiens*. В некоторых вариантах осуществления DD CA2, описанные в данном документе, могут иметь идентичность последовательностей по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, но менее 100% с конкретным эталонным полинуклеотидом или полипептидом, который определяли с помощью программы выравнивания последовательностей и параметров, описанных в данном документе и известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления эталонным полипептидом может быть SEQ ID NO 5810. Инструменты для выравнивания могут содержать инструменты из набора BLAST Stephen F. Altschul, et al. (1997), «Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs», *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402).

[0108] В некоторых вариантах осуществления DD CA2 могут происходить из карбоангидраз видов, отличных от *Homo sapiens*. В некоторых вариантах осуществления DD CA2 могут происходить из карбоангидраз таких видов как, но без ограничения, *Acinonyx jubatus*, *Ailuropoda melanoleuca*, *Balaenoptera acutorostrata scammoni*, *Callithrix jacchus*, *Callorhinus ursinus*, *Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius*, *Camelus ferus*, *Canis lupus dingo*, *Canis lupus familiaris*, *Carlito syrichta*, *Castor canadensis*, *Cebus capucinus imitator*, *Ceratotherium simum simum*, *Cercocebus atys*, *Chinchilla lanigera*, *Chlorocebus sabaeus*, *Colobus angolensis palliatus*, *Delphinapterus leucas*, *Dipodomys ordii*, *Enhydra lutris kenyonii*, *Equus asinus*, *Equus caballus*, *Equus przewalskii*, *Erinaceus europaeus*, *Eumetopias jubatus*, *Felis catus*, *Galeopterus variegatus*, *Gorilla gorilla gorilla*, *Homo sapiens*, *Ictidomys tridecemlineatus*, *Jaculus jaculus*, *Lagenorhynchus obliquidens*, *Lemur catta*, *Leptonychotes weddellii*, *Lipotes vexillifer*, *Loxodonta africana*, *Macaca fascicularis*, *Macaca mulatta*, *Macaca nemestrina*, *Mandrillus leucophaeus*, *Manis javanica*, *Marmota flaviventris*, *Marmota marmota marmota*, *Microcebus murinus*, *Mus caroli*, *Mus musculus*, *Mus pahari*, *Mustela putorius furo*, *Nannospalax galili*, *Neomonachus schauinslandi*, *Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis*, *Nomascus leucogenys*, *Odobenus rosmarus divergens*, *Orcinus orca*, *Oryctolagus cuniculus*, *Otolemur garnettii*, *Pan paniscus*, *Pan troglodytes*, *Panthera pardus*, *Panthera tigris altaica*, *Papio anubis*, *Physeter catodon*, *Piliocolobus tephrosceles*, *Pongo abelii*, *Propithecus coquereli*, *Puma concolor*, *Rhinopithecus bieti*, *Rhinopithecus roxellana*, *Saimiri boliviensis boliviensis*, *Sus scrofa*, *Theropithecus gelada*, *Trichechus manatus latirostris*, *Tupaia chinensis*, *Tursiops truncatus*, *Urocitellus parryii*, *Ursus arctos horribilis*, *Ursus maritimus*, *Vulpes vulpes* и/или *Zalophus californianus*.

[0109] Стабилизирующее и Дестабилизирующее соотношение SRE

[0110] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлены способы модулирования экспрессии, функции или уровня белка путем измерения

стабилизирующего соотношения и дестабилизирующего соотношения. В рамках настоящего изобретения стабилизирующее соотношение можно определить как соотношение экспрессии, функции или уровня представляющего интерес белка в ответ на стимул и экспрессии, функции или уровня представляющего интерес белка в отсутствие стимула, специфичного для SRE. В некоторых аспектах стабилизирующее соотношение составляет по меньшей мере 1, например, по меньшей мере 1-10, 1-20, 1-30, 1-40, 1-50, 1-60, 1-70, 1-80, 1-90, 1-100, 20-30, 20-40, 20-50, 20-60, 20-70, 20-80, 20-90, 20-95, 20-100, 30-40, 30-50, 30-60, 30-70, 30-80, 30-90, 30-95, 30-100, 40-50, 40-60, 40-70, 40-80, 40-90, 40-95, 40-100, 50-60, 50-70, 50-80, 50-90, 50-95, 50-100, 60-70, 60-80, 60-90, 60-95, 60-100, 70-80, 70-90, 70-95, 70-100, 80-90, 80-95, 80-100, 90-95, 90-100 или 95-100. В рамках настоящего изобретения дестабилизирующее соотношение можно определить как соотношение экспрессии, функции или уровня представляющего интерес белка в отсутствие стимула, специфичного для SRE, и экспрессии, функции или уровня представляющего интерес белка, который экспрессируется постоянно и в отсутствие стимула, специфичного для SRE. В рамках настоящего изобретения «постоянно» относится к экспрессии, функции или уровню представляющего интерес белка, который не связан с SRE и, следовательно, экспрессируется как в присутствии, так и в отсутствии стимула. В некоторых аспектах дестабилизирующее соотношение составляет по меньшей мере 0, например, по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или по меньшей мере 0-0,1, 0-0,2, 0-0,3, 0-0,4, 0-0,5, 0-0,6, 0-0,7, 0-0,8, 0-0,9, 0,1-0,2, 0,1-0,3, 0,1-0,4, 0,1-0,5, 0,1-0,6, 0,1-0,7, 0,1-0,8, 0,1-0,9, 0,2-0,3, 0,2-0,4, 0,2-0,5, 0,2-0,6, 0,2-0,7, 0,2-0,8, 0,2-0,9, 0,3-0,4, 0,3-0,5, 0,3-0,6, 0,3-0,7, 0,3-0,8, 0,3-0,9, 0,4-0,5, 0,4-0,6, 0,4-0,7, 0,4-0,8, 0,4-0,9, 0,5-0,6, 0,5-0,7, 0,5-0,8, 0,5-0,9, 0,6-0,7, 0,6-0,8, 0,6-0,9, 0,7-0,8, 0,7-0,9 или 0,8-0,9.

[0111] В некоторых вариантах осуществления SRE эффекторного модуля может стабилизировать представляющий интерес груз с помощью стабилизирующего соотношения 1 или более, причем стабилизирующее соотношение может представлять собой соотношение экспрессии, функции или уровня представляющего интерес груза в присутствии стимула и экспрессии, функции или уровня представляющего интерес груза в отсутствие стимула.

[0112] В некоторых вариантах осуществления SRE может дестабилизировать груз с помощью дестабилизирующего соотношения от 0 до 0,09, причем дестабилизирующее соотношение может представлять собой соотношение экспрессии, функции или уровня представляющего интерес груза в отсутствие стимула, специфичного для SRE, и экспрессии, функции или уровня представляющего интерес груза, который экспрессируется постоянно и в отсутствие стимула, специфичного для SRE.

### Грузы

[0113] В рамках настоящего изобретения «груз» или «груз-мишень» или «представляющий интерес груз (POI)» определяют как любой белок или нуклеиновую кислоту, функцию которой нужно изменить.

[0114] Грузы могут содержать любой кодирующий или не кодирующий ген или

любой белок или его фрагмент.

[0115] Грузы часто связывают с одним или несколькими SRE, и их можно кодировать отдельно или в комбинации с одним или несколькими SRE в полинуклеотиде согласно раскрытию. сами грузы можно изменять (на уровне белка или нуклеиновой кислоты), тем самым обеспечивая дополнительный уровень стабильности эффекторного модуля. Например, грузы можно сконструировать или спроектировать так, чтобы они содержали мутации, одиночные или многочисленные, которые влияют на стабильность груза или его подверженность разложению, расщеплению или миграции. Комбинация SRE, которые могут иметь спектр реакций на стимул с грузом, который изменяется, проявляя множество ответов или градаций выходных сигналов, например, уровней экспрессии, создает биосхемы, которые превосходят биосхемы в данной области. Способность независимо регулировать как SRE, так и груз значительно увеличивает объем использования эффекторных модулей согласно настоящему раскрытию.

[0116] В рамках настоящего изобретения фраза «полученный из», так как она относится к эффекторным модулям, SRE или грузам означает, что эффекторный модуль, SRE или груз по меньшей мере частично происходит из указанной исходной молекулы или последовательности. Например, при разработке SRE такой SRE можно получить из эпитопа или области природного белка, но затем модифицировать любым способом, описанным в данном документе, для оптимизации функции SRE.

[0117] В одном варианте осуществления груз происходит из области исходного белка или из мутантного белка. Область исходного белка может быть 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 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, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399,

400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450 или более 450 аминокислот в длину. Область исходного белка может быть 5-50, 25-75, 50-100, 75-125, 100-150, 125-175, 150-200, 175-225, 200-250, 225-275, 250-300, 275-325, 300-350, 325-375, 350-400, 375-425 или 400-450 аминокислот в длину.

[0118] В одном варианте осуществления груз происходит из области исходного белка или из мутантного белка и содержит область исходного белка. Груз могут содержать область исходного белка, которая составляет 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-100%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-100%, 10-30%, 20-40%, 30-50%, 40-60%, 50-70%, 60-80%, 70-90%, 80-100%, 10-40%, 20-50%, 30-60%, 40-70%, 50-80%, 60-90%, 70-100%, 10-50%, 20-60%, 30-70%, 40-80%, 50-90%, 60-100%, 10-60%, 20-70%, 30-80%, 40-90%, 50-100%, 10-70%, 20-80%, 30-90%, 40-100%, 10-80%, 20-90%, 30-100%, 10-90%, 20-100%, 25-50%, 50-75% или 75-100% исходного белка или мутантного белка.

[0119] В одном варианте осуществления груз происходит из исходного белка или из мутантного белка и может иметь 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-100%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-100%, 10-30%, 20-40%, 30-50%, 40-60%, 50-70%, 60-80%, 70-90%, 80-100%, 10-40%, 20-50%, 30-60%, 40-70%, 50-80%, 60-90%, 70-100%, 10-50%, 20-60%, 30-70%, 40-80%, 50-90%, 60-100%, 10-60%, 20-70%, 30-80%, 40-90%, 50-100%, 10-70%, 20-80%, 30-90%, 40-100%, 10-80%, 20-90%, 30-100%, 10-90%, 20-100%, 25-50%, 50-75% или 75-100% идентичность с исходным белком или мутантным белком.

[0120] В одном варианте осуществления область трансмембранного домена первого груза можно заменить на трансмембранный домен, его вариант или фрагмент из второго исходного белка.

#### Полипептиды и Полипептиды в качестве грузов

[0121] Стимулы, компоненты биосхем, эффекторные модули, содержащие их SRE и грузы согласно настоящему раскрытию, могут существовать в виде целого полипептида, множества полипептидов или фрагментов полипептидов, которые могут быть независимо закодированы одной или несколькими нуклеиновыми кислотами, множеством нуклеиновых кислот, фрагментами нуклеиновых кислот или вариантами любого из указанного выше.

[0122] В рамках настоящего изобретения термин «полипептид» относится к полимеру аминокислотных остатков (натуральному или ненатуральному), наиболее часто связанных вместе пептидными связями. В рамках настоящего изобретения термин

относится к белкам, полипептидам и пептидам любого размера, структуры или функции. В некоторых случаях кодируемый полипептид меньше приблизительно 50 аминокислот, и тогда полипептид называют пептидом. Если полипептид является пептидом, он будет иметь длину по меньшей мере приблизительно 2, 3, 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных остатков. Таким образом, полипептиды включают в себя генные продукты, природные полипептиды, синтетические полипептиды, гомологи, ортологи, паралоги, фрагменты и другие эквиваленты, варианты и аналоги изложенного выше. Полипептид может быть одиночной молекулой или может представлять собой многомолекулярный комплекс, например, димер, тример или тетрамер. Они также могут содержать одноцепочечные или многоцепочечные полипептиды и могут быть ассоциированы или связаны. Термин полипептид также можно применять к полимерам аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков являются искусственными химическими аналогами соответствующей природной аминокислоты.

[0123] В рамках настоящего изобретения термин «вариант полипептида» относится к молекулам, которые отличаются по своей аминокислотной последовательности от нативной или эталонной последовательности. Варианты аминокислотной последовательности могут иметь замены, делеции и/или вставки в некоторых позициях в аминокислотной последовательности по сравнению с нативной или эталонной последовательностью. Обычно, варианты будут иметь по меньшей мере приблизительно 50% идентичность (гомологию) с нативной или эталонной последовательностью и предпочтительно, они будут по меньшей мере приблизительно на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичны (гомологичны) нативной или эталонной последовательности.

[0124] В некоторых вариантах осуществления представлены «вариантные имитаторы». В рамках настоящего изобретения термин «вариантный имитатор» относится к варианту, который содержит одну или несколько аминокислот, которые будут имитировать активированную последовательность. Например, глутамат может служить имитатором фосфо-треонина и/или фосфо-серина. Альтернативно, варианты имитаторы могут привести к деактивации или к инактивированному продукту, содержащему имитатор, например, фенилаланин может действовать как инактивирующая замена тирозина; или аланин может действовать как инактивирующая замена серина. Аминокислотные последовательности фармацевтических композиций, биосхем, компонентов биосхем, эффекторных модулей, содержащих их SRE или грузы раскрытия, могут содержать природные аминокислоты и, в связи с этим, могут считаться белками, пептидами, полипептидами или их фрагментами. Альтернативно, фармацевтические композиции, биосхемы, компоненты биосхем, эффекторные модули, содержащие их SRE или грузы, могут содержать как природные, так и неприродные аминокислоты.

[0125] В рамках настоящего изобретения термин «вариант аминокислотной последовательности» относится к молекулам с некоторыми отличиями их аминокислотных последовательностей по сравнению с нативной или исходной последовательностью.

Варианты аминокислотной последовательности могут иметь замены, делеции и/или вставки в некоторых позициях в аминокислотной последовательности. В рамках настоящего изобретения термины «нативный» или «исходный» при ссылке на последовательности являются относительными терминами, относящимися на исходной молекуле, с которой можно проводить сравнение. Нативные или исходные последовательности не следует путать с последовательностями дикого типа. Нативные последовательности или молекулы могут быть дикого типа (последовательность, встречающаяся в природе), но не обязательно должны быть идентичны последовательности дикого типа.

[0126] Как правило, варианты будут иметь по меньшей мере приблизительно 70% гомологию с нативной последовательностью, а предпочтительно, они будут по меньшей мере приблизительно на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно на 90% гомологичны нативной последовательности.

[0127] В рамках настоящего изобретения термин «гомология» в приложении к аминокислотным последовательностям определяют как процентная доля остатков в кандидатной аминокислотной последовательности, которые идентичны остаткам в аминокислотной последовательности второй последовательности после выравнивания последовательностей и введения пропусков, если необходимо, для достижения максимального процента гомологии. Способы и компьютерные программы для выравнивания хорошо известны в данной области. Понятно, что гомология зависит от расчета процентной идентичности, но может отличаться по значению из-за пропусков и штрафов, вводимых в расчет.

[0128] В рамках настоящего изобретения термин «гомолог» в приложении к аминокислотным последовательностям означает соответствующую последовательность другого вида, имеющую существенную идентичность со второй последовательностью второго вида.

[0129] В рамках настоящего изобретения термин «аналог» предназначен для охвата вариантов полипептида, которые отличаются одним или несколькими аминокислотными изменениями, например, заменами, добавлениями или делециями аминокислотных остатков, которые все-таки сохраняют свойства исходного полипептида.

[0130] В рамках настоящего изобретения термин «производное» использован как синоним термина «вариант» и относится к молекуле, которая была модифицирована или изменена каким-либо образом относительно эталонной молекулы или исходной молекулы.

[0131] В настоящем раскрытии предусмотрено несколько типов фармацевтических композиций, биосхем, компонентов биосхем, эффекторных модулей, содержащих их SRE или грузы, которые основаны на аминокислотах, включая варианты и производные. К ним относятся варианты и производные с заменами, вставками, делециями и ковалентными связями. В связи с этим, в объем этого раскрытия включены фармацевтические композиции, биосхемы, компоненты биосхем, эффекторные модули, содержащие их SRE или грузы, содержащие замены, вставки, добавления, делеции и/или ковалентные

модификации. Например, к пептидным последовательностям согласно настоящему описанию можно добавить метки последовательности или аминокислоты, например, один или несколько лизинов (например, на N-конце или C-конце). Метки последовательности можно использовать для очистки или локализации пептидов. Лизины можно использовать для увеличения растворимости пептидов или для биотинилирования. Альтернативно, аминокислотные остатки, расположенные в карбокси и аминоконцевых областях аминокислотной последовательности пептида или белка, необязательно можно удалить, обеспечивая усеченные последовательности. Некоторые аминокислоты (например, C-концевые или N-концевые остатки) можно альтернативно удалить в зависимости от использования последовательности, например, экспрессии последовательности в качестве части более крупной последовательности, которая является растворимой или связана с твердой подложкой.

[0132] «Замещающие варианты» применительно к белкам - это те, у которых удален по меньшей мере один аминокислотный остаток в нативной или исходной последовательности и на его место в той же позиции вставлена другая аминокислота. Замены могут быть одиночными, когда в молекуле была заменена только одна аминокислота, или они могут быть множественными, когда в одной и той же молекуле были заменены две или более аминокислоты.

[0133] В рамках настоящего изобретения термин «консервативная аминокислотная замена» относится к замене аминокислоты, которая обычно присутствует в последовательности, другой аминокислотой аналогичного размера, заряда или полярности. Примеры консервативных замен включают замену неполярного (гидрофобного) остатка, такого как изолейцин, валин и лейцин, на другой неполярный остаток. Аналогичным образом, примеры консервативных замен включают замену одного полярного (гидрофильного) остатка на другой, например, между аргинином и лизином, между глутамином и аспарагином и между глицином и серином. Кроме того, замена основного остатка, такого как лизин, аргинин или гистидин, другим или замена одного кислотного остатка, такого как аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота, на другой кислотный остаток являются дополнительными примерами консервативных замен. Примеры неконсервативных замен включают замену неполярного (гидрофобного) аминокислотного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин, аланин, метионин, на полярный (гидрофильный) остаток, такой как цистеин, глутамин, глутаминовая кислота или лизин, и/или полярный остаток для неполярного остатка.

[0134] В рамках настоящего изобретения термин «варианты со вставкой» по отношению к белкам означает варианты, в которых одна или несколько аминокислот встроены непосредственно рядом с аминокислотой в конкретной позиции в нативной или исходной последовательности. В рамках настоящего изобретения термин «непосредственно смежный» относится к соседней аминокислоте, которая связана либо с альфа-карбоксии, либо с альфа-аминогруппой исходной или эталонной аминокислоты.

[0135] В рамках настоящего изобретения термин «варианты с делецией» по

отношению к белкам означает варианты, в которых одна или несколько аминокислот в нативной или исходной аминокислотной последовательности удалены. Обычно варианты с делецией содержат одну или несколько аминокислот, удаленных в определенной области молекулы.

[0136] В рамках настоящего изобретения термин «производные» включает варианты нативного или исходного белка, содержащие одну или несколько модификаций с помощью органических белковых или небелковых дериватирующих средств, а также посттрансляционные модификации. Ковалентные модификации традиционно вводят за счет взаимодействия целевых аминокислотных остатков белка с органическим дериватирующим средством, которое способно реагировать с выбранными боковыми цепями или концевыми остатками, или за счет вовлечения механизмов посттрансляционных модификаций, которые действуют в выбранных рекомбинантных клетках-хозяевах. Полученные ковалентные производные полезны в программах, направленных на идентификацию остатков, важных для биологической активности, для иммуноанализов или для получения антибелковых антител для иммуноаффинной очистки рекомбинантного гликопротеина. Такие модификации доступны обычным специалистам в данной области и выполняются без излишнего экспериментирования.

[0137] В рамках настоящего изобретения термин «сайт», относящийся к вариантам осуществления на основе аминокислот, использован как синоним «аминокислотный остаток» и «боковая цепь аминокислоты». Сайт представляет собой положение в пептиде или полипептиде, которое можно модифицировать, манипулировать, изменять, дериватизировать или изменять в молекулах на основе полипептидов согласно настоящему раскрытию.

[0138] В рамках настоящего изобретения термины «концы» или «конец», применительно к белкам, относятся к концу пептида или полипептида. Такое окончание не ограничено только первым или последним сайтом пептида или полипептида, но может включать дополнительные аминокислоты в концевых областях. Молекулы на основе полипептидов согласно настоящему раскрытию могут быть охарактеризованы как имеющие как N-конец (оканчивающийся аминокислотой со свободной аминогруппой (NH<sub>2</sub>)), так и C-конец (оканчивающийся аминокислотой со свободной карбоксильной группой. (COOH)).

[0139] Полипептиды или белки согласно раскрытию в некоторых случаях состоят из множества полипептидных цепей, объединенных дисульфидными связями или нековалентными силами (мультимеры, олигомеры). Эти виды белков будут иметь несколько N- и C-концов. Альтернативно, концы полипептидов могут быть модифицированы таким образом, чтобы они начинались или заканчивались, в зависимости от обстоятельств, фрагментом, не основанным на полипептидах, таким как органический конъюгат.

[0140] После того, как какая-либо из характеристик была идентифицирована или определена как составная часть компонента системы биосхемы, стимула, эффекторного

модуля, содержащего SRE или грузы согласно раскрытию, любую из нескольких манипуляций и/или модификаций этих функций можно выполнить посредством перемещения, замены, переворота, удаления, рандомизации или дублирования. Кроме того, понятно, что манипулирование признаками может привести к тому же результату, что и модификация композиций согласно раскрытию. Например, манипуляция, включающая удаление домена, приведет к изменению длины молекулы так же, как модификация нуклеиновой кислоты, чтобы кодировать меньшую длину, чем у полноразмерной молекулы.

[0141] Модификации и манипуляции могут быть выполнены способами, известными в данной области, такими как сайт-направленный мутагенез. Затем полученные модифицированные молекулы могут быть протестированы на активность с использованием анализов *in vitro* или *in vivo*, таких как описанные в данном документе, или любого другого подходящего скринингового анализа, известного в данной области.

[0142] В некоторых вариантах осуществления композиции согласно настоящему раскрытию могут содержать один или несколько атомов, которые являются изотопами. В рамках настоящего изобретения термин «изотоп» относится к химическому элементу, который имеет один или несколько дополнительных нейтронов. В некоторых вариантах осуществления соединения согласно настоящему раскрытию могут быть дейтерированными. В рамках настоящего изобретения термин «дейтерат» относится к процессу замены одного или нескольких атомов водорода в веществе изотопами дейтерия. Изотопы дейтерия являются изотопами водорода. Ядро водорода содержит один протон, а ядра дейтерия содержат как протон, так и нейтрон. Фармацевтические композиции, биосхемы, компоненты биосхем, эффекторные модули, содержащие их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию, могут быть дейтерированы для изменения одного или нескольких физических свойств, таких как стабильность, или для обеспечения фармацевтических композиций, биосхем, компонентов биосхем, эффекторных модулей, содержащих их SRE или грузы, для использования в диагностических и/или экспериментальных вариантах применения.

[0143] На уровне белка любой из компонентов биосхем может содержать одну или несколько посттрансляционных модификаций (PTM). Такие PTM могут возникать внутриклеточно после введения компонента биосхемы на основе белка или при или после трансляции компонента биосхемы, вводимого в виде нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный компонент биосхемы.

[0144] Посттрансляционные модификации (PTM) согласно настоящему раскрытию включают, но без ограничения, ацетилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, карбоксилирование, деамидирование, дезаминирование, деацетилирование, дигидроксилирование, дефосфорилирование, формилирование, гамма-карбоксиглутамирование, глутатионилирование, гликирование, метилирование, нитрование, сумоилирование, N- или O-трансглутамирование, гликозилирование и фарнезилирование.

[0145] Эффекторные модули, содержащие их SRE и грузы, могут независимо иметь 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более РТМ, которые являются одинаковыми или разными.

[0146] Эффекторные модули могут быть сконструированы так, чтобы включать один или несколько структурных или функциональных доменов, повторов или мотивов семейства белков. Такие домены, повторы и мотивы классифицируют по семейству белков; и репрезентативные семейства приведены в базе данных EMBL-EBI, расположенной по адресу <http://www.ebi.ac.uk/>.

[0147] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии также могут быть полезны модификации белков, встроенные в структуру композиций согласно раскрытию, чтобы препятствовать процессингу антигена и загрузке пептидов, такие как гликозилирование и пегилирование. Композиции согласно раскрытию также могут быть разработаны для включения неклассических аминокислотных боковых цепей для создания менее иммуногенных композиций. В настоящем раскрытии может быть использован любой из методов снижения иммуногенности, обсуждаемых в международной патентной публикации № WO2005051975 (содержание которого полностью включено посредством ссылки).

[0148] SRE может представлять собой, но без ограничения, пептид, пептидный комплекс, комплекс пептид-белок, белок, белок слияния, белковый комплекс, комплекс белок-белок. SRE может содержать одну или несколько областей, полученных из любого природного или мутантного белка или антитела. В этом аспекте SRE представляет собой элемент, который при ответе на стимул может настраивать внутриклеточную локализацию, внутримолекулярную активацию и/или разрушение грузов.

[0149] В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули согласно настоящему раскрытию могут содержать дополнительные признаки, которые облегчают экспрессию и регуляцию эффекторного модуля, такие как одна или несколько сигнальных последовательностей (SS), один или несколько сайтов расщепления и/или процессинга, один или несколько направляющих и/или проникающих пептидов, одну или несколько меток и/или один или несколько линкеров. Кроме того, эффекторные модули согласно настоящему раскрытию могут дополнительно содержать другие регуляторные фрагменты, такие как индуцибельные промоторы, энхансерные последовательности, сайты микроРНК и/или сайты нацеливания микроРНК. Каждый аспект или настроенная функция может придать эффекторному модулю или биосхеме дифференцированно настроенный признак. Например, SRE может представлять собой домен дестабилизации, в то время как мутации белкового груза могут изменять его сайты расщепления или свойства димеризации или период полужизни, а включение одного или нескольких сайтов связывания микроРНК или микроРНК может придавать признаки отмены нацеливания или миграции клеток. Следовательно, настоящее изобретение охватывает биосхемы, которые являются многофакторными по своей стабильности. Такие биосхемы могут быть спроектированы так, чтобы содержать одну, две, три, четыре или более настроенных признаков.

[0150] В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули согласно

настоящему раскрытию могут содержать один или несколько дегронов для настройки экспрессии. В рамках настоящего изобретения термин «дегрон» относится к минимальной последовательности в белке, достаточной для распознавания и разрушения протеолитической системой. Важным свойством дегронов является то, что они переносимы, то есть добавление дегрона к последовательности приводит к разрушению последовательности. В некоторых вариантах осуществления дегрон может быть добавлен к доменам дестабилизации, грузу или к обоим. Включение дегрона в эффекторный модуль согласно настоящему раскрытию придает дополнительную белковую нестабильность эффекторному модулю и можно использовать для минимизации базальной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления дегрон может быть N-дегроном, фосфодегроном, индуцируемым нагреванием дегроном, фоточувствительным дегроном, кислородзависимым дегроном. В качестве неограничивающего примера дегрон может быть орнитиндекарбоксилазным дегроном, как описано в Takeuchi et al. (Takeuchi J et al. (2008). *Biochem J.* 2008 Mar 1; 410 (2): 401-7; содержание которых полностью включено посредством ссылки). Другие примеры дегронов, используемых в настоящем раскрытии, включают дегроны, описанные в международных патентных публикациях №№ WO2017004022, WO2016210343 и WO2011062962; содержание каждой из которых полностью включено посредством ссылки.

#### Иммунотерапевтические средства

[0151] В некоторых вариантах осуществления грузами могут быть иммунотерапевтические средства, которые вызывают иммунные ответы в организме. Иммунотерапевтическое средство может представлять собой костимуляторную молекулу, такую как CD40L, а также ее фрагменты и варианты. В одном варианте осуществления иммунотерапевтическое средство индуцирует противораковый иммунный ответ в клетке или у субъекта.

[0152] В некоторых вариантах осуществления грузы согласно настоящему раскрытию могут содержать весь или часть человеческого CD40L WT (SEQ ID NO. 6; Uniprot ID: P29965). В рамках настоящего изобретения термин «CD40L WT» относится к последовательности белка CD40L дикого типа человека, которая определена как SEQ ID NO. 6, с учетным номером P29965, имеющей аминокислотную последовательность: MIETYNQTSRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLH EDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQN PQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTF CSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVF VN VTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL.

#### Цитокины и костимуляторные молекулы

[0153] В некоторых вариантах осуществления грузы согласно настоящему раскрытию могут быть цитокинами и их фрагментами, вариантами, аналогами и производными, включая, но без ограничения, интерлейкины, факторы некроза опухоли (TNF), интерфероны (IFN), TGF бета и хемокины. В данной области понятно, что

определенная номенклатура гена и/или белка для одного и того же гена или белка может включать или исключать пунктуацию, такую как тире «-», или символы, такие как греческие буквы. Независимо от того, включены они в данный документ или исключены, значение не должно изменяться, как будет понятно специалисту в данной области. Например, CD40L, CD40 L и CD40LG относятся к одному и тому же белку.

[0154] В некоторых вариантах осуществления цитокины согласно настоящему раскрытию можно использовать для улучшения размножения, выживаемости, устойчивости и активности иммунных клеток, таких как CD8<sup>+</sup> ТЕМ, натуральные клетки-киллеры и инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), используемые для иммунотерапии. В других вариантах осуществления Т-клетки, сконструированные с двумя или более DD-регулируемыми цитокинами, использованы для обеспечения кинетического регулирования активации Т-клеток и ремоделирования микросреды опухоли. В одном аспекте в настоящем раскрытии представлены биосхемы и композиции для минимизации токсичности, связанной с терапией цитокинами. Несмотря на свой успех в уменьшении опухолевой нагрузки, системная терапия цитокинами часто приводит к развитию тяжелых побочных эффектов, ограничивающих дозу. Два фактора способствуют наблюдаемой токсичности: (а) плейотропизм, при котором цитокины влияют на разные типы клеток и иногда оказывают противоположное действие на одни и те же клетки в зависимости от контекста; (б) Цитокины имеют короткий период полужизни в сыворотке и, следовательно, их необходимо вводить в высоких дозах для достижения терапевтического эффекта, который усиливает плейотропные эффекты. В одном аспекте цитокины согласно настоящему раскрытию можно использовать для модуляции экспрессии цитокинов в случае побочных эффектов. В некоторых вариантах осуществления цитокины согласно настоящему раскрытию могут быть сконструированы так, чтобы иметь увеличенную продолжительность жизни или повышенную специфичность для минимизации токсичности.

[0155] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапевтическое средство может представлять собой CD40L (также называемый CD154 и TNFSF5). CD40L принадлежит к суперсемейству TNF и в основном экспрессируется на Т-клетках. CD40L связывается с CD40, экспрессируемым множеством иммунных клеток, и инициирует каскад клеточных ответов в зависимости от типа клеток. CD40L может также связываться с интегрином  $\alpha 5\beta 1$  и интегрином  $\alpha 11\beta 3$ . В некоторых вариантах осуществления CD40L согласно настоящему раскрытию может быть сконструирован так, чтобы связываться только с одним из его партнеров по связыванию, например, CD40. В некоторых аспектах CD40L, описанный в настоящем документе, может быть способен связываться со всеми своими родственными партнерами по связыванию.

[0156] CD40L может связываться с CD40, экспрессируемым, но без ограничения, в антигенпрезентирующих клетках (APC), В-клетках, моноцитах, макрофагах, тромбоцитах, нейтрофилах, дендритных клетках, эндотелиальных клетках и  $\alpha$ SMC (гладкомышечных клетках). Связывание CD40L с CD40, экспрессируемым на дендритных клетках, может

способствовать лицензированию дендритных клеток (DC). DC могут быть преобразованы в функциональное состояние антиген-специфической Т-хелперной клеткой для активации цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток, процесса, называемого лицензированием DC. Участие CD40 в DC приводит к стимуляции DC, о чем свидетельствует поверхностная экспрессия костимулирующих молекул и молекул МНС; выработка провоспалительных цитокинов (например, IL12 и TNF), а также распространение эпитопа.

[0157] В некоторых вариантах осуществления CD40L, регулируемый системами биосхемы, описанными в настоящем документе, можно использовать для терапии солидных иммуногенных опухолей. CD40L может повысить эффективность нацеленных на солидные опухоли Т-клеток в иммуногенных опухолях путем активации адаптивных и врожденных иммунных ответов *in situ*. Могут быть нужны регулируемые системы биосхемы на основе CD40L, описанные в данном документе, поскольку экспрессия эндогенного CD40L в Т-клетках носит временный характер. Кроме того, микросреда опухоли богата шеддазами, которые могут расщеплять эндогенный CD40L, экспрессируемый Т-клетками. Экспрессия экзогенно экспрессируемого конститутивного CD40L может приводить к токсичности для печени и чрезмерной пролиферации В-клеток, что приводит к лимфомам (Schmitz et al (2006) *Hepatology* 44 (2): 430-9, Vonderheide et al. (2007) *J Clin Oncol*. 1; 25 (7): 876-83, Sacco et al. (2000) *Cancer Gene Ther.*; 7 (10): 1299-306); содержание каждого из которых полностью включено посредством ссылки). Конститутивная (нерегулируемая) экспрессия может приводить к CRS, тромбоэмболическим синдромам, аутоиммунным реакциям, AICD из-за гипериммунной стимуляции и опухолевому ангиогенезу, тем самым создавая потребность в биосхемах согласно раскрытию.

[0158] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапевтическое средство может представлять собой мультимер молекул CD40L, такой как, но без ограничения, димер, тример, тетрамер, пентамер, гексамер, септамер или гептамер. В одном варианте CD40L может образовывать тример. Мультимеризация CD40L может усиливать передачу сигналов по оси CD40L/CD40. Связывание тримерного CD40L с CD40 также может инициировать кластеризацию CD40 и активацию TRAF, что в конечном итоге приводит к активации NF-κB.

[0159] CD40L, описанный в настоящем документе, может быть устойчивым к протеиназам и шеддазам, таким как те, что находятся в микросреде опухоли, например, ADAM10 или ADAM17. Повышенная активность ADAM17 в микросреде опухоли была связана с уменьшением передачи сигналов по оси CD40/CD40L (см. Lowe and Corvaia (2016), *Int J Cancer Clin Res*, 3: 058; содержание которого полностью включено посредством ссылки).

[0160] CD40L участвует в презентации антигена дендритных клеток; выработке IL12 и формированию CD8<sup>+</sup> Т-клеточного иммунитета. В настоящем описании можно использовать любой из методов, описанных Curren et al. Для повышения противоопухолевой эффективности CAR с использованием CD40L (Curren et al. *Mol Ther.*

2015 Apr; 23 (4): 769-778; содержание которого полностью включено посредством ссылки). В одном варианте осуществления можно использовать агонистические антитела против CD40. Моноклональные антитела против CD40 продемонстрировали клиническую активность при отсутствии токсического действия.

[0161] В одном варианте осуществления иммунотерапевтическое средство CD40L может происходить из UniProt ID: P29965 (также называемого в данном документе «WT»). Грузы согласно настоящему раскрытию могут быть областью или частью CD40L. Неограничивающие примеры областей CD40L включают, но без ограничения, аминокислоты 113-261 из UniProt ID: P29965, причем цитоплазматический домен, трансмембранный домен и часть внеклеточного домена были удалены из UniProt ID: P29965, оставляя интактными часть внеклеточного домена и рецептор-связывающий домен. В одном варианте осуществления грузом могут быть аминокислоты 14-261 из UniProt ID: P29965, что исключает цитоплазматический хвост CD40L, тем самым потенциально можно снизить интернализацию. В одном аспекте грузом могут быть аминокислоты 14-261 UniProt ID: P29965 с делецией в аминокислотах S110-G116, что делает CD40L устойчивым к расщеплению протеолитическими ферментами.

[0162] В некоторых вариантах осуществления можно сконструировать мутации груза CD40L, так чтобы он не связывался или связывался с пониженным сродством с CD40L, эндогенно экспрессируемым клетками, описанными в настоящем документе. CD40L представляет собой трансмембранный белок типа II, который образует тример на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления тримеризация происходит за счет взаимодействия аминокислотных остатков 47-261 SEQ ID NO. 6. В некоторых вариантах осуществления остатки в пределах 47-261 SEQ ID NO. 6 в грузе CD40L можно подвергать мутации для предотвращения тримеризации (в данном документе называемых «мутантами тримеризации»). В некоторых вариантах осуществления можно подвергать мутации остатки в пределах 116-261 SEQ ID NO. 6. В некоторых аспектах мутации могут допускать избирательную тримеризацию, например, мутант тримеризации CD40L может быть способен связываться с другим мутантным белком тримеризации CD40L, но не с белком CD40L, лишенным мутаций. Сайты тримеризационных мутаций могут быть сайтами в белке CD40L, которые участвуют в тримеризации, определяемой кристаллической структурой тримера CD40L. Позиции в CD40L, которые можно подвергать мутации, включают, но без ограничения, аминокислоты в позиции 125, 170, 172, 224, 226 и/или 227 SEQ ID NO. 6. В некоторых вариантах осуществления мутации груза CD40L для предотвращения его тримеризации эндогенным CD40L могут включать, но без ограничения, Y170G, Y172G, H224G, G226F, G226H, G226W и/или G227F.

[0163] Шеддазы, например, ADAM10/17, присутствующие в микросреде опухоли, могут расщеплять CD40L, тем самым предотвращая успешную активацию CD40 с помощью CD40L. Анализ последовательности CD40L выявляет сайт протеолитического расщепления ADAM10/17. В некоторых вариантах осуществления для уменьшения интернализации может быть сконструирована делеция аминокислот 1-13 в CD40L. Для

удаления сайтов ADAM10/17 также может быть сконструировано удаление аминокислот 110-116 CD40L. Делецию или мутацию остатка метионина в позиции 113 аминокислоты CD40L также можно использовать для уменьшения расщепления ферментами ADAM10/17. В одном варианте осуществления область или часть человеческого белка CD40L может быть заменена последовательностью мышинового белка CD40L для образования белка CD40L, устойчивого к расщеплению под действием ADAM10/17. Любую из последовательностей CD40L, направленных на снижение его отщепления, как описано в публикации патента США US20180085451A1 и/или патенте США US 7495090B2, можно использовать в эффекторных модулях и биосхемах, описанных в данном документе (содержание каждого из которых полностью включено посредством ссылки). CD40L можно привязать к мембране с помощью трансмембранного домена. В одном варианте осуществления CD40L можно привязать к мембране с использованием доменов, производных от CD8, таких как, но без ограничения, трансмембранный домен CD8, шарнирный домен CD8 и/или цитоплазматический хвост CD8.

[0164] В некоторых вариантах осуществления грузом может быть, но без ограничения, CD40L (SEQ ID NO. 5-6) и их кодирующие последовательности, то есть SEQ ID NO. 11-12, соответственно.

#### Химерные антигенные рецепторы (CAR)

[0165] В некоторых вариантах осуществления биосхемы согласно настоящему раскрытию могут содержать химерные антигенные рецепторы (CAR), которые при трансдукции в иммунные клетки (например, Т-клетки и НК-клетки) могут перенаправлять иммунные клетки против мишени (например, опухолевой клетки), которая экспрессирует молекулу, распознаваемую внеклеточным фрагментом-мишенью CAR.

[0166] В рамках настоящего изобретения термин «химерный антигенный рецептор (CAR)» относится к синтетическому рецептору, который имитирует TCR на поверхности Т-клеток. В общем, CAR состоит из внеклеточного направляющего домена, трансмембранного домена/области и внутриклеточного домена передачи сигналов/активации. В стандартном рецепторе CAR компоненты: внеклеточный направляющий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен передачи сигналов/активации построены линейно в виде единого белка слияния. Внеклеточная область содержит направляющий домен/фрагмент (например, scFv), который распознает специфический опухолевый антиген или другие молекулы на поверхности опухолевых клеток. Внутриклеточная область может содержать сигнальный домен комплекса TCR (например, сигнальную область CD3 $\zeta$ ) и/или один или несколько костимулирующих сигнальных доменов, таких как домены из CD28, 4-1BB (CD137) и OX-40 (CD134). Например, «CAR первого поколения» имеет только сигнальный домен CD3 $\zeta$ . В целях увеличения персистенции и пролиферации Т-клеток добавляют костимулирующие внутриклеточные домены, в результате чего появляются CAR второго поколения, имеющие сигнальный домен CD3 $\zeta$  плюс один костимулирующий сигнальный домен, и CAR третьего поколения, имеющие сигнальный домен CD3 $\zeta$  плюс два или более костимулирующих

сигнальных домена. При экспрессии Т-клеткой CAR наделяет Т-клетку антигенной специфичностью, определяемой внеклеточным направляющим фрагментом CAR. В последнее время также нужно добавить один или несколько элементов, таких как хоминговые и суицидные гены, для разработки более компетентной и более безопасной архитектуры CAR, так называемой CAR четвертого поколения.

[0167] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапевтическое средство эффекторного модуля представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). Химерный антиген может содержать внеклеточный фрагмент-мишень; трансмембранный домен; внутриклеточный сигнальный домен; и необязательно один или несколько костимулирующих доменов.

[0168] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен присоединяют к внутриклеточному сигнальному домену через шарнир (также называемый пространственным доменом или спейсером) и трансмембранные области. Шарнир соединяет внеклеточный направляющий домен с трансмембранным доменом, который пересекает клеточную мембрану и соединяется с внутриклеточным сигнальным доменом. Шарнир, возможно, потребуется изменить, чтобы оптимизировать эффективность клеток, экспрессирующих CAR, по отношению к раковым клеткам из-за размера белка-мишени, с которым связывается направляющий фрагмент, а также размера и аффинности самого направляющего домена. После распознавания и связывания направляющего фрагмента с клеткой-мишенью внутриклеточный сигнальный домен приводит к сигналу активации для Т-клетки с CAR, который дополнительно усиливается «вторым сигналом» от одного или нескольких внутриклеточных костимулирующих доменов. Т-клетка с CAR после активации может разрушить клетку-мишень.

[0169] В некоторых вариантах осуществления CAR согласно настоящему раскрытию может быть разделен на две части, каждая часть связана с димеризирующимся доменом, так что входной сигнал, который запускает димеризацию, способствует сборке интактного функционального рецептора. Wu и Lim недавно сообщили о расщепленном CAR, в котором внеклеточный связывающий домен и внутриклеточный сигнальный элемент CD19 разделены и связаны с доменом FKBP и доменом FRB\* (мутант T2089L связывания FKBP-рапамицина), который гетеродимеризуется в присутствии аналога рапамицина AP21967. Сплит-рецептор собирается в присутствии AP21967 и вместе со специфическим связыванием антигена активирует Т-клетки (Wu et al., *Science*, 2015, 625 (6258): aab4077).

[0170] В некоторых вариантах осуществления CAR согласно настоящему раскрытию может быть сконструирован как индуцируемый CAR. Sakemura et al. недавно сообщили о включении в конструкцию CAR CD19 индуцибельной системы Tet-On. CAR CD19 активируется только в присутствии доксицилина (Dox). Sakemura сообщил, что Т-клетки Tet-CD19CAR в присутствии Dox были эквивалентно цитотоксичными по отношению к клеточным линиям CD19+ и вырабатывали эквивалентные цитокины и имели пролиферацию при стимуляции CD19 по сравнению с обычными Т-клетками CD19CAR (Sakemura et al., *Cancer Immuno. Res.*, 2016, 21 июня, предварительная электронная

публикация). В одном примере биосхема может содержать Tet-CAR. В другом примере Tet-CAR может быть грузом эффекторного модуля CA2 под управлением SRE (например, DD CA2), описанных в данном документе. Двойные системы обеспечивают большую гибкость для включения и выключения экспрессии CAR в трансдуцированных Т-клетках.

[0171] Согласно настоящему раскрытию CAR может быть CAR первого поколения, или CAR второго поколения, или CAR третьего поколения, или CAR четвертого поколения. В некоторых вариантах осуществления груз согласно настоящему раскрытию может представлять собой полную конструкцию CAR, состоящую из внеклеточного домена, шарнирного и трансмембранного домена и внутриклеточной сигнальной области. В других вариантах осуществления в биосхемы можно включить компонент полной конструкции CAR, содержащий внеклеточный направляющий фрагмент, шарнирную область, трансмембранный домен, внутриклеточный сигнальный домен, один или несколько костимулирующих доменов и другие дополнительные элементы, улучшающие архитектуру и функциональность CAR, включая, но без ограничения, лидирующую последовательность, хоминговый элемент и предохранительный переключатель или комбинацию таких компонентов.

#### Внеклеточный направляющий домен/фрагмент

[0172] В соответствии с раскрытием внеклеточный целевой фрагмент CAR может быть любым средством, которое распознает и связывается с высокой специфичностью и аффинностью с данной молекулой-мишенью, например, неоантигеном на опухолевых клетках. Фрагмент-мишень может представлять собой антитело и его варианты, которые специфически связываются с молекулой-мишенью на опухолевых клетках, или пептидный аптамер, выбранный из пула случайных последовательностей на основании его способности связываться с молекулой-мишенью на опухолевых клетках, или его вариант или фрагмент, который может связываться с молекулой-мишенью на опухолевых клетках, или домен распознавания антигена из нативного Т-клеточного рецептора (TCR) (например, внеклеточный домен CD4 для распознавания HIV-инфицированных клеток), или экзотические компоненты распознавания, такие как связанный цитокин, который приводит к распознаванию клеток-мишеней, несущих рецептор цитокина или натуральный лиганд рецептора.

[0173] В некоторых вариантах осуществления направляющий домен CAR может представлять собой Ig NAR, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab)'2-фрагмент, F(ab)'3-фрагмент, Fv, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), бис-scFv, (scFv)<sub>2</sub>, минитело, диатело, триотело, тетратело, стабилизированный дисульфидом белок Fv (dsFv), юнитело, нанотело или антигенсвязывающая область, полученная из антитела, которое специфически распознает молекулу-мишень, например, опухолеспецифический антиген (TSA). В одном варианте осуществления направляющий фрагмент представляет собой scFv. Домен scFv, когда он экспрессируется на поверхности CAR Т-клетки и впоследствии связывается с белком-мишенью на раковой клетке, способен поддерживать CAR Т-клетку вблизи раковой клетки и запускать активацию Т-клетки. ScFv может быть получен с

использованием обычных технологий рекомбинантных ДНК и обсуждается в настоящем описании.

[0174] В одном варианте осуществления направляющий фрагмент CAR может распознавать CD19. CD19 представляет собой хорошо известную молекулу поверхности В-клеток, которая при активации рецептора В-клеток усиливает передачу сигналов, индуцированную рецептором В-клеточного антигена, и рост популяций В-клеток. CD19 широко экспрессируется как в нормальных, так и в неопластических В-клетках. Злокачественные новообразования, происходящие из В-клеток, такие как хронический лимфолейкоз, острый лимфолейкоз и многие неходжкинские лимфомы, часто сохраняют экспрессию CD19. Эта почти универсальная экспрессия и специфичность в отношении одной клеточной линии сделали CD19 привлекательной мишенью для иммунотерапии. CD19 человека имеет 14 экзонов, из которых экзоны 1-4 кодируют внеклеточную часть CD19, экзон 5 кодирует трансмембранную часть CD19, а экзоны 6-14 кодируют цитоплазматический хвост. В одном варианте осуществления направляющий фрагмент может содержать scFv, происходящие из переменных областей антитела FMC63. FMC63 представляет собой клон мышиного моноклонального антитела IgG2a, специфичного к антигену CD19, который реагирует с антигеном CD19 на клетках линии В. Эпитоп CD19, распознаваемый антителом FMC63, находится в экзоне 2 (Sotillo et al (2015) *Cancer Discov*; 5 (12): 1282-95; содержание которого полностью включено посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления направляющий фрагмент CAR может происходить из переменных областей других клонов моноклональных антител CD19, включая, но без ограничения, 4G7, SJ25C1, CVID3/429, CVID3/155, H1B19 и J3-119.

[0175] В одном аспекте внеклеточный фрагмент-мишень может представлять собой scFv, полученный из антитела. В одном из аспектов scFv может специфически связываться с антигеном CD19.

#### Внутриклеточные сигнальные домены

[0176] Внутриклеточный домен полипептида слияния CAR после связывания с его молекулой-мишенью передает сигнал эффекторной иммунной клетке, активируя по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций эффекторных иммунных клеток, включая цитолитическую активность (например, секрецию цитокинов) или вспомогательную активность. Следовательно, внутриклеточный домен включает «внутриклеточный сигнальный домен» Т-клеточного рецептора (TCR).

[0177] В некоторых аспектах можно использовать весь внутриклеточный сигнальный домен. В других аспектах можно использовать усеченную часть внутриклеточного сигнального домена вместо интактной цепи при условии, что она передает эффекторный функциональный сигнал.

[0178] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен согласно настоящему раскрытию может содержать сигнальные мотивы, которые известны как мотивы активации иммунорецепторов на основе тирозина (ITAM). Примеры ITAM, содержащих цитоплазматические сигнальные последовательности, включают

последовательности, полученные из TCR CD3 дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В одном примере внутриклеточный сигнальный домен представляет собой сигнальный домен CD3-дзета (CD3 $\zeta$ ).

[0179] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная область согласно настоящему раскрытию дополнительно содержит один или несколько костимулирующих сигнальных доменов, которые обеспечивают дополнительные сигналы эффекторным иммунным клеткам. Эти костимулирующие сигнальные домены в сочетании с сигнальным доменом могут дополнительно улучшить размножение, активацию, память, устойчивость и эффективность уничтожения опухолей у иммунных клеток, сконструированных с помощью CAR (например, CAR T-клеток). В некоторых случаях костимулирующая сигнальная область содержит 1, 2, 3 или 4 цитоплазматических домена одной или нескольких внутриклеточных сигнальных и/или костимулирующих молекул. Костимулирующий сигнальный домен может быть внутриклеточным/цитоплазматическим доменом костимулирующей молекулы, включая, но без ограничения, CD2, CD7, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, ICOS (CD278), GITR (рецептор фактора некроза опухоли, индуцированного глюкокортикоидами), LFA-1 (антиген-1, связанный с функцией лимфоцитов), LIGHT, NKG2C, B7-H3. В одном примере костимулирующий сигнальный домен происходит из цитоплазматического домена CD28. В другом примере костимулирующий сигнальный домен происходит из цитоплазматического домена 4-1BB (CD137). В другом примере костимулирующий сигнальный домен может быть внутриклеточным доменом GITR, как указано в патенте США № 9175308; содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

#### Трансмембранные домены и шарнирные области

[0180] В некоторых вариантах осуществления CAR согласно настоящему раскрытию может содержать трансмембранный домен. В рамках настоящего изобретения термин «трансмембранный домен (ТМ)» в широком смысле относится к аминокислотной последовательности длиной примерно 15 остатков, которая охватывает плазматическую мембрану. Более предпочтительно, трансмембранный домен содержит по меньшей мере 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 или 45 аминокислотных остатков и охватывает плазматическую мембрану. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен согласно настоящему раскрытию может быть получен либо из природного, либо из синтетического источника. Трансмембранный домен CAR может происходить из любого природного мембраносвязанного или трансмембранного белка. Например, трансмембранная область может происходить из (то есть содержать по меньшей мере трансмембранную область (области)) альфа-, бета- или дзета-цепи T-клеточного рецептора, CD3-эпсилон, CD4, CD5, CD8, CD8 $\alpha$ , CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152 или CD154. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен согласно настоящему раскрытию может быть выбран из группы, состоящей из трансмембранного домена CD8 $\alpha$ ,

трансмембранного домена CD4, трансмембранного домена CD28, трансмембранного домена CTLA-4, трансмембранного домена PD-1 и Fc-области человеческого IgG4.

[0181] Альтернативно, трансмембранный домен согласно настоящему раскрытию может быть синтетическим. В некоторых аспектах синтетическая последовательность может содержать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин.

[0182] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен согласно настоящему раскрытию может быть выбран из группы, состоящей из трансмембранного домена CD8 $\alpha$ , трансмембранного домена CD4, трансмембранного домена CD28, трансмембранного домена CTLA-4, трансмембранного домена PD-1 и Fc-области человеческого IgG4. В качестве неограничивающих примеров трансмембранный домен может представлять собой трансмембранный домен CTLA-4, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO 1-5 из международной патентной публикации № WO2014/100385; и трансмембранный домен PD-1, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO 6-8 из международной патентной публикации № WO2014100385; содержание каждой из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0183] В некоторых вариантах осуществления CAR согласно настоящему раскрытию может содержать необязательную шарнирную область (также называемую спейсером). Шарнирная последовательность представляет собой короткую последовательность аминокислот, которая способствует гибкости внеклеточного направляющего домена, который перемещает домен связывания мишени от поверхности эффекторной клетки, чтобы обеспечить надлежащий контакт клетки/клетки, связывание мишени и активацию эффекторной клетки (Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). Шарнирная последовательность может располагаться между направляющим фрагментом и трансмембранным доменом.

[0184] В некоторых вариантах осуществления CAR согласно настоящему раскрытию может содержать один или несколько линкеров между любыми доменами CAR. Линкер может иметь длину от 1 до 30 аминокислот.

[0185] В некоторых вариантах осуществления компоненты, содержащие направляющий фрагмент, трансмембранный домен и внутриклеточные сигнальные домены согласно настоящему раскрытию, могут быть сконструированы в виде единого полипептида слияния.

[0186] В одном варианте осуществления конструкция CAR содержит CD19 scFv (например, CAT13.1E10 или FMC63), спейсер CD8 $\alpha$  или трансмембранный домен и эндодомен 4-1BB и CD3 $\zeta$ . Эти конструкции с CAT13.1E10 могут иметь повышенную пролиферацию после стимуляции *in vitro*, повышенную цитотоксичность в отношении мишеней CD19+ и повышенное взаимодействие эффекторов и мишеней по сравнению с конструкциями с FMC63.

[0187] В некоторых вариантах осуществления груз согласно раскрытию может быть любой из костимулирующих молекул и/или внутриклеточных доменов, описанных в

данном документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии можно использовать одну или несколько костимулирующих молекул, каждая из которых находится под управлением различных SRE. Костимулирующие молекулы, регулируемые SRE, также могут экспрессироваться в сочетании с CAR первого поколения, CAR второго поколения, CAR третьего поколения, четвертого поколения или любой другой конструкции CAR, описанной в данном документе.

#### Тандемный TanCAR (TanCAR)

[0188] В некоторых вариантах осуществления CAR согласно настоящему раскрытию может представлять собой тандемный химерный антигенный рецептор (TanCAR), который способен целенаправленно воздействовать на два, три, четыре или более опухолеспецифических антигенов. В некоторых аспектах CAR представляет собой биспецифический TanCAR, содержащий два направляющих домена, которые распознают два разных TSA на опухолевых клетках. Биспецифический CAR может быть дополнительно определен как содержащий внеклеточную область, содержащую направляющий домен (например, домен распознавания антигена), специфичный для первого опухолевого антигена, и направляющий домен (например, домен распознавания антигена), специфичный для второго опухолевого антигена. В других аспектах CAR представляет собой мультиспецифический TanCAR, который содержит три или более направляющих домена, сконфигурированных в тандемной конфигурации. Пространство между направляющими доменами в TanCAR может составлять от примерно 5 до примерно 30 аминокислот в длину, например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18., 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30 аминокислот.

#### Расщепленный CAR

[0189] В некоторых вариантах осуществления компоненты, содержащие направляющий фрагмент, трансмембранный домен и внутриклеточные сигнальные домены согласно настоящему раскрытию, могут быть разделены на две или более частей таким образом, чтобы они зависели от множества входных сигналов, которые способствуют сборке интактного функционального рецептора. В одном варианте осуществления может быть сконструирована система расщепленного синтетического CAR, в которой сборка активированного рецептора CAR зависит от связывания лиганда с SRE (например, с малой молекулой) и специфического антигена с направляющим фрагментом. В качестве неограничивающего примера расщепленный CAR состоит из двух частей, которые собираются зависимым от малых молекул образом; одна часть рецептора имеет внеклеточный антигенсвязывающий домен (например, scFv), а другая часть имеет внутриклеточные сигнальные домены, такие как внутриклеточный домен CD3 $\zeta$ .

[0190] В других аспектах разделенные части системы CAR могут быть дополнительно модифицированы для усиления сигнала. В одном примере вторая часть цитоплазматического фрагмента может быть прикреплена к плазматической мембране путем встраивания в конструкцию трансмембранного домена (например, трансмембранного домена CD8 $\alpha$ ). Ко второй части системы CAR также может быть

добавлен дополнительный внеклеточный домен, например, внеклеточный домен, который опосредует гомодимеризацию. Эти модификации могут увеличить выходную активность рецептора, то есть активацию Т-клеток.

[0191] В некоторых аспектах две части расщепленной системы CAR содержат домены гетеродимеризации, которые условно взаимодействуют при связывании гетеродимеризующейся небольшой молекулы. По существу, компоненты рецептора собираются в присутствии небольшой молекулы с образованием неповрежденной системы, которая затем может быть активирована путем взаимодействия с антигеном. Любые известные гетеродимеризующиеся компоненты могут быть включены в систему расщепленного CAR. Также могут быть использованы другие низкомолекулярные домены гетеродимеризации, включая, но без ограничения, систему индуцированной гиббереллином димеризации (GID1-GAI), индуцированную триметоприм-SLF димеризацию есDHFR и FKBP (Czlapinski et al., *J Am Chem Soc.*, 2008, 130 (40): 13186-13187) и индуцированную АВА (абсцизовой кислотой) димеризацию доменов PP2C и PYL (Cutler et al., *Annu Rev Plant Biol.* 2010, 61: 651-679). Двойная регуляция с использованием индуцируемой сборки (например, зависящая от лиганда димеризация) и разрушения (например, вызванная доменом дестабилизации деградация CAR) системы расщепленного CAR может обеспечить большую гибкость для регулирования активности Т-клеток, модифицированных CAR.

#### Переключаемый CAR

[0192] В некоторых вариантах осуществления CAR согласно раскрытию может быть переключаемым CAR. Juillerat et al. (Juillerat et al., *Sci. Rep.*, 2016, 6: 18950; содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки) недавно сообщили об регулируемых CAR, которые могут временно включаться в ответ на стимул (например, малую молекулу). В этой конструкции CAR система непосредственно интегрирована в шарнирный домен, который отделяет домен scFv от домена клеточной мембраны в CAR. Такая система позволяет разделить или объединить различные ключевые функции CAR, такие как активация и костимуляция в разных цепях рецепторного комплекса, имитируя сложность нативной архитектуры TCR. Эта интегрированная система может переключать взаимодействие scFv и антигена между состояниями включения/выключения, регулируемые отсутствием/присутствием стимула.

#### Обратимый CAR

[0193] В других вариантах осуществления CAR согласно раскрытию может быть системой обратимого CAR. В этой архитектуре CAR домен LID (индуцированного лигандом разрушения) включен в систему CAR. CAR можно временно подавить путем добавления лиганда домена LID. Комбинация регуляции, опосредованной LID и DD, обеспечивает настраиваемый контроль над постоянно активированными CAR Т-клетками, тем самым снижая тканевую токсичность, опосредованную CAR.

#### Обусловленный активацией CAR

[0194] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе биосхемы могут включать обусловленный активацией химерный антигенный рецептор,

который экспрессируется только в активированной иммунной клетке. Экспрессия CAR может быть связана с обусловленной активацией областью регулирования, которая относится к одной или нескольким последовательностям нуклеиновой кислоты, которые индуцируют транскрипцию и/или экспрессию последовательности, например, CAR под их контролем. Такие обусловленные активацией области регулирования могут быть промоторами генов, которые активируются во время активации эффекторной иммунной клетки, например, промотором IL2 или сайтами связывания NFAT. В некоторых вариантах осуществления активация иммунной клетки может быть достигнута посредством конститутивно экспрессируемого CAR (международная публикация № WO2016126608; содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

#### Полинуклеотиды

Компоненты биосхем, содержащие эффекторные модули, их SRE и грузы, могут быть на основе нуклеиновых кислот. Термин «нуклеиновая кислота» в самом широком смысле включает любое соединение и/или вещество, которые содержат полимер нуклеотидов, например, связанные нуклеозиды. Эти полимеры часто называют полинуклеотидами. Примеры нуклеиновых кислот или полинуклеотидов согласно раскрытию включают, но без ограничения, рибонуклеиновые кислоты (РНК), дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), треозные нуклеиновые кислоты (ТНА), гликолевые нуклеиновые кислоты (GNA), пептидные нуклеиновые кислоты (PNA), заблокированные нуклеиновые кислоты (LNA, включая LNA, имеющую  $\beta$ -D-рибо-конфигурацию,  $\alpha$ -LNA, имеющую  $\alpha$ -L-рибо-конфигурацию (диастереомер LNA), 2'-амино-LNA, имеющую 2'-аминофункционализацию, и 2'-Амино- $\alpha$ -LNA, имеющую 2'-аминофункционализацию) или их гибриды.

[0196] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой информационную РНК (мРНК). В рамках настоящего изобретения термин «информационная РНК» (мРНК) относится к любому полинуклеотиду, который кодирует представляющий интерес полипептид и который способен транслироваться с образованием кодируемого представляющего интерес полипептида *in vitro*, *in vivo*, *in situ* или *ex vivo*. Описанные в данном документе полинуклеотиды могут быть мРНК или любой молекулой нуклеиновой кислоты и могут быть или не быть химически модифицированы.

[0197] Традиционно основные компоненты молекулы мРНК включают по меньшей мере кодирующую область, 5'UTR, 3'UTR, 5'-кэп и поли-А-хвост. Основываясь на этой модульной структуре дикого типа, настоящее раскрытие расширяет объем функциональных возможностей традиционных молекул мРНК, предоставляя конструкции груза, которые поддерживают модульную организацию, но которые содержат одну или несколько структурных и/или химических модификаций или изменений, которые придают полинуклеотиду полезные свойства, например, стабильность функции. В рамках настоящего изобретения термин «структурный» признак или модификация относится к такому признаку или модификации, в которых два или более связанных нуклеозида вставлены, удалены, дублированы, перевернуты или рандомизированы в полинуклеотид

без значительной химической модификации самих нуклеозидов. Поскольку для осуществления структурной модификации химические связи обязательно будут разорваны и преобразованы, структурные модификации имеют химическую природу и, следовательно, являются химическими модификациями. Однако структурные модификации приведут к другой последовательности нуклеотидов. Например, полинуклеотид «АТСГ» может быть химически модифицирован до «АТ-5meC-G». Один и тот же полинуклеотид может быть структурно модифицирован из «АТСГ» в «АТСССГ». В данном документе был вставлен динуклеотид «СС», что привело к структурной модификации полинуклеотида.

[0198] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды согласно настоящему раскрытию могут нести последовательности 5'UTR, которые играют роль в инициации трансляции. Последовательности 5'UTR могут содержать такие особенности, как последовательности Козака, которые, как известно, участвуют в процессе, посредством которого рибосома иницирует трансляцию генов, последовательности Козака имеют консенсус ХССР (A/G) ССАUG, где R представляет собой пурин (аденин или гуанин) на три основания перед стартовым кодоном (AUG), а X представляет собой любой нуклеотид. В одном варианте осуществления последовательность Козака представляет собой ACCGCC. Путем конструирования признаков, которые обычно обнаруживаются в обильно экспрессируемых генах клеток или тканей-мишеней, можно повысить стабильность и продуцирование белка полинуклеотидов согласно настоящему раскрытию.

[0199] Также предоставлены полинуклеотиды, которые могут содержать внутренний сайт входа в рибосому (IRES), который играет важную роль в иницировании синтеза белка в отсутствие 5'-кэп-структуры в полинуклеотиде. IRES может действовать как единственный сайт связывания рибосомы или может служить как один из множества сайтов связывания. Полинуклеотиды согласно раскрытию, содержащие более одного функционального сайта связывания с рибосомами, могут кодировать несколько пептидов или полипептидов, которые независимо транслируются рибосомами, давая начало молекулам бицистронных и/или полицистронных нуклеиновых кислот.

[0200] В одном варианте осуществления полинуклеотиды согласно настоящему раскрытию могут кодировать варианты полипептиды, которые имеют определенную идентичность с эталонной полипептидной последовательностью. В рамках настоящего изобретения термин «эталонная полипептидная последовательность» относится к исходной полипептидной последовательности. Эталонные последовательности могут быть последовательностями дикого типа или любой последовательностью, на которую делается ссылка при разработке другой последовательности.

[0201] Термин «идентичность», известный в данной области, относится к взаимосвязи между двумя или более последовательностями, определяемой путем сравнения последовательностей. В данной области идентичность также означает степень родства последовательностей, определяемую количеством совпадений между цепочками из двух или более остатков (аминокислоты или нуклеиновой кислоты). Идентичность

измеряет процент идентичных совпадений между двумя или более последовательностями с выравниванием пробелов (если таковые имеются), учитываемых конкретной математической моделью или компьютерной программой (то есть «алгоритмами»). Идентичность родственных последовательностей можно легко вычислить известными методами. Такие методы включают, но без ограничения, методы, описанные в Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; and Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).

[0202] В некоторых вариантах осуществления вариантная последовательность может иметь такую же или аналогичную активность, что и эталонная последовательность. Альтернативно, вариант может иметь измененную активность (например, повышенную или пониженную) по сравнению с эталонной последовательностью. Как правило, варианты конкретного полинуклеотида или полипептида согласно раскрытию будут иметь по меньшей мере примерно 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, но менее 100% идентичности последовательности с этим конкретным эталонным полинуклеотидом или полипептидом, которую определяют с помощью программ выравнивания последовательностей и параметров, описанных в настоящем документе, известных специалистам в данной области. К таким инструментам согласования относятся инструменты пакета BLAST (Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402).

#### Химические модификации полинуклеотидов

[0203] Согласно настоящему раскрытию, термины «модификация» или, при необходимости, «модифицированные» полинуклеотиды относятся к модификации в отношении нуклеотидов А, G, U (Т в ДНК) или С.

[0204] Модификации полинуклеотидов согласно раскрытию могут быть в нуклеозидном основании и/или сахарной части нуклеозидов, которые составляют полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления в модифицированную нуклеиновую кислоту или в один или несколько отдельных нуклеозидов или нуклеотидов включены многочисленные модификации. Например, модификации нуклеозида могут содержать одну или несколько модификаций азотистого основания и сахара. Модификации полинуклеотидов согласно настоящему раскрытию могут содержать любые из тех, что описаны, например, в международной публикации WO2013052523, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0205] Как описано в данном документе, «нуклеозид» определен как соединение, содержащее молекулу сахара (например, пентозу или рибозу) или ее производное в

сочетании с органическим основанием (например, пурином или пиримидином) или его производным (также называемым в данном документе «азотистым основанием»). Как описано в данном документе, «нуклеотид» определен как нуклеозид, содержащий фосфатную группу.

[0206] Модифицированные нуклеотиды, которые могут быть включены в полинуклеотид, могут быть модифицированы по межнуклеозидной связи (например, фосфатному остову). В данном документе в контексте полинуклеотидного остова фразы «фосфат» и «фосфодиэфир» использованы взаимозаменяемо. Фосфатные группы основной цепи можно модифицировать, заменяя один или несколько атомов кислорода другим заместителем. Кроме того, модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут включать полную замену немодифицированного фосфатного фрагмента другой межнуклеозидной связью. Примеры модифицированных фосфатных групп включают, но без ограничения, фосфоротиоат, фосфороселенаты, боранофосфаты, сложные эфиры боранофосфата, гидрофосфонаты, фосфорамидаты, фосфородиамидаты, алкил- или арилфосфонаты и фосфотриэфиры. Оба не связанных атома кислорода фосфородитиоатов заменены серой. Фосфатный линкер также может быть модифицирован с заменой связующего кислорода на азот (мостиковые фосфорамидаты), серу (мостиковые фосфоротиоаты) и углерод (мостиковые метиленфосфонаты). Другие модификации, которые могут быть использованы, описаны, например, в международной заявке WO2013052523, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0207] Различные модификации сахара, модификации нуклеотидов и/или межнуклеозидные связи (например, каркасные структуры) могут существовать в полинуклеотиде в разных положениях. Рядовому специалисту в данной области будет понятно, что аналоги нуклеотидов или другие модификации могут быть расположены в любом положении (положениях) полинуклеотида таким образом, чтобы функция полинуклеотида существенно не снижалась. Модификация также может быть 5'- или 3'-концевой модификацией. Полинуклеотид может содержать от примерно 1% до примерно 100% модифицированных нуклеотидов (либо по отношению к общему содержанию нуклеотидов, либо по отношению к одному или нескольким типам нуклеотидов, то есть любому одному или нескольким из A, G, U или C) или любой промежуточный процент (например, от 1% до 20%, от 1% до 25%, от 1% до 50%, от 1% до 60%, от 1% до 70%, от 1% до 80%, от 1% до 90%, от 1% до 95%, от 10% до 20%, от 10% до 25%, от 10% до 50%, от 10% до 60%, от 10% до 70%, от 10% до 80%, от 10% до 90%, от 10% до 95%, от 10% до 100%, от 20% до 25%, от 20% до 50%, от 20% до 60%, от 20% до 70%, от 20% до 80%, от 20% до 90%, от 20% до 95%, от 20% до 100%, от 50% до 60%, от 50% до 70%, от 50% до 80%, от 50% до 90%, от 50% до 95%, от 50% до 100%, от 70% до 80%, от 70% до 90%, от 70% до 95%, от 70% до 100%, от 80% до 90%, от 80% до 95%, от 80% до 100%, от 90% до 95%, от 90% до 100% и от 95% до 100%).

[0208] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит модифицированный пиримидин или пуридин. В некоторых вариантах осуществления

пиримидин или пурин в молекуле полинуклеотида можно заменить на модифицированный урацил или модифицированный уридин от примерно 1% до примерно 100% (например, от 1% до 20%, от 1% до 25%, от 1% до 25%, от 1% до 100%). % до 50%, от 1% до 60%, от 1% до 70%, от 1% до 80%, от 1% до 90%, от 1% до 95%, от 10% до 20%, от 10% до 25%, от 10% до 50%, от 10% до 60%, от 10% до 70%, от 10% до 80%, от 10% до 90%, от 10% до 95%, от 10% до 100%, от 20% до 25%, от 20% до 50%, от 20% до 60%, от 20% до 70%, от 20% до 80%, от 20% до 90%, от 20% до 95%, от 20% до 100%, от 50% до 60%, от 50% до 70%, от 50% до 80%, от 50% до 90%, от 50% до 95%, от 50% до 100%, от 70% до 80%, от 70% до 90%, от 70% до 95%, от 70% до 100%, от 80% до 90%, от 80% до 95%, от 80% до 100%, от 90 до 95%, от 90 до 100% и от 95 до 100% модифицированного пиримидина или пурина.

[0209] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды могут содержать две или более последовательностей компонентов эффекторных модулей, которые расположены по такой схеме, как АВАВАВ, или ААВВААВВААВВ, или АВСАВСАВС, или их варианты, повторяющиеся один, два или более трех раз. В этих схемах каждая буква А, В или С представляет отдельный компонент эффекторного модуля.

[0210] В еще одном варианте осуществления полинуклеотиды могут содержать две или более последовательностей компонентов эффекторных модулей, причем каждый компонент имеет одну или несколько последовательностей. В качестве неограничивающего примера последовательности могут быть расположены по такой схеме, как АВАВАВ, или ААВВААВВААВВ, или АВСАВСАВС, или их варианты, повторяющиеся один, два или более трех раз в каждой из областей. В качестве другого неограничивающего примера последовательности могут быть расположены по такой схеме, как АВАВАВ, или ААВВААВВААВВ, или АВСАВСАВС, или их варианты, повторяющиеся один, два или более трех раз по всему полинуклеотиду. В этих схемах каждая буква А, В или С представляет собой отдельную последовательность или компонент.

#### Выбор кодонов

[0211] В некоторых вариантах осуществления один или несколько кодонов полинуклеотидов согласно настоящему раскрытию могут быть заменены другими кодонами, кодирующими нативную аминокислотную последовательность, чтобы настроить экспрессию SRE, посредством процесса, называемого выбором кодона. Поскольку пулы кодонов мРНК и антикодонов тРНК имеют тенденцию различаться среди организмов, типов клеток, субклеточных местоположений и во времени, отбор кодонов, описанный в данном документе, является пространственно-временным (ST) отбором кодонов.

[0212] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения некоторые полинуклеотидные свойства могут быть оптимизированы по кодонам. Оптимизация кодонов относится к процессу модификации последовательности нуклеиновой кислоты для усиления экспрессии в клетке-хозяине путем замены по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50 или более кодонов нативной последовательности на кодоны, которые наиболее часто использованы в генах этой клетки-хозяина при сохранении нативной аминокислотной

последовательности. Использование кодонов можно измерить с использованием индекса адаптации кодонов (CAI), который измеряет отклонение кодирующей полинуклеотидной последовательности от эталонного набора генов. Таблицы использования кодонов доступны в базе данных использования кодонов (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>), а CAI может быть рассчитан программой EMBOSS CAI (<http://emboss.sourceforge.net/>). Способы оптимизации кодонов известны в данной области и можно использовать в попытках достичь одной или более из нескольких целей. Эти цели включают в себя соответствие частот кодонов в организмах-мишенях и организмах-хозяевах для обеспечения правильной укладки, смещение содержания нуклеотидов для изменения стабильности или уменьшения вторичных структур, минимизации тандемных повторяющихся кодонов или базовых прогонов, которые могут ухудшить конструкцию или экспрессию гена, настройки области регулирования транскрипции и трансляции, вставки или удаления сигнальных последовательностей белка, удаления/добавления сайтов модификации посттрансляционных модификаций в кодируемом белке (например, сайты гликозилирования), добавления, удаления или перетасовки белковых доменов, вставки или удаления сайтов рестрикции, изменения сайтов связывания рибосом и сайтов разрушения, для регулировки скорости трансляции, чтобы обеспечить правильное складывание различных доменов белка или уменьшать или устранять проблемные вторичные структуры в полинуклеотиде. В одном варианте осуществления полинуклеотидная последовательность или ее часть оптимизированы по кодонам с использованием алгоритмов оптимизации. Варианты кодонов для каждой аминокислоты хорошо известны в данной области, как и таблица различных видов для оптимизации экспрессии в этом конкретном виде.

[0213] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения некоторые полинуклеотидные свойства могут быть оптимизированы по кодонам. Например, предпочтительная область для оптимизации кодонов может располагаться перед (5') или после (3') области, кодирующей полипептид. Эти области могут быть включены в полинуклеотид до и/или после оптимизации кодонов области кодирования груза или открытой рамки считывания (ORF).

[0214] После оптимизации (при желании) полинуклеотидные компоненты восстанавливаются и трансформируются в вектор, такой как, но без ограничения, плазмиды, вирусы, космиды и искусственные хромосомы.

[0215] Стоп-кодон полинуклеотидов согласно настоящему раскрытию может быть модифицирован с включением последовательностей и мотивов для изменения уровней экспрессии SRE, грузов и эффекторных модулей согласно настоящему раскрытию. Такие последовательности могут быть включены для индукции считывания стоп-кодона, при этом стоп-кодон может указывать на аминокислоты, например, селеноцистеин или пирролизин. В других случаях стоп-кодона могут быть полностью пропущены для возобновления трансляции через альтернативную открытую рамку считывания. Считывание стоп-кодона можно использовать для настройки экспрессии компонентов эффекторных модулей в

определенном соотношении (например, как диктуется контекстом стоп-кодона). Примеры предпочтительных мотивов стоп-кодонов включают UGAN, UAAN и UAGN, где N представляет собой либо C, либо U.

[0216] Подавление терминации происходит во время трансляции многих вирусных мРНК как средство создания второго белка с удлинённым карбокси-концом. В ретровирусах гены gag и pol кодируются одной мРНК и разделены янтарным терминирующим кодоном UAG. Подавление трансляции янтарного кодона позволяет синтезировать предшественник gag pol. Подавление трансляции опосредуется супрессорными тРНК, которые могут распознавать терминирующие кодоны и вставлять конкретную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе эффекторные модули могут включать в себя терминирующие янтарные кодоны. Такие кодоны можно использовать вместо или в дополнение к последовательностям IRES и p2A в бицистронных конструкциях. Считывание стоп-кодона можно комбинировать с P2A для получения низкого уровня экспрессии последующего гена. В некоторых вариантах осуществления янтарные стоп-кодоны могут быть объединены с экспрессией тРНК или аминоацил тРНК синтетазой для дальнейшего регулирования.

#### Конъюгаты

[0217] В настоящем раскрытии предусмотрено, что композиции согласно настоящему раскрытию могут образовывать комплекс, конъюгировать или образовывать комбинацию с одной или несколькими гомологичными или гетерологичными молекулами. В рамках настоящего изобретения термин «гомологичная молекула» относится к молекуле, которая похожа по меньшей мере по одной из структур или функций относительно исходной молекулы, в то время как «гетерологичная молекула» представляет собой молекулу, которая отличается по меньшей мере одной из структур или функций относительно исходной молекулы. Следовательно, структурные гомологи представляют собой молекулы, которые могут быть по существу структурно идентичными. В некоторых вариантах осуществления такие гомологи могут быть идентичными. Функциональные гомологи представляют собой молекулы, которые могут быть по существу функционально идентичными. В некоторых вариантах осуществления такие гомологи могут быть идентичными.

[0218] Фармацевтические композиции, биосхемы, компоненты биосхем, эффекторные модули, содержащие их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию, могут содержать конъюгаты. Такие конъюгаты согласно настоящему раскрытию могут содержать природные вещества или лиганды, такие как белки (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL), липопротеин высокой плотности (HDL) или глобулин); углеводы (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновую кислоту); или липиды. Конъюгаты также могут быть рекомбинантными или синтетическими молекулами, такими как синтетические полимеры, например, синтетические полиаминокислоты, олигонуклеотид (например, аптамер). Примеры полиаминокислот могут включать полилизин (PLL), поли L-

аспарагиновую кислоту, поли L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола и ангидрида малеиновой кислоты, сополимер поли (L-лактид-сополимер, сополимер малеинового ангидрида), сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида, сополимер N-(2-гидроксипропил) метакриламида (НМРА), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли (2-этилакриловую кислоту), полимеры N-изопропилакриламида или полифосфазин. Примеры полиаминов включают: полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидомиметический полиамин, дендример полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфилин, четвертичную соль полиамина или альфаспиральный пептид.

[0219] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты могут также содержать направляющие группы. В рамках настоящего изобретения термин «направляющая группа» относится к функциональной группе или фрагменту, присоединенному к средству, которое облегчает локализацию средства в нужной области, ткани, клетке и/или белке. Такие направляющие группы могут включать, но без ограничения, направляющие на клетку или ткань средства или группы (например, лектины, гликопротеины, липиды, белки, антитела, которые связываются с определенным типом клеток, таким как клетка почек или другой тип клеток). В некоторых вариантах осуществления направляющие группы могут включать тиреотропины, меланотропины, лектины, гликопротеины, поверхностно-активный белок А, углеводы муцина, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетил-галактозамин, N-ацетил-гулюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липиды, холестерин, стероиды, желчные кислоты, фолаты, витамин В12, биотин, пептид RGD, миметик пептида RGD или аптамер.

[0220] В некоторых вариантах осуществления направляющие группы могут быть белками, например, гликопротеинами или пептидами, например, молекулами, имеющими специфическую аффинность к колиганду, или антителами, например, антителами, которые связываются с определенным типом клеток, такими как раковая клетка, эндотелиальная клетка или костная клетка. Направляющие группы могут также включать гормоны и/или рецепторы гормонов.

[0221] В некоторых вариантах осуществления направляющие группы могут быть любым лигандом, способным нацеливаться на конкретные рецепторы. Примеры включают, но без ограничения, фолат, GalNAc, галактозу, маннозу, маннозо-6-фосфат, аптамеры, лиганды рецептора интегрина, лиганды рецептора хемокина, трансферрин, биотин, лиганды рецептора серотонина, PSMA, эндотелин, GCPII, соматостатин, лиганды LDL и HDL. В некоторых вариантах осуществления направляющие группы представляют собой аптамеры. Такие аптамеры могут быть немодифицированными или содержат любую комбинацию модификаций, раскрытых в данном документе.

[0222] В других вариантах осуществления фармацевтические композиции, биосхемы, компоненты биосхем, эффекторные модули, содержащие их SRE или грузы

согласно настоящему раскрытию, могут быть ковалентно конъюгированы с проникающими в клетку полипептидами. В некоторых вариантах осуществления пептиды, проникающие в клетки, также могут содержать сигнальные последовательности. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты согласно раскрытию могут быть разработаны так, чтобы иметь повышенную стабильность, повышенную трансфекцию клеток и/или измененное биораспределение (например, нацеливание на определенные ткани или типы клеток).

[0223] В некоторых вариантах осуществления конъюгированные фрагменты могут быть добавлены к фармацевтическим композициям, биосхемам, компонентам биосхем, эффекторным модулям, содержащим их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию, таким образом, чтобы они позволяли прикреплять поддающиеся обнаружению метки к мишеням для удаления. Такие поддающиеся обнаружению метки включают, но без ограничения, биотиновые метки, убиквитины, флуоресцентные молекулы, гемагглютинин гриппа человека (HA), с-тус, гистидин (His), маркер, глутатион-S-трансферазу (GST), V5 (парамиксовирус эпитопа вируса 5 обезьянообразных), биотин, авидин, стрептавидин, пероксидазу хрена (HRP) и дигоксигенин.

[0224] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, биосхемы, компоненты биосхем, эффекторные модули, содержащие их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию, могут быть объединены друг с другом или с другими молекулами при лечении заболеваний и/или состояний.

#### Дополнительные Признаки эффекторных модулей

[0225] Эффекторный модуль согласно настоящему раскрытию может дополнительно содержать сигнальную последовательность, которая регулирует распределение представляющего интерес груза, функцию расщепления и/или обработки, которая облегчает отщепление груза от конструкции эффекторного модуля, сигнал целенаправленного воздействия и/или проникания, который может регулировать клеточную локализацию эффекторного модуля, метки и/или одной или нескольких линкерных последовательностей, которые связывают различные компоненты эффекторного модуля.

#### Сигнальные последовательности

[0226] В дополнение к SRE и области груза эффекторные модули согласно раскрытию могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных признаков, например, одну или несколько сигнальных последовательностей.

[0227] Сигнальные последовательности (иногда называемые сигнальными пептидами, направляющими сигналами, целевыми пептидами, последовательностями локализации, транзитными пептидами, лидерными последовательностями или лидерными пептидами) направляют белки (например, эффекторный модуль согласно настоящему раскрытию) в назначенным им клеточные и/или внеклеточные места. Сигнальные последовательности белков играют центральную роль в целенаправленном воздействии и транслокации почти всех секретируемых белков и многих интегральных мембранных белков.

[0228] Сигнальная последовательность представляет собой короткий (длиной 5-30 аминокислот) пептид, присутствующий на N-конце большинства вновь синтезированных белков, которые предназначены для определенного местоположения. Сигнальные последовательности могут распознаваться частицами распознавания сигнала (SRP) и расщепляться с использованием сигнальных пептидаз типа I и типа II. Сигнальные последовательности, полученные из белков человека, могут быть включены в качестве регуляторного модуля эффекторного модуля, чтобы направлять эффекторный модуль в конкретное клеточное и/или внеклеточное место. Эти сигнальные последовательности проверены экспериментально и могут быть отщеплены (Zhang Z. and Henzel W.J.; "Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites"; Protein Sci. 2004, 13:2819-2824).

[0229] В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность может быть, хотя и необязательно, расположена на N-конце или C-конце эффекторного модуля, и может, хотя и не обязательно, отщепляться от нужного эффекторного модуля с получением «зрелого» груза.

[0230] В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность, используемая в данном документе, может исключать метионин в позиции 1 аминокислотной последовательности сигнальной последовательности. Это можно назвать мутацией M1del.

[0231] В дополнение к природным сигнальным последовательностям, таким как секреторируемый белок, сигнальная последовательность может быть вариантом, модифицированным на основе известной сигнальной последовательности белка. Например, в патенте США №: 8258102 и 9133265, Sleep, раскрыта модифицированная сигнальная последовательность альбумина, имеющая сигнал секреции и дополнительный мотив X1-X2-X3-X4-X5, который может увеличивать секрецию белка; в патенте США №: 9279007, Do, раскрыты сигнальные последовательности модифицированных фрагментов связывающего тяжелую цепь белка иммуноглобулина человека (Bip), которые могут усиливать экспрессию и секрецию белка; в патенте США №: 8148494, Leonhartsberger et al., раскрыт сигнальный пептид с сайтом расщепления, который может быть слит с рекомбинантным белком; содержание каждого из которых полностью включено посредством ссылки.

[0232] В некоторых случаях секреторируемые сигнальные последовательности могут быть сигнальными последовательностями цитокинов, такими как, но без ограничения, сигнальная последовательность IL2 или сигнальная последовательность p40.

[0233] В некоторых случаях можно использовать сигнальные последовательности, направляющие представляющий интерес груз на поверхностную мембрану клетки-мишени. Экспрессия груза на поверхности клетки-мишени может быть полезной для ограничения распространения груза в не являющиеся мишенями среды *in vivo*, тем самым потенциально улучшая профиль безопасности грузов. Кроме того, мембранное представление груза может обеспечить физиологическую и качественную передачу сигналов, а также

стабилизацию и повторное использование груза в течение более длительного периода полураспада. Мембранные последовательности могут быть эндогенной сигнальной последовательностью N-концевого компонента представляющего интерес груза. Необязательно, может быть нужно заменить эту последовательность другой сигнальной последовательностью. Сигнальные последовательности могут быть выбраны на основе их совместимости с секреторным путем представляющего интерес типа клеток, так что груз представлен на поверхности T-клетки. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность может представлять собой сигнальную последовательность IgE, сигнальную последовательность CD8a (также называемую лидером CD8a), сигнальную последовательность IL15Ra (также называемую лидером IL15Ra) или сигнальную последовательность M1del CD8a (также называемую лидерной последовательностью M1del CD8).

[0234] Другие варианты сигнальной последовательности, которые можно использовать в настоящем эффекторном модуле, могут включать те, которые обсуждаются в публикации заявки на патент США №: 2007/0141666; публикации заявки на патент PCT №: 1993/018181; содержание каждой из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0235] Другими примерами варианта сигнальных последовательностей могут быть модифицированные сигнальные последовательности, обсуждаемые в патентах США № 8148494; 8258102; 9133265; 9279007; публикации заявки на патент США № 20070141666; и публикация международной заявки на патент № WO1993018181; содержание каждой из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0236] В других примерах сигнальная последовательность может быть гетерогенной сигнальной последовательностью из других организмов, таких как вирус, дрожжи и бактерии, которая может направлять эффекторный модуль в конкретный клеточный сайт, такой как ядро (например, EP 1209450). Другие примеры могут включать сигнальные последовательности аспарагиновой протеазы (NSP24) из *Trichoderma*, которые могут увеличивать секрецию белка слияния, такого как ферменты (например, патент США № 8093016, Cervin and Kim), сигнальные последовательности бактериальных липопротеинов (например, публикация заявки PCT № WO199109952, Lau и Rioux), сигнальные пептиды энтеротоксина II *E.coli* (например, патент США № 6605697, Kwon et al), сигнальную последовательность секреции *E.coli* (например, публикация патента США № US2016090404, Malley et al), сигнальную последовательность липазы из метилотрофных дрожжей (например, патент США № 8975041) и сигнальные пептиды для ДНКаз, происходящих из коринеформных бактерий (например, патент США № 4965197); содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0237] Сигнальные последовательности могут также включать сигналы ядерной локализации (NLS), сигналы ядерного экспорта (NES), сигналы локализации тубуловезикулярной структуры поляризованных клеток (см., например, патент США № 8993742;

Cour et al., *Nucleic Acids Res.* 2003, 31 (1): 393-396; содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки), сигналы внеклеточной локализации, сигналы в субклеточные местоположения (например, лизосома, эндоплазматический ретикулум, гольджи, митохондрии, плазма мембраны и пероксисомы и так далее) (см., например, патент США № 7396811; и Negi et al., *Database*, 2015, 1-7; содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

#### Сайты расщепления

[0238] В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит элемент расщепления и/или процессинга.

[0239] Эффекторный модуль согласно настоящему раскрытию может содержать по меньшей мере один сигнал/сайт расщепления белка. Сигнал/сайт расщепления белка может быть расположен на N-конце, C-конце, в любом пространстве между N- и C-концами, например, но без ограничения, на полпути между N- и C-концами, между N-концом и серединой, между серединой и C-концом, и их комбинации.

[0240] Эффекторный модуль может содержать один или несколько сигналов/сайтов расщепления любых протеиназ. Протеиназы могут быть сериновой протеиназой, цистеиновой протеиназой, эндопептидазой, дипептидазой, металлопротеиназой, глутаминовой протеиназой, треониновой протеиназой и аспарагиновой протеиназой. В некоторых аспектах сайт расщепления может представлять собой сигнальную последовательность фурина, актинидаина, кальпаина-1, карбоксипептидазы А, карбоксипептидазы Р, карбоксипептидазы У, каспазы-1, каспазы-2, каспазы-3, каспазы-4, каспазы-5, каспазы-6, каспазы-7, каспазы-8, каспазы-9, каспазы-10, катепсина В, катепсина С, катепсина G, катепсина H, катепсина К, катепсина L, катепсина S, катепсина V, кластрипина, химазы, химотрипсина, эластазы, эндопротеиназы, энтерокиназы, фактора Ха, муравьиной кислоты, гранзима В, матрикс-металлопептидазы-2, матрикс-металлопептидазы-3, пепсина, протеиназы К, протеазы SUMO, субтилизина, протеазы TEV, термолизина, тромбина, трипсина и TAGzyme.

#### Метки

[0241] В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит белковую метку.

[0242] Белковую метку можно использовать для обнаружения и мониторинга процесса эффекторного модуля. Эффекторный модуль может содержать одну или несколько меток, таких как метка эпитопа (например, метка FLAG или гемагглютинина (НА)). Для представленных эффекторных модулей можно использовать большое количество белковых меток. Они включают, но без ограничения, метки самомеченных полипептидов (например, галогеналкандегалогеназу (halotag2 или halotag7), метку ACP, clip tag, метку MCP, snap tag), метки эпитопа (например, FLAG, НА, His и Myc), флуоресцентные метки (например, зеленый флуоресцентный белок (GFP), красный флуоресцентный белок (RFP), желтый флуоресцентный белок (YFP) и их варианты),

биолюминесцентные метки (например, люциферазу и ее варианты), аффинные метки (например, белковую метку связывания мальтозы (MBP), метка глутатион-S-трансферазы (GST)), метки иммуногенной аффинности (например, белок A/G, IRS, AU1, AU5, glu-glu, KT3, S-tag, HSV, VSV-G, Xpress и V5) и другие метки (например, биотин (малую молекулу), StrepTag (StrepII), SBP, белок-носитель карбоксила биотина (BCCP), eXact, CBP, CYD, HPC, CBD, интеин-хитин-связывающий домен, Trx, NorpA и NusA.

[0243] В других вариантах осуществления метку также можно выбрать из меток, раскрытых в патентах США №№ 8999897; 8357511; 7094568; 5011912; 4851341; и 4703004; публикации патентной заявки США № US2013115635 и US2013012687; и публикации международной заявки № WO2013091661; содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0244] В некоторых аспектах можно использовать множество белковых меток, как одинаковых, так и разных меток; каждая из меток может быть расположена на одном конце N или C, тогда как в других случаях эти метки могут быть расположены на каждом конце.

#### Линкеры

[0245] В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит линкер.

[0246] В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль согласно раскрытию может дополнительно содержать линкерную последовательность. Линкерная область служит главным образом спейсером между двумя или более полипептидами внутри эффекторного модуля. Термин «линкер» или «спейсер» в рамках настоящего изобретения относится к молекуле или группе молекул, которые соединяют две молекулы или две части молекулы, такие как два домена рекомбинантного белка.

[0247] В некоторых вариантах осуществления «линкер» (L), или «линкерный домен», или «линкерная область», или «линкерный модуль», или «пептидный линкер» в рамках настоящего изобретения относятся к олиго- или полипептидной области длиной примерно от 1 до 100 аминокислот, которая связывает вместе любой из доменов/областей эффекторного модуля (также называемого пептидным линкером). Пептидный линкер может иметь длину 1-40 аминокислот, или 2-30 аминокислот, или 20- 80 аминокислот, или 50-100 аминокислот. Длина линкера также может быть оптимизирована в зависимости от типа используемого груза и на основе кристаллической структуры груза. В некоторых случаях может быть предпочтительно выбрана более короткая длина линкера. В некоторых аспектах пептидный линкер состоит из аминокислот, связанных вместе пептидными связями, предпочтительно от 1 до 20 аминокислот, связанных пептидными связями, при этом аминокислоты выбраны из 20 природных аминокислот: глицина (G), аланина (A), валина (V), лейцина (L), изолейцина (I), серина (S), цистеина (C), треонина (T), метионина (M), пролина (P), фенилаланина (F), тирозина (Y), триптофана (W), гистидина (H), лизина (K), аргинина (R), аспартата (D), глутаминовой кислоты (E), аспарагина (N) и глутамина (Q). Одна или несколько из этих аминокислот могут быть гликозилированы, как понятно специалистам в данной области.

[0248] Линкерная последовательность может быть природным линкером, полученным из многодоменного белка. Природный линкер представляет собой короткую пептидную последовательность, которая разделяет два разных домена или мотива в белке.

[0249] В некоторых аспектах линкеры могут быть гибкими или жесткими. В других аспектах линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. В данном контексте термины «расщепляемый линкерный домен или область» или «расщепляемый пептидный линкер» использованы взаимозаменяемо. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность может быть расщеплена ферментативно и/или химически.

[0250] Линкеры согласно настоящему раскрытию также могут быть непептидными линкерами. Например, можно использовать алкильные линкеры, такие как  $-NH-(CH_2)_a-C(O)-$ , где  $a=2-20$ . Эти алкильные линкеры могут быть дополнительно замещены любой нестерически затрудненной группой, такой как низший алкил (например, C1-C6), низший ацил, галоген (например, Cl, Br), CN, NH<sub>2</sub>, фенил и так далее.

#### Направляющие или проникающие пептиды

[0251] В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит направляющий и/или проникающий пептид.

[0252] Небольшие направляющие и/или проникающие пептиды, которые избирательно распознают маркеры клеточной поверхности (например, рецепторы, трансмембранные белки и молекулы внеклеточного матрикса), можно использовать для нацеливания эффекторного модуля на нужные органы, ткани или клетки. Короткие пептиды (5-50 аминокислотных остатков), синтезированные *in vitro*, и природные пептиды или их аналоги, варианты, производные, могут быть включены в эффекторный модуль для размещения эффекторного модуля в нужных органах, тканях и клетках, и/или субклеточных местах внутри клеток.

[0253] В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность и/или проникающий пептид могут быть включены в эффекторный модуль для направления эффекторного модуля в орган- или ткань- или клетку-мишень (например, раковую клетку). В других вариантах осуществления направляющий и/или проникающий пептид может направлять эффекторный модуль в конкретное субклеточное место внутри клетки. В качестве неограничивающих примеров такие направляющие последовательности и/или проникающие пептиды могут включать таковые для нацеливания эффекторного модуля на нужную область центральной нервной системы (например, патент США № 9259432; публикация заявки США № 2015/259392); или жировую ткань (например, патенты США №№ 8067377 и 8710017); или простату (например, патентная публикация США №: 2016/0046668); содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0254] В других вариантах осуществления направляющий и/или проникающий пептид может направлять эффекторный модуль в конкретное субклеточное место внутри клетки. В качестве неограничивающего примера в эффекторный модуль может быть включен направляющий на митохондрии пептид и/или проникающий через

митохондриальную мембрану пептид, чтобы направлять эффекторный модуль в митохондрии клетки. См., например, патенты США №№: 9260495; 9173952 и 9132198; и публикацию заявки США №: 2015/361140; содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0255] Направляющий пептид содержит любое количество аминокислот от примерно 6 до примерно 30 включительно. Пептид может иметь 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот. Обычно направляющий пептид может содержать 25 или меньше аминокислот, например, 20 или меньше, например, 15 или меньше.

[0256] Природные небольшие направляющие и/или проникающие пептиды, которые распознают определенные ткани или клетки, с высокой аффинностью связывают молекулы клеточной поверхности (например, рецепторы, трансмембранные белки), что делает их привлекательными мигрирующими фрагментами. Такие пептиды могут содержать пептидные токсины микробов, насекомых (например, скорпиона, медоносной пчелы, паука), животных (например, змеи) и растений, а также их аналоги, варианты и производные; и секретируемые пептидные гормоны, лиганды и сигнальные пептиды.

[0257] В некоторых аспектах в качестве направляющих пептидов можно использовать аналоги, варианты и производные природных токсинов, которые устраняют их цитотоксическую активность. Экзотоксин - это токсин, выделяемый бактериями. Было показано, что многие экзотоксины связывают определенные клеточные молекулы. Например, энтеротоксины, группа белковых токсинов, продуцируемых и секретируемых бактериальными организмами, связывают слизистые (эпителиальные) клетки стенки кишечника. Энтеротоксины могут включать, но без ограничения, термостабильный энтеротоксин *E. coli* (ST), холерный токсин (CT), термолабильный энтеротоксин *E. coli* (LT), коклюшный токсин (PT), полученный из *Bordetella pertussis*, экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* (ETA), энтеротоксины *Staphylococcus*, дифтерийный токсин, полученный из *Corynebacterium diphtheria*, энтеротоксин NSP4 из ротавируса. Другие экзотоксины включают нейротоксины, поражающие нервную систему, кардиотоксины, поражающие сердце, экзотоксины псевдомонад, ботулинические нейротоксины, токсин шига, шигаподобные токсины 1 и 2, токсины *Clostridium difficile*, токсин *Clostridium perfringens* эпсиолона и токсин сибирской язвы.

[0258] В дополнение к экзотоксинам другие токсины могут включать токсины, выделенные из растений, такие как RIP кукурузы, гелонин, противовирусный белок из ландыша, сапорин, трихсантин, рицин, абрин; у скорпионов, такие как Харибдотоксин; у пауков, такой как PcTx1; у улитки конус, такой как PcTx1; морского анемона, такой как гигантоксин 1; медоносной пчелы, такие как меллитины, группу водорастворимых, катионных, амфипатических альфа-спиральных пептидов из 26 аминокислот, выделенных из ядов медоносной пчелы *Apis mellifera* (западной или европейской или большой медоносной пчелы), *Apis florea* (маленькой или карликовой медоносной пчелы), *Apis dorsata* (гигантской медоносной пчелы) и *Apis cerana* (восточной медоносной пчелы);

токсины змеиного яда, бомбезин, первоначально выделенный из кожи жабы, который связывает рецепторы пептидов, высвобождающих гастрин, пары g-белков (например, BBR-1/2/3) в желудочном тракте и головном мозге. См., например, Suchanek, G., et al., PNAS (1978) 75:701-704; содержание которых полностью включено посредством ссылки.

[0259] Пептиды, гормоны и другие сигнальные пептиды передают важные сообщения для связи между клетками, которые избирательно связываются с клетками, экспрессирующими свои рецепторы с высокой аффинностью. В некоторых аспектах пептидные гормоны могут быть включены в эффекторный модуль. Такие малые пептидные гормоны и сигнальные пептиды могут включать, но без ограничения, адипонектин, гормон, полученный из жировой ткани, сигнальный пептид агути, аллатостатин, амилин, ангиотензин, предсердный натрийуретический пептид, бомбеноподобный пептид, большой гастрин, бетатрофин, брадикинин, кальцитонин, рилизинг-гормон кортикотропина, косинтрофин, эндотелин, энтероглокагон, FGF, FNDC5, фолликулостимулирующий гормон, гастрин, грелин, глюкагон и глюкагоноподобный пептид, гонадотропин, фактор, стимулирующий колонии гранулоцитов, гормон роста, рилизинг-гормон гормона роста, гепцидин, хорионгонадотропин человека, плацентарный лактоген человека, инкретин, инсулин и аналоги инсулина, инсулиноподобный фактор роста, лептин, малый гастрин, лираглутид, лютеинизирующий гормон, меланокортин, минигастрин, альфа-меланоцит-стимулирующий гормон, нейропептид Y, фактор роста нервов (NGF), нейротрофин-3/4, инсулин NPH, орексин, обестатин, остеокальцин, гормон поджелудочной железы, паратироидный гормон, пептидный гормон, пептид YY, пролактин, препрогормон, релакс, ренин, салькатонин, соматостатин (SST), секретин, субстанция P, синкарид, лептины костистости, темпорин, тесаморелин, тиреотропный гормон, урокортин, вазоактивный кишечный пептид (VIP), VGF и вителлогенин.

[0260] Направляющие и проникающие пептиды также могут представлять собой сконструированные биомиметические пептиды и/или химически модифицированные небольшие пептиды. Идентифицированы многочисленные пептиды со специфическими мотивами и последовательностями, которые нацелены на конкретные клетки и ткани с высокой аффинностью и селективностью в нормальных или болезненных условиях. Синтетический направляющий пептид может иметь длину до 30 аминокислот или может быть длиннее. Направляющий пептид обычно содержит по меньшей мере примерно 5 аминокислот, но может иметь меньше, например, 4 аминокислоты или 3 аминокислоты. Обычно направляющий пептид имеет любое количество аминокислот от примерно 6 до примерно 30 включительно. Обычно направляющий пептид может содержать 25 или меньше аминокислот, например, 20 или меньше, например, 15 или меньше.

[0261] Химерный пептид также может быть синтезирован со слитыми аминокислотами из природных белков и искусственных аминокислотных последовательностей.

#### Стимулы

[0262] Биосхемы согласно настоящему раскрытию запускают с помощью одного или

нескольких стимулов. Стимулы включают лиганд, добавленный внешне или эндогенный метаболит, присутствие или отсутствие определенного лиганда, присутствие или действие одного или нескольких эффекторных модулей или градиент концентрации ионов или биомолекул или тому подобное.

#### Лиганды

[0263] В некоторых вариантах осуществления стимул представляет собой лиганд. Лиганды могут быть на основе нуклеиновых кислот, на основе белков, на основе липидов, органических, неорганических или любой их комбинации.

[0264] В некоторых вариантах осуществления лиганд может представлять собой, но без ограничения, белок, пептид, нуклеиновую кислоту, липид, производное липида, стерол, стероид, метаболит, производное метаболита и малую молекулу.

[0265] В некоторых вариантах осуществления стимул представляет собой малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления малые молекулы проницаемы для клеток. В некоторых вариантах осуществления малые молекулы одобрены FDA, безопасны, и их вводят перорально.

[0266] В некоторых вариантах осуществления лиганды связаны с карбоангидразами. В некоторых вариантах осуществления лиганд связан и ингибирует функцию карбоангидразы и в данном документе называется ингибитором карбоангидразы.

[0267] В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой малую молекулу, которая связана с карбоангидразой 2. В одном варианте осуществления небольшая молекула представляет собой ингибитор CA2. Примеры ингибиторов CA2 включают, но без ограничения, целекоксиб, вальдекоксиб, рофекоксиб, ацетазоламид, метазоламид, дорзоламид, бринзоламид, диклофенамид, этоксоламид, зонизамид, дансиламид и дихлорфенамид.

[0268] В некоторых вариантах осуществления лиганды могут содержать части малых молекул, о которых известно, что они опосредуют связывание с CA2. Лиганды также могут быть модифицированы для уменьшения нецелевого связывания с карбоангидразами, отличными от CA2, и увеличения специфического связывания с CA2.

[0269] Лиганды также могут быть выбраны из анализа зависимости активности известного лиганда CA2 от его молекулярной/химической структуры с помощью исследования зависимости структуры-активности (SAR). Для идентификации стабилизирующих лигандов согласно раскрытию можно использовать любой из методов, относящихся к SAR, известных в данной области. SAR можно использовать для улучшения свойств лиганда, таких как специфичность, эффективность, фармакокинетика, биодоступность и безопасность. SAR-анализ известных ингибиторов CA2 также может быть объединен с рентгеновскими лучами высокого разрешения CA2 в комплексе с лигандами.

[0270] В одном варианте осуществления стимулы согласно настоящему раскрытию могут быть одобренными FDA лигандами, способными связываться со специфическими DD или областями-мишенями внутри DD.

[0271] В некоторых вариантах осуществления могут быть предпочтительно выбраны лиганды, которые не влияют на активность иммунной клетки и/или химерного антигенного рецептора в отсутствие SRE.

[0272] В некоторых вариантах осуществления два или более лиганда можно использовать для стабилизации одного и того же элемента ответа на стимул.

#### Конъюгаты лигандов

[0273] В некоторых вариантах осуществления лиганд может образовывать комплекс или связываться с другой молекулой, такой как, но без ограничения, другой лиганд, белок, пептид, нуклеиновая кислота, липид, производное липида, стерол, стероид, метаболит, производное метаболита или малая молекула. В некоторых вариантах осуществления стимул-лиганд входит в комплекс или связывается с одной или несколькими другими молекулами. В некоторых вариантах осуществления стимул-лиганд входит в комплекс или связан с одним или несколькими другими видами и/или несколькими другими молекулами. В некоторых вариантах осуществления стимул-лиганд представляет собой мультимер лиганда того же типа. В некоторых вариантах осуществления мультимер стимул-лиганда содержит 2, 3, 4, 5, 6 или более мономеров.

[0274] Лиганды, такие как малые молекулы, которые, как хорошо известно, связывают белки-кандидаты, могут быть протестированы на предмет их регуляции в белковых ответах. Малые молекулы могут быть клинически одобрены как безопасные и имеющие соответствующую фармацевтическую кинетику и распределение. В некоторых вариантах осуществления стимул представляет собой лиганд домена дестабилизации (DD), например, малую молекулу, которая связывает домен дестабилизации и стабилизирует POI, слитый с доменом дестабилизации.

#### Промотеры

[0275] В некоторых вариантах осуществления композиции согласно раскрытию содержат промотор.

[0276] В рамках настоящего изобретения промотор определен как последовательность ДНК, распознаваемая аппаратом транскрипции клетки, необходимая для инициации специфической транскрипции полинуклеотидной последовательности согласно настоящему раскрытию. Векторы могут содержать нативные или ненативные промоторы, функционально связанные с полинуклеотидами согласно настоящему раскрытию. Выбранные промоторы могут быть сильными, слабыми, конститутивными, индуцибельными, тканеспецифичными, специфичными для стадии развития и/или специфичными для организма. Одним из примеров подходящего промотора является промотор предраннего цитомегаловируса (CMV), такой как, но без ограничения, SEQ ID NO: 5635-5637. Эта последовательность промотора представляет собой сильную конститутивную последовательность промотора, способную управлять высокими уровнями экспрессии полинуклеотидной последовательности, которая функционально связана с ней. Другим примером промотора является фактор роста элонгации-1 альфа (EF-1 альфа), такой как, но без ограничения, SEQ ID NO: 5638-5642. Также могут быть

использованы другие конститутивные промоторы, включая, но без ограничения, вирус 40 обезьяны (SV40), вирус опухоли молочной железы мыши (MMTV), вирус иммунодефицита человека (HIV), длинный концевой повтор (LTR), промотор, промотор вируса лейкемии птиц, немедленный ранний промотор вируса Эпштейна-Барра, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы гена человека, включая, но без ограничения, промотор фосфоглицераткиназы (PGK) (неограничивающие примеры включают SEQ ID NO: 5643-5650), промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина, промотор убиквитина С (Ubc), промотор малого ядерного белка U6 человека и промотор креатинкиназы. В некоторых случаях можно использовать индуцируемые промоторы, такие как, но без ограничения, промотор металлотионина, промотор глюкокортикоида, промотор прогестерона и промотор тетрациклина.

[0277] В некоторых вариантах осуществления оптимальный промотор может быть выбран на основе его способности достигать минимальной экспрессии SRE и грузов согласно раскрытию в отсутствие лиганда и обнаруживаемой экспрессии в присутствии лиганда.

[0278] Дополнительные элементы промотора, например, энхансеры можно использовать для регулирования частоты инициации транскрипции. Такие области могут располагаться на 10-100 пар оснований перед или после стартового сайта. В некоторых случаях два или более промоторных элемента можно использовать для совместной или независимой активации транскрипции.

[0279] В некоторых вариантах осуществления промотор согласно раскрытию может быть промотором Tet-ON. Комбинация системы регуляции транскрипции Tet с DD позволяет одновременно регулировать экспрессию генов и стабильность белка. Любая из систем dual-Tet ON-DD, описанных Pedone et al. (2018) doi: <https://doi.org/10.1101/404699> может быть полезна в настоящем раскрытии (содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

#### Другие регуляторные признаки

[0280] В некоторых вариантах осуществления композиции согласно раскрытию могут включать необязательные адаптеры протеасом. В рамках настоящего изобретения термин «адаптер протеасомы» относится к любой нуклеотидной/аминокислотной последовательности, которая нацелена на добавленный груз для разрушения. В некоторых аспектах адаптеры напрямую нацелены на разрушение груза, тем самым устраняя необходимость в реакциях убиквитинирования. Адаптеры протеасомы можно использовать в сочетании с доменами дестабилизации для снижения базальной экспрессии груза. Примеры адаптеров протеасом включают UbL-домен Rad23 или hHR23b, HPV E7, который с высокой аффинностью связывается как с белком-мишенью Rb, так и с субъединицей S4 протеасомы, что позволяет осуществлять прямое нацеливание на протеасомы в обход механизма убиквитинирования; белка ганкирин, который связывается с Rb и субъединицей S6 протеасомы.

#### Иллюстративные конструкции эффекторного модуля

[0281] Биосхемы согласно настоящему раскрытию могут содержать по меньшей мере один эффекторный модуль, который может содержать по меньшей мере один SRE, полученный из CA2 (называемый «SRE CA2»), который может быть функционально связан по меньшей мере с одним представляющим интерес грузом. Эти типы биосхем и эффекторных модулей упоминаются как «биосхемы CA2» и «эффекторные модули CA2». Кроме того, эффекторный модуль CA2 может содержать дополнительные признаки, включая, но без ограничения, сигнальные последовательности, линкер, спейсеры, метки, маркеры, сайты расщепления и IRES. Любые иллюстративные SRE (например, DD), представляющие интерес грузы, сигнальные последовательности, линкер, спейсеры, метки, маркеры, сайты расщепления и IRES, описанные в данном документе или известные в данной области, могут быть объединены для создания эффекторных модулей CA2 согласно настоящему раскрытию.

#### Представляющие интерес грузы

[0282] В одном варианте осуществления исполнительный модуль CA2 содержит представляющий интерес груз. Представляющий интерес груз может представлять собой полипептид дикого типа, фрагмент полипептида дикого типа и/или содержать одну или несколько мутаций относительно полипептида дикого типа. Неограничивающие примеры представляющего интерес груза показаны в Таблице 7.

**Таблица 7. Представляющие интерес грузы**

Груз	Аминокислота SEQ ID NO.	Нуклеиновая Кислота SEQ ID NO.
CD40L	6	5799
sCD40L (113-261 WT)	5800	5801
CD40L (aa 14-261 WT)	5802	5803
CD40L (aa 14-261 WT (S110-G116) del)	5804	5805
CD40L (H224G, G226F)	6011	6012
CD40L (H224G, G226H)	6013	6014
CD40L (Y172G, G226F)	6015	6016

[0283] В некоторых вариантах осуществления грузы, описанные в настоящем документе, могут быть коэкспрессированы с химерным антигенным рецептором.

[0284] В некоторых вариантах осуществления грузы, описанные в данном документе, могут быть коэкспрессированы с антигенспецифическим Т-клеточным рецептором (TCR).

[0285] Биосхемы CA2 и/или эффекторные модули согласно настоящему раскрытию могут быть моноцистронными или мультицистронными, что означает создание одного (моноцистронного) или более одного (мультицистронного) сообщения (например, представляющего интерес груза). Если генерируются два сообщения, биосхема CA2 или

эффекторный модуль считается бицистронным.

[0286] В одном варианте осуществления по меньшей мере один эффекторный модуль CA2 согласно настоящему раскрытию является моноцистронным.

[0287] В одном варианте осуществления по меньшей мере один эффекторный модуль CA2 согласно настоящему раскрытию является мультицистронным.

[0288] В одном варианте осуществления по меньшей мере один эффекторный модуль CA2 согласно настоящему раскрытию является бицистронным.

[0289] В одном варианте осуществления биосхема CA2 согласно настоящему раскрытию является моноцистронной.

[0290] В одном варианте осуществления биосхема CA2 согласно настоящему раскрытию является мультицистронной.

[0291] В одном варианте осуществления биосхема CA2 согласно настоящему раскрытию является бицистронной.

[0292] В некоторых вариантах осуществления груз может представлять собой белок слияния, содержащий любое из описанных иммунотерапевтических средств и убиквитин. Внутри белка слияния убиквитин может располагаться на N-конце, а иммунотерапевтическое средство может располагаться на C-конце. В одном аспекте само иммунотерапевтическое средство может быть белком слияния, и убиквитин может располагаться между белками слияния. Груз может содержать один убиквитиновый белок или цепочку убиквитиновых белков. Белок убиквитин может быть связан с иммунотерапевтическим средством через одну аминокислоту. Выбор отдельной аминокислоты может зависеть от нужного периода полужизни белка слияния. В одном варианте осуществления иммунотерапевтическим средством может быть IL12.

[0293] В некоторых вариантах осуществления груз может представлять собой целый CD40L или его часть. В одном варианте грузом может быть целый CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых аспектах груз может быть частью CD40L, содержащей: (i) sCD40L (113-261 WT) (SEQ ID NO. 5800); (ii) CD40L (аминокислотные остатки 14-261 WT) (SEQ ID NO: 5802); или (iii) CD40L (аминокислотные остатки 14-261 WT, (S110-G116) del) (SEQ ID NO. 5804).

[0294] В некоторых вариантах осуществления грузом может быть CD40L с одной или несколькими мутациями по сравнению с (i) sCD40L (113-261 WT) (SEQ ID NO. 5800); (ii) CD40L (аминокислотные остатки 14-261 WT) (SEQ ID NO: 5802); или (iii) CD40L (аминокислотные остатки 14-261 WT, (S110-G116) del) (SEQ ID NO. 5804).

[0295] В некоторых вариантах осуществления грузом может быть CD40L с одной или несколькими мутациями по сравнению с CD40L дикого типа (аминокислотная последовательность представлена как SEQ ID NO. 6). В некоторых аспектах CD40L содержит по меньшей мере одну мутацию, такую как, но без ограничения, S110G, F111G, E112S, M113G, Q114G, K115S, Y120G, H125G, Y172G, H224G, G226F, G226H, G226W и G227F. Груз CD40L может содержать две мутации, и мутации могут быть, но без ограничения, H224G и G226F, H224G и G226H, Y172G и G226F или H125 и G227. Груз

CD40L может содержать три мутации, и мутации могут быть, но без ограничения, Y120G, H224G и G226W. Груз CD40L может содержать четыре мутации. Груз CD40L может содержать пять мутаций. Груз CD40L может содержать шесть мутаций, и мутации могут быть, но без ограничения, S110G, F111G, E112S, M113G, Q114G и K115S.

#### CA2 CD40L эффекторные модули

[0296] В некоторых вариантах осуществления CA2 DD, описанные в данном документе, могут быть добавлены к грузу с использованием линкера. В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль согласно настоящему раскрытию содержит линкер между грузом и CA2 DD. Груз может содержать CD40L (SEQ ID NO. 6) или его часть, или CD40L (SEQ ID NO. 6) или его часть, содержащую одну или несколько мутаций относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO. 6. В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 2-260 WT, E106D)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 2-260 WT, G63D)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 2-260 WT, H122Y)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 2-260 WT, I59N)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 2-260 WT, L156H)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 2-260 WT, L183S)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 2-260 WT, L197P)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 2-260 WT, S56F)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 2-260 WT, S56N)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 2-260 WT, W208S)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 2-260 WT, Y193I)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 2-260 WT, Y51T)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В рамках настоящего изобретения термин «aa 2-260 WT» относится к позициям 2-260 аминокислот CA2 дикого типа (SEQ ID NO. 5810), а позиция мутированной аминокислоты в DD CA2 - относительно SEQ ID NO. 5810. В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 1-260 WT, E106D)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 1-260 WT, G63D)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 1-260 WT, H122Y)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 1-260 WT, I59N)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 1-260 WT, L156H)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 1-260 WT, L183S)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6).

В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 1-260 WT, L197P)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 1-260 WT, S56F)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 1-260 WT, S56N)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 1-260 WT, W208S)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 1-260 WT, Y193I)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль содержит CA2 (aa 1-260 WT, Y51T)-линкер-CD40L (SEQ ID NO. 6). В рамках настоящего изобретения термин «aa 1-260 WT» относится к позициям 1-260 аминокислот CA2 дикого типа (SEQ ID NO. 5810), а позиция мутированной аминокислоты в DD CA2 относительно SEQ ID NO. 5810.

[0297] В некоторых вариантах осуществления DD CA2, описанные в данном документе, могут быть добавлены к CD40L с использованием любого из компонентов, описанных в таблице 8. В таблице 9 представлены DD CA2, добавленные к грузам CD40L. Эффекторные модули CA2 CD40L, кроме того, могут быть функционально связаны с любым из CAR, описанных в данном документе. Конструкции CA2 CD40L в тандеме с CD19 CAR представлены в Таблице 9. Любой из DD, описанных в данном документе, может быть объединен с компонентами конструкции в Таблице 8 для получения регулируемых конструкций CD40L, перечисленных в Таблице 9. В Таблице 9 «\*» представляет трансляцию стоп-кодона.

Таблица 8. CA2 CD40L и CA2 CD40L с компонентами конструкции CAR

Компонент	AA SEQ ID NO.	NA SEQ ID NO.
CD8 $\alpha$ лидер (Без MET)	6004	6005
Линкер (GS)	GS	GGATCA; GGATCC
Линкер (G4S)3	3528	3532
Линкер (GS)15	5968	5969
Линкер (GSG) (ВamH1-Gly)	GSG	GGATCAGGA
Линкер (MH)	MH	ATGCAT
Линкер (GGSGGGSGGGSG)	5806	5807;6009 6009
Линкер (GGS)	GGS	GGAGGATCC
eGFP (A206K)	6021	6022
CD40L	6	5799
CD40L (H224G, G226F)	6011	6012
CD40L (H224G, G226H)	6013	6014

CD40L (Y172G, G226F)	6015	6016
CD40L (Y170G, H224G, G226W)	6017	6018
CD40L (H125G, G227F)	6019	6020
CD40L (S110G, F111G, E112S, M113G, Q114G, K115S)	6069	6070
CA2 (L156H)	5761	5762
CA2 (aa 2-260 WT, I59N, G102R)	5757	5758
CA2 (aa 2-260 WT, L156H)	5759	5760
CA2 (aa 2-260 WT, G63D, E69V, N231I)	5867	5868
CA2 (aa 2-260 WT, S56N)	5657	5658
CA2 (aa 2-260 WT, D72F, V241F, P249L)	5662	5663
CA2 (aa 2-260 WT, D71L, T87N, L250R)	5669	5670
CA2 (aa 2-260 WT, L183S)	5671	5672
CA2 (aa 2-260 WT, L156H, S172C, F178Y, E186D)	5875	5876
CA2 (aa 2-260 WT, R27L, T87I, H122Y, N252D)	5821	5822
CA2 (aa 2-260 WT, L197P)	5879	5880
Метка FLAG	3481	3482
Метка HA	3493	3494
CD19 scFV	204	210
Шарнир и Трансмембранный домен CD8a	1021	1022; 1023
Трансмембранный домен CD8a	1224	1225
Шарнир CD8	1011	1012
Внутриклеточный домен 4-1BB	1259	1266
Внутриклеточный домен CD3 дзета	1145	1151
Сайт расщепления P2A	3449	3450

Таблица 9. CD40L CA2 и CD40L CA2 с конструкциями CAR

ID	AA Последовательность	AA SEQ ID NO.	NA SEQ ID NO.
OT-001990 (CA2 (L156H); Линкер (GGSGGGSGGGSG) ; CD40L; стоп-кодон)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQ SPVDIDTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRI LNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF	5808	5809

	LKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFT NFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPLLEC WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKGSG GGSGMIETYNQTSRPAATGLPISMK LLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLD NLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLL SQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEM NPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEK SNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYA SNREASSQAPFIASLCLKSPGRFER THSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGAS VFNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*		
OT-002072 (Met; CA2 (aa 2-260 WT, I59N, G102R); Линкер (GSG); CD40L; стоп-кодон)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQ SPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRN LNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGLDGT RLIQHFHWGSLDRQGSEHTVDKCKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVL LKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFT NFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPLLEC WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKGSGMIET YNQTSRPAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQ MIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFV MKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVK DIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAH VISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTL ENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASS QAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKP CGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPSQV SHGTGFTSFGLLKL*	6023	6024
OT-002073(Met; CA2 (aa 2-260 WT, L156H); Линкер (GSG); CD40L; стоп-	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQ SPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRI LNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGLDGT RLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKCKYAAE	6025	6026

кодон)	<p>LHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF  LKVGSAPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFT  NFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTPPLLECVT  WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNGEPEE  LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKGSGMIET  YNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQ  MIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVF  MKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVK  DIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAH  VISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTL  ENGLKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCNREASS  QAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKP  CGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPSQV  SHGTGFTSFGLLKL*</p>		
<p>OT-001968 (CA2 (aa  2-260 WT, G63D,  E69V, N231I);  линкер  (GGSGGGSGGGSG)  ; CD40L; стоп-  кодон)</p>	<p>MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQ  SPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRI  LNNDHAFNVVFDSDQDKAVLKGGLDGT  RLIQHFHFWGSLDGQSEHTVDKCKYAAE  LHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF  LKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFT  NFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTPPLLECVT  WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFIGEPEEL  MVDNWRPAQPLKNRQIKASFKGSGGGSG  GGSGMIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYL  LTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERN  LHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKS  QFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQ  NPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMS  SNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFC  SNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAAN  THSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFN  VTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*</p>	6027	6028
<p>OT-002074 (Met;  CA2 (aa 2-260 WT,  S56N); Линкер</p>	<p>MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQ  SPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATNLRI  LNNGHAFNVEFDSDQDKAVLKGGLDGT</p>	6029	6030

((GGSG)3); CD40L; стоп-кодон)	RLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKCKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF LKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFT NFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVT WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKGGSGGGS GGSGMIETYNQTSRPAATGLPISMKIFMY LLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDER NLHEDFVFMKTIQRCNTGERSL SLLNCEEIK SQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQ NPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMM SNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFC SNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAAN THSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFN VTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*		
OT-002075 (Met; CA2 (aa 2-260 WT, D72F, V241F, P249L) Линкер ((GGSG)3); CD40L); стоп-кодон	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQ SPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRI LNNGHAFNVEFDFSQDKAVLKGGLDGT RLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKCKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF LKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFT NFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVT WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEE LMFDNWRPAQLLKNRQIKASFKGGSGGGS GGSGMIETYNQTSRPAATGLPISMKIFMY LLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDER NLHEDFVFMKTIQRCNTGERSL SLLNCEEIK SQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQ NPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMM SNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFC SNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAAN THSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFN VTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*	6031	6032
OT-002076 (Met; CA2 (aa 2-260 WT,	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQ SPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRI	6033	6034

D71L, T87N, L250R); Линкер ((GGSG)3); CD40L; стоп-кодон)	LNNGHAFNVEFLDSQDKAVLKGGLDGN RLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKCKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQPPDGLAVLGIF LKVGSAKPLQKVVDVLDSIKTKGKSADFT NFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN LMVDNWRPAQPRKNRQIKASFKGGSGG GGSGMIETYNQTSRPAATGLPISMKIF LLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRDLKIE NLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCE SQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQK NPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGY SNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQV SNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILL THSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASV VTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*		
OT-002077 (Met; CA2 (aa 2-260 WT, L183S); Линкер ((GGSG)3); CD40L; стоп-кодон)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQ SPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRI LNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGLDGT RLIQHFHWGSLDGQGSEHTVDKCKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQPPDGLAVLGIF LKVGSAKPLQKVVDVLDSIKTKGKSADFT NFDPRGSLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKGGSGG GGSGMIETYNQTSRPAATGLPISMKIF LLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRDLKIE NLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCE SQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQK NPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGY SNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQV SNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILL THSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASV VTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*	6035	6036
OT-001970 (Met;	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQ	6037	6038

<p>CA2 (aa 2-260 WT, L156H, S172C, F178Y, E186D); линкер (GGSGGGSGGGSG); CD40L; стоп-кодон)</p>	<p>SPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRI LNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF LKVGSAPGHQKVVDVLDSIKTKGKCADF TNYDPRGLLPDSLWYWTYPGSLTTPPLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN GEGEP EELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKGGSGG GSGGGSGMIETYNQTS PRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQ MIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDF VFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQ FEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKG DQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEK GYYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGL YYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASL CLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCG QQSIHLGGVFELQPGASV FVNVTDPS QVSHGTGFTSFGLLKL*</p>		
<p>OT-001971 (Met; CA2 (aa 2-260 WT, R27L, T87I, H122Y, N252D); линкер (GGSGGGSGGGSG); CD40L; стоп-кодон)</p>	<p>MSHHWGYGKHNHNGPEHWHKDFPIAKGELQS PVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRIL NNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGIYR LIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAEL HLVYWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFL KVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTN FDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLECVT WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN GEGEP EELMVDNWRPAQPLKDRQIKASFKGGSGGGG GGSGMIETYNQTS PRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQ MIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDF VFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQ FEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQ NPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEK GYYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGL YYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASL CLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCG QQSIHLGGVFELQPGASV FVNVTDPS QVSHGTGFTSFGLLKL*</p>	6039	6040

<p>OT-001969 (Met; CA2 (aa 2-260 WT, L197P); линкер (GGSGGGSGGGSG) ; CD40L; стоп- кодон)</p>	<p>MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQ SPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRI LNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPLDGT YRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDK KKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQ QPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFT NFDPRGLLPESLDYWTYPGSPTTP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFR KLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQ PLKNRQIKASFKGGSGGGSGGGSG MIETYNQTS PRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLIT QMIGSALFAVYLHRRLDKIEDER NLHEDFVFMKTIQRCNTGERSL SLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEE TKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISE ASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNL VTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQV TFC SNREASSQAPFIASLCLKSPGR FERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHL GGVFELQPGASVFNVTDPSQVSHG TGFTSFGLLKL*</p>	6041	6042
<p>OT-002155 (Met; CA2 (aa 2-260 WT); Линкер ((GGSG)3); CD40L; стоп-кодон)</p>	<p>MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQ SPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRI LNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPLDGT YRLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDK KKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQ QPDGLAVLGIFLKVGS AKPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFT NFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTP LLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFR KLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQ PLKNRQIKASFKGGSGGGSGGGSG MIETYNQTS PRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLIT QMIGSALFAVYLHRRLDKIEDER NLHEDFVFMKTIQRCNTGERSL SLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEE TKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISE ASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNL VTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQV TFC SNREASSQAPFIASLCLKSPGR FERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHL GGVFELQPGASVFN</p>	6043	6044

		VTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*		
OT-002083	(Met; CA2 (aa 2-260 WT, L156H); Линкер ((GGSG)3); CD40L (H224G, G226F); стоп-кодон	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQ SPVDIDHTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRI LNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF LKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFT NFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKAS FKGGSGGSGGGSGMIETYNQTS PRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLIT QMIGSALFAVYLHRRLDKIEDER NLHEDFVFMKTIQRCNTGERSL LLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEE TKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISE ASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLV TLENGKQLTVKRQGLYYIYAQV TFC SNREASSQAPFIASLCLKSPGR FERILLRAANTHSSAKPCGQQSIGL FGVFELQPGASVFNVTDPSQVSH GTGFTSFGLLKL*	6045	6046
OT-002084	(Met; CA2 (aa 2-260 WT, L156H); Линкер ((GGSG)3); CD40L (H224G, G226H); стоп-кодон	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQ SPVDIDHTHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRI LNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGPLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF LKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFT NFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKAS FKGGSGGSGGGSGMIETYNQTS PRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLIT QMIGSALFAVYLHRRLDKIEDER NLHEDFVFMKTIQRCNTGERSL LLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEE TKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISE ASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLV TLENGKQLTVKRQGLYYIYAQV TFC SNREASSQAPFIASLCLKSPGR FERILLRAAN	6047	6048

		THSSAKPCGQQSIGLHG VFELQPGASV FVN VTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*		
OT-002085 (Met; CA2 (aa 2-260 WT. L156H); Линкер (GGS); EGFP (A206K); Линкер ((GGS)3); CD40L; стоп-кодон)		MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQ SPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRI LNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPLDGTY RLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF LKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFT NFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VT WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN GEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKGGSMVSK GEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEG EGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTT LTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGY VQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNR IELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIM ADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQ QNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNE KRDHMLLEFVTAAGITLGMDEL YKGGSG GGSGGGSGMIETYNQTS PRSAATGLPISMKI FMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRR LDKIE DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSL LNC EEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENS FEMQ KGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKG YYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYA QVTFC SNREASSQAPFIASLCLKSPGR FERIL LRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGA SVFVNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*	6049	6050
OT-002086 (Met; CA2 (aa 2-260 WT. L156H); Линкер (GGS); Метка FLAG; Линкер ((GGS)3); CD40L; HA-tag; стоп-кодон)		MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQ SPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRI LNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPLDGTY RLIQHFHFWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF LKVGSAKPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFT NFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VT	6051	6052

	<p>WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEE  LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKGGSDYKD  DDDKGGSGGGSGGGSGMIETYNQTSRSA  ATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAV  YLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNT  GERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEET  KKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTT  SVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVK  RQGLYYIYAQVTFCNREASSQAPFIASLCL  KSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLG  GVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTSF  GLLKLYPYDVPDYA*</p>		
<p>OT-002156 (Met;  CD8<math>\alpha</math> лидер (без  MET); CD19 scFv;  CD8<math>\alpha</math> Шарнир и  Трансмембранный  домен; CD28  костимулирующий  domain/4-1BB  внутриклеточный  домен; CD3 zeta  внутриклеточный  домен; Линкер  (GSG); P2A сайт  расщепления;  Линкер (GS); Met;  CA2 (aa 2-260 WT,  L156H); CD40L;  стоп-кодон)</p>	<p>MALPVTALLLPLALLHAARPDIQMTQTTS  SLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQK  PDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTD  YSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG  TKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGP  GLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQ  PPRKGLEWLGVWVWSETTYNSALKSRLTII  KDNSKSQVFLKMNSLQTDDETAIYYCAKHY  YYGGSYAMDYWGQGTSTVTSSTTPAPRP  PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG  LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK  RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR  FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQ  LYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGK  PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK  GERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM  QALPPRGSATNFSLKQAGDVEENPGPGS  MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQ  SPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRI  LNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGLDGT  RLIQHFHFWGSLDGQSEHTVDKKKYAAE  LHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF  LKVGSAPGHQKVVDVLDSIKTKGKSADFT</p>	6053	6054

	NFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLECVT WIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEE LMVDNWRPAQPLKNRQIKASFKGGSGGGS GGSGMIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMY LLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDER NLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIK SQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQ NPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMT SNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFC SNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAAN THSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFN VTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*		
OT-001605 (Met CD8 $\alpha$ лидер (без MET); CD19 scFv; CD8 $\alpha$ Шарнир и Трансмембранный домен; CD28 костимулирующий domain/4-1BB внутриклеточный домен; CD3 zeta внутриклеточный домен; Линкер (GS); P2A сайт расщепления; Линкер (GS); Линкер (MH); CD40L; стоп- кодон)	MALPVTALLPLALLHAARPDIQMTQTTS SLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQK PDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTD YSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG TKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGP GLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQ PPRKGLEWLGVWVWSETTYNSALKSRLTII KDNSKSQVFLKMNSLQTDDBTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPRGSATNFSLLKQAGDVEENPGPGSM HMIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTV FLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHE DFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFE GFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQI AAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNN LVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFC	6055	6056

	EASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHS SAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVD PSQVSHGTGFTSFGLLKL*		
OT-002172 (Met; CA2 (aa 2-260 WT, L156H); Линкер (GGSGGGSGGGSG) ; CD40L (S110G, F11G, E112S, M113G, Q114G, K115S); стоп-кодон)	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQ SPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRI LNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPLDGT YRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDDKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIF LKVGSAPGHQKVVDVLDSEIKTKGKSADFT NFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFN GEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKAS FKGGSGGGSGGGSGMIETYNQTS PRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLIT QMIGSALFAVYLHRRLDKIEDER NLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLN CEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKEN GGSGGGSGDQNPQIAAHVISEASSK TTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENG KQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNRE ASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAAN THSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGAS VFNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*	6071	6072

[0298] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе эффекторные модули могут содержать один или несколько сайтов расщепления между DD и CD40L. Включение сайтов расщепления может разъединять протеолитический обмен DD и груза, тем самым изменяя уровни экспрессии груза, независимые от DD. В некоторых вариантах осуществления добавление сайта расщепления увеличивает экспрессию груза. В других аспектах добавление сайта расщепления может снизить экспрессию груза.

[0299] В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули, описанные в данном документе, могут содержать грузы, причем области грузов были заменены последовательностью, содержащей G и S. В качестве неограничивающего примера в отношении аминокислотной последовательности область может быть 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более 15 аминокислот в длину. Аминокислоты груза могут быть заменены повторяющейся схемой GG, GS, SG, SS, GGG, GGS, GSS, GSG, SGG, SGS, SSG, SSS или их комбинацией.

[0300] В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули, описанные в данном документе, могут содержать грузы, причем области грузов были заменены последовательностью, содержащей G и S. В качестве неограничивающего примера в

отношении аминокислотной последовательности область может быть 6 аминокислот в длину. Аминокислоты груза могут быть заменены на GGS, повторенный один раз.

## II. Фармацевтические Композиции и Препараты

[0301] Настоящее изобретение дополнительно включает фармацевтические композиции, содержащие один или несколько из стимулов, биосхем СА2, эффекторных модулей или систем СА2 согласно настоящему раскрытию и, необязательно, по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное средство или инертный ингредиент.

[0302] В рамках настоящего изобретения термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату одной или нескольких биосхем или компонентов СА2, описанных в данном документе, или их фармацевтически приемлемых солей, необязательно с другими химическими компонентами, такими как физиологически подходящие носители и вспомогательные средства.

[0303] Термин «вспомогательное средство» или «неактивный ингредиент» относится к инертному или неактивному веществу, добавляемому в фармацевтическую композицию для дальнейшего облегчения введения соединения. Неограничивающие примеры таких инертных ингредиентов раскрыты в данном документе в разделе «Препараты».

[0304] В некоторых вариантах осуществления композиции вводят людям, пациентам или субъектам. Для целей настоящего раскрытия фраза «активный ингредиент» обычно относится к любому одному или нескольким компонентам системы биосхемы СА2, которые нужно доставить, как описано в данном документе.

[0305] Хотя описания фармацевтических композиций, представленные в настоящем документе, в основном направлены на фармацевтические композиции, которые подходят для введения человеку, специалисту будет понятно, что такие композиции обычно подходят для введения любому другому животному, например, не являющемуся человеком животному, например, не являющимся человеком млекопитающим. Субъекты, которым предполагается введение фармацевтических композиций, включают, но без ограничения, не являющихся человеком млекопитающих, включая сельскохозяйственных животных, таких как крупный рогатый скот, лошади, куры и свиньи, домашних животных, таких как кошки, собаки, или исследовательских животных, таких как мыши, крысы, кролики, собаки и не являющиеся человеком приматы.

[0306] Фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим раскрытием можно получать, упаковывать и/или продавать оптом в виде разовой стандартной дозы и/или в виде множества разовых стандартных доз. В рамках настоящего изобретения термин «стандартная доза» означает дискретное количество фармацевтической композиции, содержащей заранее определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента обычно равно дозе активного ингредиента, которую следует вводить субъекту, и/или удобной части такой дозы, такой как, например, половина или треть такой дозы.

[0307] Относительные количества активного ингредиента, фармацевтически приемлемого вспомогательного средства или инертного ингредиента и/или любых дополнительных ингредиентов в фармацевтической композиции в соответствии с описанием будут варьироваться в зависимости от идентичности, размера и/или состояния получающего лечение субъекта и дополнительно в зависимости от пути введения композиции. Например, композиция может содержать от 0,1% до 100%, например, от 0,5 до 50%, от 1 до 30%, от 5 до 80%, по меньшей мере 80% (м/м) активного ингредиента.

[0308] Эффективность лечения или облегчения заболевания можно оценить, например, путем измерения прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптомов, уменьшения боли, качества жизни, дозы лекарства, необходимой для поддержания лечебного эффекта, уровня маркера заболевания или любого другого измеримого параметра, подходящего для данного подлежащего лечению заболевания или нацеленного на профилактику. Специалист в данной области вполне может контролировать эффективность лечения или профилактики путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. В связи с введением композиций согласно настоящему раскрытию термин «эффективный против», например, рака, указывает на то, что введение клинически приемлемым способом приводит к положительному эффекту, по меньшей мере, для статистически значимой части пациентов, например, к улучшению симптомов, излечению, снижению нагрузки заболевания, уменьшению массы опухоли или количества клеток, продлению жизни, улучшению качества жизни или другому эффекту, обычно признаваемому положительным врачами, знакомыми с лечением конкретного типа рака.

[0309] Лечебный или профилактический эффект очевиден, когда имеется статистически значимое улучшение одного или нескольких параметров состояния болезни, или при отсутствии ухудшения или развития симптомов там, где в противном случае их можно было бы ожидать. Например, благоприятное изменение по меньшей мере на 10% измеряемого параметра заболевания, а предпочтительно по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50% или более может указывать на эффективное лечение. Как известно в данной области, эффективность данной композиции или препарата согласно настоящему раскрытию также можно оценить с использованием экспериментальной животной модели для данного заболевания. При использовании экспериментальной животной модели эффективность лечения подтверждается, когда наблюдается статистически значимое изменение.

#### Препараты

[0310] Композиции согласно настоящему раскрытию могут быть составлены любым способом, подходящим для доставки. Препарат может содержать, но без ограничения, наночастицы, микросферы сополимера молочной и гликолевой кислоты (PLGA), липидоиды, липоплекс, липосомы, полимеры, углеводы (включая простые сахара), катионные липиды и их комбинации.

[0311] В одном варианте осуществления препарат представляет собой наночастицу, которая может содержать по меньшей мере один липид. Липид может быть выбран, но без

ограничения, из DLin-DMA, DLin-K-DMA, 98N12-5, C12-200, DLin-MC3-DMA, DLin-KC2-DMA, DODMA, PLGA, PEG, PEG-DMG и пегилированные липиды. В другом аспекте липид может быть катионным липидом, таким как, но без ограничения, DLin-DMA, DLin-D-DMA, DLin-MC3-DMA, DLin-KC2-DMA и DODMA.

[0312] Для полинуклеотидов, описанных в данном документе, препарат может быть выбран из любого из препаратов, которые описаны, например, в международной заявке PCT/US2012/069610, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

#### Неактивные Ингридиенты

[0313] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические или другие препараты могут содержать по меньшей мере одно вспомогательное средство, которое является неактивным ингредиентом. В рамках настоящего изобретения термин «неактивный ингредиент» относится к одному или нескольким неактивным средствам, включенным в препараты. В некоторых вариантах осуществления все, ни один или некоторые из неактивных ингредиентов, которые можно использовать в препаратах согласно настоящему раскрытию, могут быть одобрены Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA).

#### III. Дозировка, доставка и Введение

[0314] Композиции, описанные в данном документе, могут быть доставлены в клетку или субъекту одним или несколькими путями и способами. Вирусные векторы, содержащие один или несколько эффекторных модулей CA2, SRE, грузы и другие компоненты, описанные в данном документе, можно использовать для их доставки в клетку и/или субъекту. Также можно использовать другие способы, такие как мРНК, плазмиды и рекомбинантные белки.

#### Доставка

##### Незащищенная доставка

[0315] Фармацевтические композиции, биосхемы CA2, компоненты биосхем CA2, эффекторные модули CA2, содержащие их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию, могут быть доставлены в клетки, ткани, органы и/или организмы в незащищенной форме. В рамках настоящего изобретения термин «незащищенная» относится к фармацевтическим композициям, биосхемам CA2, компонентам биосхем CA2, эффекторным модулям CA2, содержащие их SRE или грузы, доставляемые без средств или модификаций, которые способствуют трансфекции или проницаемости. Незащищенные фармацевтические композиции, биосхемы CA2, компоненты биосхем CA2, эффекторные модули CA2, содержащие их SRE или грузы, могут быть доставлены в клетки, ткани, органы и/или организмы с использованием способов введения, известных в данной области и описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления «незащищенная» доставка может включать препарат в простом буфере, таком как физиологический раствор или PBS.

#### Доставка в виде препаратов

[0316] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, биосхемы CA2, компоненты биосхем CA2, эффекторные модули CA2, содержащие их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию, могут быть составлены с использованием способов, описанных в данном документе. Препараты могут содержать фармацевтические композиции, биосхемы CA2, компоненты биосхем CA2, эффекторные модули CA2, содержащие их SRE или грузы, которые могут быть модифицированными и/или немодифицированными. Препараты могут дополнительно содержать, но без ограничения, средства для проникновения в клетки, фармацевтически приемлемые носители, средства доставки, биоразлагаемые или биосовместимые полимеры, растворители и/или депо для доставки с замедленным высвобождением. Препараты согласно настоящему раскрытию могут быть доставлены в клетки с использованием способов введения, известных в данной области и описанных в данном документе.

[0317] Фармацевтические композиции, биосхемы CA2, компоненты биосхем CA2, эффекторные модули CA2, содержащие их SRE или грузы, также могут быть составлены для прямой доставки в органы или ткани любым из нескольких способов в данной области, включая, но без ограничения, прямое всасывание или обмывание через катетер с помощью гелей, порошков, мазей, кремов, гелей, лосьонов и/или капель с использованием таких субстратов, как ткань или биоразлагаемые материалы, покрытые или пропитанные композициями, и тому подобное.

#### Доставка в клетки

[0318] В другом аспекте настоящего раскрытия в клетки можно вводить полинуклеотиды, кодирующие биосхемы CA2, эффекторные модули CA2, SRE (например, DD CA2), грузы (например, иммунотерапевтические средства) и описанные в данном документе композиции, а также векторы, содержащие указанные полинуклеотиды. В качестве неограничивающего примера клетки могут быть эффекторными иммунными клетками.

[0319] В некоторых аспектах настоящего раскрытия полинуклеотиды, кодирующие биосхемы CA2, эффекторные модули CA2, SRE (например, DD CA2), грузы (например, иммунотерапевтические средства) и композиции согласно раскрытию могут быть упакованы в вирусные векторы или интегрированы в вирусные геномы, обеспечивающие временную или стабильную экспрессию полинуклеотидов. Предпочтительными вирусными векторами являются ретровирусные векторы, включая лентивирусные векторы. Чтобы сконструировать ретровирусный вектор, полинуклеотидную молекулу, кодирующую биосхему CA2, эффекторный модуль CA2, CA2 SRE (например, CA2 DD) или представляющий интерес груз (например, иммунотерапевтическое средство), вставляют в вирусный геном в месте определенных вирусных последовательностей для получения вируса, дефектного по репликации. Затем рекомбинантный вирусный вектор вводят в линию упаковывающих клеток, содержащую гены gag, pol и env, но без LTR и упаковывающих компонентов. Рекомбинантные ретровирусные частицы секретируются в культуральную среду, затем их собирают, необязательно концентрируют и используют для

переноса генов. Лентивирусные векторы являются особенно предпочтительными, поскольку они способны инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки.

[0320] Векторы также могут быть перенесены в клетки невирусными методами с помощью физических методов, таких как иглы, электропорация, сонопорация, гидропорация; химические носители, такие как неорганические частицы (например, фосфат кальция, диоксид кремния, золото), и/или химических методов. В некоторых вариантах осуществления для доставки можно использовать синтетические или природные биоразлагаемые средства, такие как катионные липиды, липидные наноэмульсии, наночастицы, векторы на основе пептидов или векторы на основе полимеров.

[0321] В некоторых вариантах осуществления полипептиды, описанные в данном документе, могут быть доставлены в клетку напрямую. В одном варианте осуществления полипептиды согласно раскрытию могут быть доставлены с использованием синтетических пептидов, содержащих домен утечки из эндосом (ELD), слитый с доменом проникновения в клетку (CLD). Полипептиды согласно настоящему раскрытию вводят в клетку совместно с синтетическим пептидом ELD-CLD. ELD облегчают выход белков, захваченных эндосомами, в цитозоль. Такие домены являются производными белков микробного и вирусного происхождения и описаны в данной области техники. CPD позволяют транспортировать белки через плазматическую мембрану и также были описаны в данной области. Слитые белки ELD-CLD синергетически повышают эффективность трансдукции по сравнению с совместной трансдукцией с любым доменом по отдельности. В некоторых вариантах осуществления богатый гистидином домен может быть необязательно добавлен к челночной конструкции в качестве дополнительного метода, обеспечивающего выход груза из эндосомы в цитозоль. Челнок может также содержать остаток цистеина на N- или C-конце для образования мультимеров гибридного пептида. Мультимеры слитых пептидов ELD-CLD, полученные путем добавления остатка цистеина к концу пептида, демонстрируют еще большую эффективность трансдукции по сравнению с конструкциями с одним слитым пептидом. Полипептиды согласно изобретению также могут быть добавлены к соответствующим сигналам локализации, чтобы направить груз в соответствующее субклеточное местоположение, например, ядро. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении может быть использован любой из ELD, CLD или слитых синтетических пептидов ELD-CLD, описанных в международных патентных публикациях WO2016161516 и WO2017175072 (содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

#### Способы и/или векторы доставки

[0322] Системы биосхемы CA2, эффекторные модули CA2, SRE и/или грузы согласно настоящему раскрытию могут быть доставлены с использованием одного или нескольких способов. В настоящем раскрытии также представлены векторы, которые упаковывают описанные в данном документе полинуклеотиды, кодирующие биосхемы CA2, эффекторные модули CA2, SRE (например, DD CA2) и грузы, а также их комбинации. Векторы согласно настоящему раскрытию также можно использовать для доставки

упакованных полинуклеотидов в клетку, локальный участок ткани или субъекту. Эти векторы могут быть любого типа, включая ДНК-векторы, рНК-векторы, плазмиды, вирусные векторы и частицы. Технология вирусных векторов хорошо известна и описана в Sambrook et al. (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Вирусы, которые можно использовать в качестве векторов, включают, но без ограничения, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные (AAV) векторы, вирусные векторы простого герпеса, ретровирусные векторы, онколитические вирусы и тому подобное.

[0323] Как правило, векторы содержат точку начала репликации, функционирующую по меньшей мере в одном организме, последовательность промотора и удобный сайт рестрикционной эндонуклеазы, а также один или несколько селективируемых маркеров, например, ген устойчивости к лекарствам.

[0324] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор экспрессии может содержать регуляторные последовательности, такие как кодоны инициации и терминации транскрипции и трансляции, которые специфичны для типа клетки-хозяина, в которую должен быть введен вектор.

[0325] В некоторых вариантах осуществления вектор, описанный в данном документе, может содержать один или несколько грузов, описанных в данном документе, при этом два или более грузов могут быть включены в один эффекторный модуль СА2. В этом случае два или более грузов настраиваются одним и тем же стимулом одновременно. В других вариантах осуществления вектор согласно настоящему раскрытию может содержать два или более эффекторных модуля СА2, при этом каждый эффекторный модуль СА2 содержит иной груз. В этом случае два или более эффекторных модуля СА2 и грузы настраиваются с помощью разных стимулов, обеспечивая отдельно независимое регулирование двух или более компонентов.

#### Лентивирусные носители/частицы

[0326] В некоторых вариантах осуществления лентивирусные носители/частицы можно использовать в качестве средств доставки. Лентивирусы - это подгруппа вирусов семейства *Retroviridae*, названная так потому, что перед интеграцией в геном хозяина требуется обратная транскрипция геномов вирусной РНК в ДНК. Таким образом, наиболее важными характеристиками лентивирусных носителей/частиц являются интеграция их генетического материала в геном клетки-мишени/хозяина. Некоторые примеры лентивирусов включают вирусы иммунодефицита человека: HIV-1 и HIV-2, вирус иммунодефицита обезьян (SIV), вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV), вирус болезни Джембраны (JDV), вирус инфекционной анемии лошадей (EIAV), вирус висна-маеди и энцефалита козьего артрита (CAEV).

[0327] Обычно лентивирусные частицы, составляющие носитель для доставки генов, сами по себе являются дефектными по репликации (также называемые «самоинактивирующимися»). Лентивирусы способны инфицировать как делящиеся, так и

неделяющиеся клетки благодаря механизму проникновения через интактную ядерную оболочку хозяина (Naldini L. et al., *Curr. Opin. Biotechnol*, 1998, 9: 457-463). Рекомбинантные лентивирусные носители/частицы были получены путем многократного ослабления генов вирулентности HIV, например, гены *Env*, *Vif*, *Vpr*, *Vpu*, *Nef* и *Tat* удаляют, что делает вектор биологически безопасным. Соответственно, лентивирусные носители, например, полученные из HIV-1/HIV-2, могут опосредовать эффективную доставку, интеграцию и долгосрочную экспрессию трансгенов в неделяющиеся клетки. В рамках настоящего изобретения термин «рекомбинантный» относится к вектору или другой нуклеиновой кислоте, содержащей как лентивирусные последовательности, так и нелентивирусные ретровирусные последовательности.

[0328] Лентивирусные частицы могут быть получены путем совместной экспрессии упаковочных элементов вируса и самого векторного генома в клетке-продуcente, такой как клетки HEK293T человека. Эти элементы обычно представлены в трех или четырех отдельных плаزمиды. Клетки-продуценты котрансфицируют плазмиды, кодирующими лентивирусные компоненты, включая коровую часть (то есть структурные белки) и ферментативные компоненты вируса, а также белок (белки) оболочки (называемые системами упаковки), и плазмидой, кодирующей геном, содержащей чужеродный трансген, который должен быть перенесен в клетку-мишень, сам носитель (также называемый вектором переноса). Обычно плазмиды или векторы включают в линию клеток-продуцентов. Плазмиды/векторы вводят посредством трансфекции, трансдукции или инфицирования в линию клеток-продуцентов. Способы трансфекции, трансдукции или инфицирования хорошо известны специалистам в данной области. В качестве неограничивающего примера, конструкции для упаковки и переноса можно вводить в линии клеток-продуцентов с помощью трансфекции фосфатом кальция, липофекции или электропорации, как правило, вместе с доминантным селективируемым маркером, таким как *neo*, *DHFR*, *Gln*-синтетаза или *ADA*, с последующим отбором в присутствии соответствующего препарата и выделением клонов.

[0329] Клетка-продуцент продуцирует рекомбинантные вирусные частицы, которые содержат чужеродный ген, например, эффекторный модуль CA2 согласно настоящему раскрытию. Рекомбинантные вирусные частицы выделяют из культуральной среды и титруют стандартными методами, используемыми специалистами в данной области. Для инфицирования клеток-мишеней можно использовать рекомбинантные лентивирусные носители.

[0330] Клетки, которые можно использовать для получения лентивирусных частиц с высоким титром, могут включать, но без ограничения, клетки HEK293T, клетки 293G, клетки STAR (Relander et al., *Mol. Ther.*, 2005, 11: 452-459), FreeStyle™ 293 Expression System (ThermoFisher, Waltham, MA) и другие линии продуцентов на основе HEK293T (например, Stewart et al., *Hum Gene Ther.* 2011, 22 (3): 357-369; Lee et al., *Biotechnol Bioeng*, 2012, 10996): 1551-1560; Throm et al., *Blood*. 2009, 113 (21): 5104-5110; содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

[0331] В некоторых аспектах белки оболочки могут быть гетерологичными белками оболочки из других вирусов, такими как белок G вируса везикулярного стоматита (VSV G) или белки оболочки бакуловируса gp64. В частности, может быть выбран гликопротеин VSV-G среди видов, классифицированных в роду везикуловирусов: Carajas virus (CJSV), Chandipura virus (CHPV), Cocal virus (COCV), Isfahan virus (ISFV), Maraba virus (MARAV), Piry virus (PIRYV), Vesicular stomatitis Alagoas virus (VSAV), Vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV) and Vesicular stomatitis New Jersey virus (VSNJV) and/or stains provisionally classified in the vesiculovirus genus as Grass carp rhabdovirus, BeAn 157575 virus (BeAn 157575), Boteke virus (BTKV), Calchaqui virus (CQIV), Eel virus American (EVA), Gray Lodge virus (GLOV), Jurona virus (JURY), Klamath virus (KLAV), Kwatta virus (KWAV), La Joya virus (LJV), Malpais Spring virus (MSPV), Mount Elgon bat virus (MEBV), Perinet virus (PERV), Pike fry rhabdovirus (PFRV), Porton virus (PORV), Radi virus (RADIV), Spring viremia of carp virus (SVCV), Tupaia virus (TUPV), Ulcerative disease rhabdovirus (UDRV) и Yug Bogdanovac virus (YBV). Gp64 или другой бакуловирусный белок env может быть получен из нуклеополиэдровируса *Autographa californica* (AcMNPV), вируса ядерного полиэдроза *Anagrapha falcifera*, вируса ядерного полиэдроза *Bombyx mori*, нуклеополиэдровируса *Choristoneura fumiferana*, однокапсидного вируса ядерного полиэдроза *Orgyia pseudotsugata*, нуклеополиэдровируса *Eriphyas postvittana*, нуклеополиэдровируса *Huphantria cunea*, вируса ядерного полиэдроза *Galleria mellonella*, вируса Dhori, вируса Thogoto, нуклеополиэдровируса *Antheraea pernyi* или вируса Баткен.

[0332] Другие элементы, содержащиеся в лентивирусных частицах, могут включать ретровирусный LTR (длинно-концевой повтор) на 5'- или 3'-конце, ретровирусный экспортный элемент, необязательно лентивирусный элемент обратного ответа (RRE), промотор или его активную часть и область контроля локуса (LCR) или ее активную часть. Эффекторный модуль CA2 связан с вектором.

[0333] Способы получения рекомбинантных лентивирусных частиц обсуждаются в данной области, например, в патентах США №№ 8846385; 7745179; 7629153; 7575924; 7179903; и 6808905; содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0334] Используемые лентивирусные векторы могут быть выбраны, но без ограничения, из pLVX, pLenti, pLenti6, pLJM1, FUGW, pWPXL, pWPI, pLenti CMV puro DEST, pLJM1-EGFP, pULTRA, pInducer20, pHIV-EGFP, pCW57.1, pTRPE, pELPS, pRRL и pLionII.

#### Лентивирусные векторы и клеточная инженерия

[0335] Лентивирусные векторы используют для введения трансгенов в Т-клетки (например, первичные Т-клетки человека или клетки Jurkat) для доклинических исследований и клинического применения, включая недавно одобренные продукты, такие как Tisagenlecleucel (KYMRIA®), для рецидивизирующей/рефрактерной В-клеточной лимфомы. Псевдотипированные лентивирусные векторы 3-го поколения VSV-G обеспечивают высокие титры, высокую эффективность и безопасность трансдукции и стали

предпочтительными векторами для инженерии Т-клеток. Не желая связывать себя теорией, инженерия Т-клеток обычно включает активацию Т-клеток антителами CD3/CD28 с последующей трансдукцией лентивируса и затем размножением клеток, которое может длиться от 5 до 30 дней (например, от 9 до 14 дней или от 9 до 15 дней). Как правило, интеграция трансгена лентивируса может занять более 7 дней для полной стабилизации в Т-клетках (например, первичных Т-клетках человека или клетках Jurkat). Хотя более длительное культивирование может увеличивать количество клеток, более длительное культивирование также может изменять фенотип Т-клеток до более дифференцированного состояния. Следовательно, продолжительность культивирования *ex vivo* может влиять на устойчивость и эффективность CAR Т-клеток. Например, клетки, культивируемые в течение более короткого периода времени, могут демонстрировать менее дифференцированный фенотип и могут быть очень эффективными в доклинических моделях.

[0336] Не желая ограничиваться теорией, состояние дифференцировки Т-клеток может влиять на приживление и сохранение Т-клеток после адоптивного переноса. У Ghassemi et al. (Reducing Ex Vivo Culture Improves the Antileukemic Activity of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. *Cancer Immunol Res*; 6(9) сентябрь 2018 г., содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки) описана дифференцировка Т-клеток с течением времени, и было обнаружено, что ранее собранные Т-клетки CAR демонстрируют усиленную эффекторную функцию и пролиферацию, а также повышенную эффективность и устойчивость *in vivo*.

[0337] Динамика лентивирусов, такая как трансдукция, интеграция и/или кинетика экспрессии лентивирусно введенных трансгенов в Т-клетках (например, первичных человеческих Т-клетках или клетках Jurkat) *ex vivo*, может влиять на эффективность и долговечность противоопухолевых ответов *in vivo*. Некоторые типы Т-клеток могут давать разные результаты. Например, линия клеток Jurkat может не обеспечивать динамический диапазон экспрессии, как первичные Т-клетки человека. Способы оценки динамики этих лентивирусов известны в данной области и описаны в данном документе.

[0338] В некоторых вариантах осуществления для определения кинетики экспрессии трансгена активированные CD3/CD28 первичные Т-клетки человека могут быть трансдуцированы лентивирусом, несущим трансген (например, регулируемый трансген или конститутивный трансген, такой как CD19 CAR, IL12, флуоресцентный белок или любой трансген (например, груз), описанный в данном документе). Клетки могут быть проанализированы способами, описанными в данном документе и/или известными в данной области, на жизнеспособность, вирусную геномную интеграцию (например, с использованием количественной ПЦР), уровни транскриптов (например, с использованием количественной RT-PCR) и экспрессию на клеточной поверхности трансгена, если это применимо (например, если трансген представляет собой или содержит CD19 CAR, то можно оценить поверхностную экспрессию CD19 CAR). Клетки можно анализировать до трансдукции и/или после трансдукции, например, через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней,

6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней., 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 или более 30 дней после трансдукции.

[0339] В некоторых вариантах осуществления первичные человеческие Т-клетки, активированные CD3/CD28, можно реактивировать с помощью шариков CD3/CD28 после трансдукции. Клетки можно реактивировать через 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 или более 30 дней после трансдукции. Клетки могут быть проанализированы способами, описанными в данном документе и/или известными в данной области, на жизнеспособность, вирусную геномную интеграцию (например, с помощью количественной ПЦР), уровни транскриптов (например, с помощью количественной RT-PCR), экспрессию трансгена на клеточной поверхности. если применимо (например, если трансген представляет собой или содержит CD19 CAR, тогда можно оценить поверхностную экспрессию CD19 CAR), количество копий и/или уровни мРНК.

[0340] В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность активированных первичных Т-клеток человека, трансдуцированных лентивирусом, несущим трансген, составляет более 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99%. В качестве неограничивающего примера жизнеспособность клеток превышает 90%. В качестве неограничивающего примера жизнеспособность клеток превышает 85%.

[0341] В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность клеток Jurkat, трансдуцированных лентивирусом, несущим трансген, составляет более 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99%. В качестве неограничивающего примера жизнеспособность клеток превышает 90%. В качестве неограничивающего примера жизнеспособность клеток превышает 85%.

[0342] В некоторых вариантах осуществления интеграция трансгена в геном клетки может происходить на уровне или выше точки насыщения. В качестве неограничивающего примера точка насыщения может составлять 3 копии на клетку.

[0343] В некоторых вариантах осуществления интеграция трансгена в геном может быть высокой в начальные оцениваемые моменты времени, а затем снижаться до более низкого значения интеграции, прежде чем станет стабильной для оставшейся части культуры. В качестве неограничивающего примера, интеграция может составлять до 20 копий трансгена на клетку в геном в первые моменты времени перед снижением до 2 копий на клетку и стабильностью в оставшейся части культуры.

[0344] В некоторых вариантах осуществления может быть оценена способность Т-клеток к трансдукции. Т-клетки по меньшей мере от одного донора могут быть трансдуцированы лентивирусом, содержащим трансген в дозе, которая, по прогнозам, достигнет уровней насыщения (например, достаточно вируса, чтобы каждая клетка содержала копию, если ожидается распределение Пуассона), и в более высокой дозе лентивируса, превышающая насыщение в 5 раз. Чтобы определить, все ли клетки

экспрессируют трансген, можно определить копии на клетку, процент и MFI клеток (или концентрацию трансгена в среде). В качестве неограничивающего примера, Т-клетки от двух разных доноров могут быть трансдуцированы лентивирусом, который содержит трансген. Трансдукцию можно осуществлять при двух дозах, насыщении и 5-кратном насыщении, и показать, что через 5-10 дней после трансдукции все группы могут достичь или превысить прогнозируемый уровень насыщения интегрированного трансгена и аналогичную интенсивность экспрессии в группах, но не все клетки экспрессируют трансген. Не все Т-клетки могут иметь одинаковую чувствительность к трансдукции, даже если получены от одного и того же донора. Доля общих клеток, экспрессирующих GFP (выше порога обнаружения), может варьироваться в зависимости от донора, партии и/или вирусной дозы. Процент всех клеток, экспрессирующих GFP от одного донора, может составлять от 70% до 95%.

[0345] В некоторых вариантах осуществления некоторая часть культивируемых Т-клеток (например, первичных Т-клеток человека и/или клеток Jurkat) может экспрессировать трансген. Доля культивируемых Т-клеток, экспрессирующих трансген, может составлять, но без ограничения, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или более 99%. В качестве неограничивающего примера доля может превышать 70%. В качестве неограничивающего примера доля может быть больше 75%. В качестве неограничивающего примера доля может быть больше 80%. В качестве неограничивающего примера доля может превышать 85%. В качестве неограничивающего примера доля может превышать 90%. В качестве неограничивающего примера доля может быть больше 95%.

[0346] В некоторых вариантах осуществления уровни мРНК в культуре могут снижаться на протяжении исследования. Снижение может не ограничиваться конкретным трансгеном, и эту тенденцию можно наблюдать во многих классах экспрессируемых белков. Чтобы увеличить уровни мРНК, клетки можно реактивировать после того, как уровни мРНК снизятся по сравнению с начальными уровнями. Клетки можно реактивировать через 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 или более 30 дней после трансдукции. В качестве неограничивающего примера, чтобы увеличить уровни мРНК в культуре, клетки можно реактивировать с помощью шариков CD3/CD28 через 13 дней после трансдукции.

[0347] В некоторых вариантах осуществления поверхностная экспрессия при культивировании может снижаться в течение исследования. Например, поверхностная экспрессия может снижаться в период от 3 до 13 дней, от 3 до 14 дней или от 3 до 15 дней после трансдукции. Чтобы увеличить поверхностную экспрессию, клетки можно реактивировать после того, как поверхностная экспрессия снизится от начальных уровней. Клетки можно реактивировать через 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 или более 30 дней после

трансдукции.

[0348] В некоторых вариантах осуществления трансген представляет собой CAR, такой как, но без ограничения, CD19 CAR. В качестве неограничивающего примера CAR представляет собой CD19 CAR. Жизнеспособность клеток может превышать 90% в клетках, трансдуцированных CD19 CAR. Жизнеспособность клеток может превышать 85% в клетках, трансдуцированных CD19 CAR. Если клетки являются первичными Т-клетками, трансдуцированными с помощью CD19 CAR, то количество жизнеспособных клеток может увеличиваться в течение начальных моментов времени перед уменьшением. Если клетки представляют собой клетки Jurkat, трансдуцированные с помощью CD19 CAR, то количество жизнеспособных клеток может увеличиваться по меньшей мере в течение 10 дней. Число копий на клетку для клеток, трансдуцированных CD19 CAR, может быть выше в начальные моменты времени, прежде чем уменьшиться на 50% или более в более поздние моменты времени. Экспрессия CD19 CAR на клеточной поверхности может снижаться в ходе исследования с примерно 20000 CAR MFI до менее чем 5000 CAR MFI в течение 10 дней (например, с 3 дня по 13 день). После рестимуляции на 15 день MFI может увеличиться до более 5000 CAR MFI. Процент первичных человеческих Т-клеток, экспрессирующих CAR, может составлять от 40% до 60% в течение 3-13 дней после трансдукции. Процент клеток Jurkat, экспрессирующих CAR, может составлять от 30% до 70% в течение 3-13 дней после трансдукции. Первоначальное снижение примерно на 20% можно наблюдать между 3 и 6 днями после трансдукции. Рестимуляция Т-клеток может увеличить процент CAR-положительных клеток до исходного процентного уровня (например, примерно 60%).

[0349] В некоторых вариантах осуществления трансген кодирует флуоресцентный белок, такой как, но без ограничения, цитозольный зеленый флуоресцентный белок (GFP), люцифераза и mCherry. В качестве неограничивающего примера флуоресцентный белок представляет собой GFP. Жизнеспособность клеток может превышать 90% в клетках, трансдуцированных GFP. Жизнеспособность клеток может превышать 85% в клетках, трансдуцированных GFP. Если клетки являются первичными Т-клетками, трансдуцированными с помощью GFP, то количество жизнеспособных клеток может увеличиваться в течение начальных моментов времени перед уменьшением. Если клетки представляют собой клетки Jurkat, трансдуцированные GFP, то количество жизнеспособных клеток может увеличиваться по меньшей мере в течение 10 дней. Число копий на клетку для клеток, трансдуцированных GFP, может быть выше в начальные моменты времени, прежде чем уменьшиться на 50% или более в более поздние моменты времени. Поверхностная экспрессия клеток может иметь устойчивое и быстрое снижение, достигающее низшей точки на 10 день с небольшим увеличением при рестимуляции. Наивысший уровень экспрессии GFP на клеточной поверхности в клетках Jurkat может быть на 10-й день (примерно 35000 GFP MFI) перед тем, как снизиться до конца исследования. Процент первичных человеческих Т-клеток, экспрессирующих GFP, может составлять примерно 80% в течение 3-13 дней после трансдукции. Процент клеток Jurkat, экспрессирующих GFP, может составлять примерно 90% в течение 3-13 дней после

трансдукции.

[0350] В некоторых вариантах осуществления сконструированные с помощью лентивируса клетки, описанные в настоящем документе, обладают интеграцией геномной ДНК, которая стабилизируется после начального снижения количества копий, снижая уровни РНК и поверхностной экспрессии с течением времени, а также повышая экспрессию РНК и поверхности после повторной стимуляции.

[0351] В некоторых вариантах осуществления сконструированные с помощью лентивируса клетки можно оценивать с использованием следующего 14-дневного метода, при котором образцы собирают 5 раз на протяжении всего культивирования. В -1 день Т-клетки (например, первичные Т-клетки человека или клетки Jurkat) можно разморозить и добавить шарики CD3/CD28. В 0 день добавляют лентивирус для каждого из условий (например, 4 мл клеток при 0,5е6/мл), а контролем являются нетрансдуцированные клетки. Среду удваивают до 8 мл на 1 день, а затем среду удваивают до 16 мл на 2 день. На 3 день собирают 4 мл, а затем на 4 день среду удваивают до 24 мл. На 6 день собирают 4 мл, прежде чем удвоить среду до 40 мл. Клетки можно разделить (например, 14 мл 0,5е6 клеток/мл) на 8 день, а затем на 6 день собрать 4 мл перед удвоением среды до 40 мл. 4 мл можно собрать на 10 день, прежде чем объем среды удвоить до 20 мл. На 13 день собирают 4 мл, а затем удваивают среду до 32 мл. Культуру разделяют пополам, и половину культуры активируют (шарики активации CD3/CD28 1:1) и стимулируют в течение ночи. На 14 день собирают по 4 мл стимулированных и нестимулированных клеток, и заканчивают культивирование. Число копий трансгена на клетку анализируют путем сбора клеток и извлечения геномной ДНК, затем количественного определения с помощью стандартной кривой qPCR для эндогенного генома и для последовательности трансгена, а затем преобразования обнаруженных количеств в соотношение. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) оценивают с помощью проточной цитометрии с соответствующим окрашиванием для каждой группы. Процент экспрессии можно также оценить с помощью проточной цитометрии, количественно определяя процент клеток, флуоресцирующих выше порогового значения. Растворимые грузы могут быть количественно определены путем сбора культурального супернатанта в каждый отмеченный момент времени и проведения анализа планшетов MesoScale Discovery (MSD) с последующей нормализацией по плотности клеток.

#### Аденоассоциированные вирусные частицы

[0352] Доставку любой из биосхем CA2, компонентов биосхем CA2, эффекторных модулей CA2, SRE или грузов согласно настоящему раскрытию можно осуществлять с использованием рекомбинантных аденоассоциированных вирусных (rAAV) векторов. Такие векторы или вирусные частицы могут быть сконструированы для использования любого из известных серотипических капсидов или комбинаций серотипических капсидов.

[0353] Векторы AAV включают не только одноцепочечные векторы, но и самокомплементарные векторы AAV (scAAV). Векторы scAAV содержат ДНК, которая отжигается вместе с образованием двухцепочечного векторного генома. Пропуская синтез

второй цепи, scAAV обеспечивают быструю экспрессию в клетке.

[0354] Векторы rAAV могут быть получены стандартными методами в данной области, такими как тройная трансфекция в клетках насекомых sf9 или в суспензионных культурах клеток человека, таких как клетки HEK293.

[0355] Биосхемы CA2, компоненты биосхем CA2, эффекторные модули CA2, SRE или грузы могут быть закодированы в одном или нескольких вирусных геномах, которые должны быть упакованы в капсиды AAV, описанные в данном документе.

[0356] Такие векторные или вирусные геномы могут также содержать, помимо по меньшей мере одного или двух ITR (инвертированных концевых повторов), определенные регуляторные элементы, необходимые для экспрессии из вектора или вирусного генома. Такие регуляторные элементы хорошо известны в данной области и включают, например, промоторы, интроны, спейсеры, последовательности-вставки и тому подобное.

[0357] Биосхемы CA2, компоненты биосхем CA2, эффекторные модули CA2, SRE или грузы, описанные в данном документе, можно вводить в одной или нескольких частицах AAV.

[0358] В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули CA2 можно вводить в одной или нескольких частицах AAV. В некоторых вариантах осуществления в вирусном геноме можно кодировать более одного эффекторного модуля CA2 или SRE.

#### Ретровирусные носители/частицы ( $\gamma$ -ретровирусные векторы)

[0359] В некоторых вариантах осуществления ретровирусные носители/частицы можно использовать для доставки биосхем CA2, компонентов биосхем CA2, эффекторных модулей CA2, SRE или грузов согласно настоящему раскрытию. Ретровирусные векторы (RV) обеспечивают постоянную интеграцию трансгена в клетки-мишени. Помимо лентивирусных векторов на основе комплекса HIV-1/2, ретровирусные векторы на основе простых гамма-ретровирусов широко используются для доставки терапевтических генов и клинически продемонстрированы как одна из наиболее эффективных и мощных систем доставки генов, способных передавать широкий спектр типов клеток. Примеры видов гамма-ретровирусов включают вирусы лейкемии мышей (MLV) и вирусы лейкемии кошек (FeLV).

[0360] В некоторых вариантах осуществления гамма-ретровирусные векторы, полученные из гамма-ретровируса млекопитающих, такого как вирусы лейкемии мышей (MLV), являются рекомбинантными. Семейства гамма-ретровирусов MLV включают экотропные, амфотропные, ксенотропные и политропные подсемейства. Экотропные вирусы способны инфицировать только мышинные клетки с помощью рецептора mCAT-1. Примерами экотропных вирусов являются Moloney MLV и AKV. Амфотропные вирусы заражают мышей, людей и другие виды через рецептор Pit-2. Одним из примеров амфотропного вируса является вирус 4070A. Ксенотропные и политропные вирусы используют один и тот же рецептор (Xpr1), но различаются по видовому тропизму. Ксенотропные вирусы, такие как NZB-9-1, инфицируют людей и другие виды, но не мышинные виды, тогда как политропные вирусы, такие как фокусобразующие вирусы

(MCF), инфицируют мышей, людей и другие виды.

[0361] Гамма-ретровирусные векторы могут быть получены в упаковывающих клетках путем котрансфекции клеток несколькими плазмидами, включая плазмиду, кодирующую ретровирусный структурный и ферментативный (gag-pol) полипротеин, плазмиду, кодирующую белок оболочки (env), и плазмиду, кодирующую мРНК вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий композиции согласно настоящему раскрытию, который должен быть упакован во вновь образованные вирусные частицы.

[0362] В некоторых аспектах рекомбинантные гамма-ретровирусные векторы псевдотипированы белками оболочки из других вирусов. Гликопротеины оболочки включены во внешний липидный слой вирусных частиц, что может увеличивать/изменять тропизм клеток. Примеры белков оболочки включают белок оболочки вируса лейкемии гиббоновых обезьян (GALV) или белок G вируса везикулярного стоматита (VSV-G), или белок оболочки эндогенного ретровируса обезьян, или белки H и F вируса кори, или белок оболочки gp120 вируса иммунодефицита человека, или белок оболочки везикуловируса Кокал (см., например, публикацию заявки США №: 2012/164118; содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки). В других аспектах гликопротеины оболочки могут быть генетически модифицированы для включения нацеливающих/связывающих лигандов в гамма-ретровирусные векторы, связывающие лиганды, включая, но без ограничения, пептидные лиганды, одноцепочечные антитела и факторы роста (Waehler et al., *Nat. Rev. Genet.* 2007, 8 (8): 573-587, содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки). Эти сконструированные гликопротеины могут перенаправлять векторы на клетки, экспрессирующие их соответствующие фрагменты-мишени. В других аспектах может быть введен «молекулярный мостик» для направления векторов к конкретным клеткам. Молекулярный мостик имеет двойную специфичность: один конец может распознавать вирусные гликопротеины, а другой конец может связываться с молекулярной детерминантой на клетке-мишени. Такие молекулярные мостики, например, лиганд-рецептор, авидин-биотин и химические конъюгации, моноклональные антитела и сконструированные фузогенные белки, могут управлять прикреплением вирусных векторов к клетке-мишеням для трансдукции (Yang et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 2008, 101 (2): 357-368; и Maetzig et al., *Viruses*, 2011, 3, 677-713; содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

[0363] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные гамма-ретровирусные векторы являются самоинактивирующимися (SIN) гамма-ретровирусными векторами. Векторы неспособны к репликации. Векторы SIN могут нести делецию в области 3'U3, изначально обладающей энхансерной/промоторной активностью. Кроме того, область 5'U3 может быть заменена сильными промоторами (необходимыми в линии упаковывающих клеток), полученными из цитомегаловируса или RSV, или выбранным внутренним промотором и/или энхансерным элементом. Выбор внутренних промоторов может быть сделан в соответствии с конкретными требованиями экспрессии гена,

необходимыми для конкретной цели настоящего раскрытия.

[0364] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие биосхему CA2, компоненты биосхем CA2, эффекторный модуль CA2, SRE, вставлены в рекомбинантный вирусный геном. Другие компоненты вирусной мРНК рекомбинантного гамма-ретровирусного вектора могут быть модифицированы за счет вставки или удаления природных последовательностей (например, вставки IRES, вставки гетерологичного полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес полипептид или ингибирующую нуклеиновую кислоту, перестановки более эффективного промотора из другого ретровируса или вируса вместо промотора дикого типа и тому подобное.). В некоторых примерах рекомбинантные гамма-ретровирусные векторы могут содержать модифицированный сигнал упаковки и/или сайт связывания праймера (PBS), и/или 5'-энхансерные/промоторные элементы в U3-области 5'-длинного концевой повтора (LTR), и/или элементы 3'-SIN, модифицированные в U3-области 3'-LTR. Эти модификации могут увеличить титры и возможность заражения.

[0365] Гаммаретровирусные векторы, подходящие для доставки компонентов биосхем CA2, эффекторных модулей CA2, SRE или грузов согласно настоящему раскрытию, могут быть выбраны из тех, что раскрыты в патентах США №№: 8828718; 7585676; 7351585; публикации заявки США №: 2007/048285; № публикации заявки РСТ: WO2010/113037; WO2014/121005; WO2015/056014; и EP Pat. №: EP1757702; EP1757703 (содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

#### Онколитический вирусный вектор

[0366] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды согласно настоящему раскрытию могут быть упакованы в онколитические вирусы. В рамках настоящего изобретения термин «онколитический вирус» относится к вирусу, который преимущественно инфицирует и убивает раковые клетки, такие как вирусы вакцины. Онколитический вирус может возникать в природе или может быть генетически модифицированным вирусом, таким как онколитический аденовирус и онколитический вирус герпеса.

[0367] В некоторых вариантах осуществления вирусы онколитической вакцины могут включать вирусные частицы с дефицитом тимидинкиназы (ТК), экспрессирующие гранулоцитарно-макрофагальный (GM) колониестимулирующий фактор (CSF), репликационно-компетентный вектор вируса осповакцины, достаточный для индукции онколиза клеток в опухоли; см., например, патент США №: 9226977; содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

#### Информационная РНК (мРНК)

[0368] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе эффекторные модули CA2 могут быть сконструированы в виде информационной РНК (мРНК). В рамках настоящего изобретения термин «информационная РНК» (мРНК) относится к любому полинуклеотиду, который кодирует представляющий интерес

полипептид и который способен транслироваться с образованием кодируемого представляющего интерес полипептида *in vitro*, *in vivo*, *in situ* или *ex vivo*. Такие молекулы мРНК могут иметь структурные компоненты или особенности любых из тех, что описаны в международной заявке № PCT/US2013/030062, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0369] В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули СА2 могут быть сконструированы в виде самоамплифицирующейся РНК. В рамках настоящего изобретения термин «самоамплифицирующаяся РНК» относится к молекулам РНК, которые могут реплицироваться в хозяине, что приводит к увеличению количества РНК и белка, кодируемого РНК. Такая самоамплифицирующаяся РНК может иметь структурные особенности или компоненты любых из тех, что описаны в публикации международной патентной заявки № WO2011005799 (содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

### Дозирование

[0370] В настоящем раскрытии представлены способы, включающие введение любого одного или нескольких компонентов системы биосхемы СА2 нуждающемуся в этом субъекту. Их можно вводить субъекту с использованием любого количества и любого пути введения, эффективного для предотвращения или лечения или визуализации заболевания, расстройства и/или состояния (например, заболевания, расстройства и/или состояния, связанного с раком или аутоиммунным заболеванием). Точное требуемое количество будет варьироваться от субъекта к субъекту, в зависимости от вида, возраста и общего состояния субъекта, серьезности заболевания, конкретной композиции, способа введения, режима активности и тому подобное.

[0371] Композиции в соответствии с настоящим описанием обычно составляют в виде стандартной лекарственной формы для простоты введения и единообразия дозировки. Однако следует понимать, что общее ежедневное использование композиций согласно настоящему раскрытию может быть определено лечащим врачом в рамках обоснованного медицинского заключения. Конкретный терапевтически эффективный, профилактически эффективный или подходящий уровень дозы для визуализации для любого конкретного пациента будет зависеть от множества факторов, включая заболевание, которое лечат, и тяжесть нарушения; активность конкретного используемого соединения; конкретный используемый состав; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету пациента; время введения, путь введения и скорость выведения конкретного применяемого соединения; продолжительность лечения; лекарственные средства, применяемые в комбинации или одновременно с конкретным используемым соединением; и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

[0372] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиции можно использовать в различных дозах, чтобы избежать истощения Т-клеток, предотвратить синдром высвобождения цитокинов и минимизировать токсичность, связанную с иммунотерапией. Например, низкие дозы композиций согласно настоящему

раскрытию можно использовать для первоначального лечения пациентов с высокой опухолевой нагрузкой, в то время как пациентов с низкой опухолевой нагрузкой можно лечить высокими и многократными дозами композиций, описанных в настоящем документе, для обеспечения распознавания минимальной опухолевой антигенной нагрузки. В другом случае композиции согласно настоящему раскрытию можно доставлять пульсирующим образом для снижения тонической передачи сигналов Т-клетками и повышения устойчивости *in vivo*. В некоторых аспектах токсичность может быть минимизирована путем первоначального использования низких доз композиций согласно настоящему раскрытию перед введением высоких доз. Дозировка может быть изменена, если сывороточные маркеры, такие как ферритин, сывороточный С-реактивный белок, IL6, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , повышены.

[0373] В некоторых вариантах осуществления нейротоксичность может быть связана с терапией CAR или TIL. Такая нейротоксичность может быть связана с CD19-CAR. Токсичность может быть связана с чрезмерной инфильтрацией Т-лимфоцитов в головной мозг. В некоторых вариантах осуществления нейротоксичность можно уменьшить путем предотвращения прохождения Т-клеток через гематоэнцефалический барьер. Этого можно достичь с помощью направленной делеции гена эндогенных ингибиторов интегрина альфа-4, таких как тисабри/натализумаб, которые также можно использовать в настоящем изобретении.

[0374] В настоящем документе также представлены способы введения лигандов в соответствии с изобретением нуждающемуся в этом субъекту. Лиганд можно вводить субъекту или в клетки с использованием любого количества и любого пути введения, эффективного для настройки биосхем CA2 согласно настоящему раскрытию. Точное требуемое количество будет варьироваться от субъекта к субъекту, в зависимости от вида, возраста и общего состояния субъекта, серьезности заболевания, конкретной композиции, способа введения, режима активности и тому подобное. Субъект может быть человеком, млекопитающим или животным. Для простоты введения и единообразия дозировки композиции в соответствии с изобретением обычно составляют в виде стандартной лекарственной формы. Однако следует понимать, что общее ежедневное использование композиций согласно настоящему раскрытию может быть определено лечащим врачом в рамках обоснованного медицинского заключения. В некоторых вариантах осуществления лиганды в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в дозах, достаточных для доставки от примерно 0,0001 мг/кг до примерно 100 мг/кг, от примерно 0,001 мг/кг до примерно 0,05 мг/кг, от примерно 0,005 мг/кг до примерно 0,05 мг/кг, от примерно 0,001 мг/кг до примерно 0,005 мг/кг, от примерно 0,05 мг/кг до примерно 0,5 мг/кг, от примерно 0,01 мг/кг до примерно 50 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 40 мг/кг, от примерно 0,5 мг/кг до примерно 30 мг/кг, от примерно 0,01 мг/кг до примерно 10 мг/кг, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 10 мг/кг или от примерно 1 мг/кг до примерно 25 мг/кг, от примерно 10 мг/кг до примерно 100 мг/кг, от примерно 50 мг/кг до примерно 500 мг/кг, от примерно 100 мг/кг до примерно 1000 мг/кг массы тела субъекта в день один или несколько раз в день

для получения желаемого эффекта. В некоторых вариантах осуществления уровни дозировки могут составлять 1 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг, 50 мг/кг, 60 мг/кг, 70 мг/кг., 80 мг/кг, 90 мг/кг, 100 мг/кг, 100 мг/кг, 110 мг/кг, 120 мг/кг, 130 мг/кг, 140 мг/кг, 150 мг/кг, 160 мг/кг, 170 мг/кг, 180 мг/кг, 190 мг/кг массы тела субъекта в день или более раз в день для получения желаемого эффекта.

[0375] В настоящем раскрытии представлены способы доставки в клетку или ткань любого из лигандов, описанных в данном документе, включающие введение клетки или ткани в контакт с указанным лигандом, и которые можно осуществлять *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления лиганды в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в клетки в дозах, достаточных для доставки от примерно 1 нМ до примерно 10 нМ, от примерно 5 нМ до примерно 50 нМ, от примерно 10 нМ до примерно 100 нМ, от примерно 50 нМ до примерно 500 нМ, от примерно 100 нМ до примерно 1000 нМ, от примерно 1 мкМ до примерно 10 мкМ, от примерно 5 мкМ до примерно 50 мкМ, от примерно 10 мкМ до примерно 100 мкМ, от примерно 25 мкМ до примерно 250 мкМ, от примерно 50 мкМ до примерно 500 мкМ. В некоторых вариантах осуществления лиганд можно вводить в клетки в дозах, выбранных, но без ограничения, из 0,00064 мкМ, 0,0032 мкМ, 0,016 мкМ, 0,08 мкМ, 0,4 мкМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 10 мкМ, 50 мкМ, 75 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 175 мкМ, 200 мкМ, 250 мкМ.

[0376] Желаемая доза лигандов согласно настоящему раскрытию может быть доставлена только один раз, три раза в день, два раза в день, один раз в день, через день, раз в три дня, каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели или каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления желаемая доза может быть доставлена с использованием многократных введений (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или более введений). При использовании множества введений можно использовать режимы отдельного дозирования, такие как описаны в данном документе. В рамках настоящего изобретения термин «разделенная доза» означает разделение «разовой стандартной дозы» или общей суточной дозы на две или более доз, например, два или более введения «разовой стандартной дозы». В рамках настоящего изобретения термин «разовая стандартная доза» означает дозу любого терапевтического средства, вводимую в виде одной дозы/за один раз/за один прием/в одном месте контакта, то есть за разовое введение. Желаемая доза лиганда согласно настоящему раскрытию может вводиться в виде «импульсной дозы» или в виде «непрерывного потока». В рамках настоящего изобретения «импульсная доза» представляет собой серию единичных стандартных доз любого терапевтического средства, вводимых с заданной частотой в течение определенного периода времени. В рамках настоящего изобретения термин «непрерывный поток» означает дозу терапевтического средства, вводимую непрерывно в течение определенного периода времени одним путем/в одном месте контакта, то есть при непрерывном введении. Общая суточная доза, количество, данное или прописанное в течение 24-часового периода, может быть введена любым из этих способов, или в виде комбинации этих способов, или любыми другими

способами, подходящими для фармацевтического введения.

### Введение

[0377] В некоторых вариантах осуществления композиции для иммунотерапии можно вводить в клетки *ex vivo* и впоследствии вводить субъекту. Иммунные клетки можно выделять и размножать *ex vivo* с использованием множества способов, известных в данной области. Например, способы выделения цитотоксических Т-клеток описаны в патентах США №№ 6805861 и 6531451; содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Выделение НК-клеток описано в патенте США № 7435596; содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0378] В некоторых вариантах осуществления, в зависимости от природы клеток, клетки можно вводить в организм-хозяин, например, млекопитающему, различными способами, включая инъекцию, трансфузию, инфузию, местную инстилляцию или имплантацию. В некоторых аспектах описанные в данном документе клетки можно вводить в участок опухоли. Количество используемых клеток будет зависеть от ряда обстоятельств, цели введения, времени жизни клеток, используемого протокола, например, количества введений, способности клеток размножаться и тому подобное. Клетки могут находиться в физиологически приемлемой среде.

[0379] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки можно вводить в нескольких дозах субъектам, имеющим заболевание или состояние. Введение обычно приводит к улучшению одного или нескольких симптомов рака или клинического состояния и/или лечит или предотвращает рак, или клиническое состояние, или его симптомы.

[0380] В некоторых вариантах осуществления композиции для иммунотерапии можно вводить *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления полипептиды согласно настоящему раскрытию, содержащие биосхемы CA2, эффекторные молекулы CA2, SRE, представляющие интерес грузы (например, иммунотерапевтические средства) и композиции, описанные в настоящем документе, могут быть доставлены субъекту *in vivo*. Доставка иммунотерапевтических средств *in vivo* хорошо описана в данной области. Например, способы доставки цитокинов описаны в Е.Р. патенте № EP0930892 A1, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

### Пути доставки

[0381] Фармацевтические композиции, биосхемы CA2, компоненты биосхем CA2, эффекторные модули CA2, содержащие их SRE (например, DD CA2), грузы (например, иммунотерапевтические средства), векторы и клетки согласно настоящему раскрытию, можно вводить любым путем для достижения терапевтически эффективного результата.

К ним относятся, но без ограничения, энтеральный (в кишечник), гастроэнтеральный, эпидуральный (в твердую оболочку спинного мозга), пероральный (через рот), трансдермальный, перидуральный, интрацеребральный (в головной мозг), интрацеребровентрикулярный (в желудочек мозга), надкожный (нанесение на кожу),

внутрикожный (в саму кожу), подкожный (под кожу), назальное введение (через нос), внутривенный (в вену), внутривенный болюсный, внутривенный капельный, внутриартериальный (в артерию), внутримышечный (в мышцу), внутрисердечный (в сердце), внутрикостная инфузия (в костный мозг), интратекальный (в позвоночный канал), внутрибрюшинный (инфузия или инъекция в брюшину), внутрипузырная инфузия, интравитреальный (через глаз), внутрикавернозное введение (в патологическую полость), внутripолостное (в основание полового члена), внутривлагалищное введение, внутриматочное, экстраамниотическое введение, трансдермальный (диффузия через неповрежденную кожу для системного распространение), трансмукозальный (диффузия через слизистую оболочку), трансвагинальный, инсуффляционный (втягивание носом), сублингвальный, сублабиальный, клизма, глазные капли (на конъюнктиву), ушные капли, аурикулярный (в ухо или через ухо), буккальный (направлен в щеку), конъюнктивальный, кожный, дентальный (в зуб или зубы), электроосмос, эндоцервикальный, эндосинусиальный, эндотрахеальный, экстракорпоральный, гемодиализный, инфильтрационный, интерстициальный, внутрибрюшной, внутриамниотический, внутрисуставный, внутрибилиарный, внутрибронхиальный, интрабурсальный, внутривисцеральный (внутрь хряща), интракаудальный (внутрь хвоста лошади), интрацистернальный (внутрь мостомозжечковой цистерны), внутривисцеральный (внутрь роговицы), дентальный интракорональный, интракоронарный (внутрь коронарных артерий), внутрь кавернозного тела (в расширяемые пространства кавернозного тела полового члена), интрадискальный (внутрь диска), внутривисцеральный (внутрь протока железы), интрадуоденальный (внутрь двенадцатиперстной кишки), интрадуральный (внутрь или под твердую оболочку), внутриэпидермальный (в эпидермис), внутривисцеральный (в пищевод), внутривисцеральный (в желудок), внутривисцеральный (в десны), интраилеальный (в дистальную часть тонкой кишки), внутрь очага поражения (внутрь или непосредственно в локализованное поражение), внутривисцеральный (в просвет протока), внутривисцеральный (внутрь лимфы), интрамедуллярный (в полость костного мозга), интраменингеальный (внутрь мозговой оболочки), интрамиокардиальный (в миокард), внутривисцеральный (внутрь глаза), интраовариальный (в яичник), интраперикардиальный (в перикард), внутривисцеральный (в плевру), интрапростатический (в предстательную железу), внутривисцеральный (в легкие или бронхи), интрасинальный (в носовой или периорбитальный пазухи), интраспинальный (внутрь позвоночного столба), интрасиновиальный (внутрь синовиальной полости сустава), внутривисцеральный (внутрь сухожилия), интратестикулярный (внутрь яичка), интратекальный (внутрь спинномозговой жидкости при любом уровне спинномозговой оси), внутривисцеральный (внутрь грудной клетки), внутривисцеральный (внутрь канальцев органа), внутривисцеральный (внутрь опухоли), интратимпанальный (внутрь среднего уха), внутривисцеральный (в сосуд или сосуды), внутривисцеральный (внутрь желудочка), ионофорез (с помощью электрического тока, при котором ионы растворимых солей мигрируют в ткани тела), орошение (для омовения или промывания открытых ран или полостей тела), ларингеальный (непосредственно на

гортань), назогастральный (через нос и в желудок), техника окклюзионной повязки (местное введение с последующим покрытием повязкой, закрывающей область), офтальмологический (во внешний глаз), ротоглоточный (непосредственно в рот и глотку), парентеральный, чрескожный, периартикулярный, перидуральный, периневральный, пародонтальный, ректальный, респираторный (в дыхательные пути путем вдыхания перорально или назально для местного или системного действия), ретробульбарный (за варолиев мостом или за глазное яблоко), интрамиокардиальный (введение в миокард), в мягкие ткани, субарахноидальный, субконъюнктивальный, подслизистый, местный, трансплацентарный (через плаценту или через нее), транстрахеальный (через стенку трахеи), транстимпанальный (поперек или через барабанную полость), мочеточниковый (в мочеточник), уретральный (в уретру), вагинальный, каудальная блокада, диагностический, блокада нервов, перфузия желчевыводящих путей, перфузия сердца, фотоферез или спинномозговой.

#### Парентеральное и инъекционное введение

[0382] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, биосхемы CA2, компоненты биосхем CA2, эффекторные модули CA2, содержащие их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию, можно вводить парентерально. Жидкие лекарственные формы для перорального и парентерального введения включают, но без ограничения, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и/или эликсиры. В дополнение к активным ингредиентам жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной области, такие как, например, вода или другие растворители, солюбилизующие средства и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, зародышевое, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот сорбитана и их смеси. Помимо инертных разбавителей, пероральные композиции могут включать вспомогательные средства, такие как смачивающие средства, эмульгирующие и суспендирующие средства, подсластители, ароматизаторы и/или отдушки. В некоторых вариантах осуществления для парентерального введения композиции смешивают с солюбилизующими средствами, такими как CREMOPHOR®, спиртами, маслами, модифицированными маслами, гликолями, полисорбатами, циклодекстринами, полимерами и/или их комбинациями. В других вариантах осуществления имеются поверхностно-активные вещества, такие как гидроксипропилцеллюлоза.

[0383] Препараты для инъекций, например, стерильные водные или масляные суспензии для инъекций, могут быть составлены в соответствии с известными методами с использованием подходящих диспергирующих средств, смачивающих средств и/или суспендирующих средств. Стерильные препараты для инъекций могут быть стерильными растворами для инъекций, суспензиями и/или эмульсиями в нетоксичных парентерально

приемлемых разбавителях и/или растворителях, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых носителей и растворителей, которые можно использовать, можно назвать воду, раствор Рингера, U.S.P и изотонический раствор хлорида натрия. Стерильные нелетучие масла обычно используют в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для этой цели можно использовать любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. При приготовлении инъекций можно использовать жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

[0384] Препараты для инъекций можно стерилизовать, например, путем фильтрации через фильтр, задерживающий бактерии, и/или путем включения стерилизующих средств в форме стерильных твердых композиций, которые можно растворять или диспергировать в стерильной воде или другой стерильной среде для инъекций перед использованием.

[0385] Чтобы продлить действие активных ингредиентов, часто желательно замедлить абсорбцию активных ингредиентов при подкожных или внутримышечных инъекциях. Это может быть достигнуто за счет использования жидких суспензий кристаллического или аморфного материала с плохой растворимостью в воде. Скорость абсорбции активных ингредиентов зависит от скорости растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристаллов и кристаллической формы. Альтернативно отсроченное всасывание парентерально вводимой лекарственной формы достигается растворением или суспендированием лекарственного средства в масляном носителе. Формы для инъекций с замедленным всасыванием получают путем образования микрокапсулированных матриц лекарственного средства в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения лекарственного средства и полимера и природы конкретного используемого полимера можно регулировать скорость высвобождения лекарственного средства. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают поли (ортоэфир) и поли (ангидриды). Препараты для инъекций с замедленным всасыванием получают путем захвата лекарственного средства липосомами или микроэмульсиями, которые совместимы с тканями тела.

#### Офтальмологическое или ушное введение

[0386] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, биосхемы CA2, компоненты биосхем CA2, эффекторные модули CA2, содержащие их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию, можно получать, упаковывать и/или продавать в препаратах, подходящих для офтальмологического и/или офтальмологического введения. Такие препараты могут, например, быть в форме глазных и/или ушных капель, включая, например, 0,1/1,0% (м/м) раствор и/или суспензию активного ингредиента в водных и/или масляных жидких вспомогательных средствах. Такие капли могут дополнительно содержать буферные средства, соли и/или один или несколько других любых дополнительных ингредиентов, описанных в данном документе. Другие пригодные для офтальмологического введения препараты включают те, которые содержат активные ингредиенты в микрокристаллической форме и/или в липосомальных препаратах. В качестве форм введения также можно использовать субретинальные вставки.

### Поддающиеся обнаружению средства и метки

[0387] Стимулы, системы и компоненты биосхем CA2, эффекторные модули CA2, содержащие SRE и грузы, могут быть ассоциированы или связаны с одним или несколькими радиоактивными средствами или поддающимися обнаружению средствами.

[0388] Эти средства включают различные органические малые молекулы, неорганические соединения, наночастицы, ферменты или ферментные субстраты, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы (например, люминол), биолюминесцентные материалы (например, люциферазу, люциферин и экуорин), хемилюминесцентные материалы, радиоактивные материалы (например,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{81\text{m}}\text{Kr}$ ,  $^{82}\text{Rb}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{133}\text{Xe}$ ,  $^{201}\text{Tl}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$  или  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (например, в виде пертехнетата (технетата (VII),  $\text{TcO}_4$ )) и контрастные средства (например, золото (например, наночастицы золота), гадолиний (например, хелатный Gd), оксиды железа (например, суперпарамагнитный оксид железа (SPIO), монокристаллические наночастицы оксида железа (MION) и сверхмелкий суперпарамагнитный оксид железа (USPIO)), хелаты марганца (например, Mn-DPDP), сульфат бария, йодсодержащие контрастные вещества (иогексол), микропузырьки или перфторуглероды).

[0389] В некоторых вариантах осуществления поддающееся обнаружению средство может представлять собой не поддающийся обнаружению предшественник, который становится поддающимся обнаружению после активации (например, флуорогенных конструкций тетразин-флуорофор (например, тетразин-BODIPY FL, тетразин-Oregon Green 488 или тетразин-BODIPY TMR-X) или активируемые ферментами флуорогенные средства (например, PROSENSE® (VisEn Medical))). Анализы *in vitro*, в которых могут быть использованы композиции, меченные ферментами, включают, но без ограничения, иммуноферментные анализы (ELISA), иммунопреципитационные анализы, иммунофлуоресценцию, иммуноферментные анализы (EIA), радиоиммуноанализы (RIA) и вестерн-блот-анализ.

### Наборы

[0390] Настоящее раскрытие включает в себя множество наборов для удобного и/или эффективного выполнения способов согласно настоящему раскрытию. Как правило, наборы будут содержать достаточное количество и/или множество компонентов, чтобы позволить пользователю выполнять одну или несколько процедур лечения субъекта (субъектов) и/или выполнять один или несколько экспериментов.

[0391] В одном варианте осуществления в настоящем раскрытии представлены наборы для ингибирования генов *in vitro* или *in vivo*, содержащие биосхему CA2 согласно настоящему раскрытию или комбинацию биосхем CA2 согласно настоящему раскрытию, необязательно в комбинации с любыми другими подходящими активными средствами.

[0392] Набор может дополнительно содержать упаковку и инструкции и/или средство доставки для образования композиции препарата. Средство доставки может содержать, например, физиологический раствор, буферный раствор.

[0393] В дополнительных вариантах осуществления представлены наборы для

скрининга анализов. В комплект входит контейнер для скринингового анализа. В набор должна быть включена инструкция по применению анализа и информация о методе скрининга.

#### IV. Варианты применения

[0394] Биосхемы CA2, эффекторные модули CA2, SRE, стимулы, композиции или системы, содержащие один или несколько стимулов, биосхемы CA2, эффекторные модули CA2 согласно настоящему раскрытию, могут быть использованы в большом количестве вариантов применения, включая, но без ограничения: для лечения, диагностики и прогноза, биоинженеров, биопроцессинга, биофабрики, исследовательских средств, метаболомики, экспрессии генов, замены ферментов и так далее.

#### Терапевтическое использование

##### Иммунотерапия рака

[0395] Иммунотерапия рака направлена на индукцию или восстановление реактивности иммунной системы по отношению к раку. Значительные успехи в исследованиях иммунотерапии привели к разработке различных стратегий, которые в широком смысле можно разделить на активную иммунотерапию и пассивную иммунотерапию. В общем, эти стратегии можно использовать для прямого уничтожения раковых клеток или для противодействия иммуносупрессивной микросреде опухоли. Активная иммунотерапия направлена на индукцию эндогенного длительного иммунного ответа, специфичного к опухолевым антигенам. Ответ может быть дополнительно усилен неспецифической стимуляцией модификаторов иммунного ответа, таких как цитокины. Напротив, пассивная иммунотерапия включает подходы, при которых хозяину вводят эффекторные иммунные молекулы, такие как опухолевые антиген-специфические цитотоксические Т-клетки или антитела. Этот подход недолговечен и требует нескольких вариантов применения.

[0396] Несмотря на значительные достижения эффективность текущих стратегий иммунотерапии ограничена ассоциированной токсичностью. Они часто связаны с узким терапевтическим окном, связанным с иммунотерапией, что частично возникает из-за необходимости довести терапевтическую дозу до предела потенциально фатальной токсичности, чтобы получить клинически значимый лечебный эффект. Кроме того, доза увеличивается *in vivo*, поскольку адоптивно перенесенные иммунные клетки продолжают размножаться внутри пациента, часто непредсказуемо.

[0397] Основным риском, связанным с иммунотерапией, являются побочные эффекты, специфические в отношении мишени, но не в отношении опухоли, возникающие в результате активации Т-клеток в ответ на нормальную тканевую экспрессию ассоциированного с опухолью антигена (ТАА). В клинических испытаниях с использованием Т-клеток, экспрессирующих Т-клеточный рецептор против специфического ТАА, сообщали о кожной сыпи, колите и потере слуха в ответ на иммунотерапию.

[0398] Иммунотерапия может также вызывать токсичность, специфическую в

отношении мишени и в отношении опухоли, которая возникает, когда опухолевые клетки гибнут в ответ на иммунотерапию. Побочные эффекты включают синдром лизиса опухоли, синдром высвобождения цитокинов и связанный с ним синдром активации макрофагов. Важно отметить, что эти побочные эффекты могут возникать во время разрушения опухолей, и, таким образом, даже успешная специфическая в отношении опухоли иммунотерапия может привести к токсичности. Таким образом, подходы к регулируемому контролю иммунотерапии весьма желательны, поскольку они могут снизить токсичность и максимизировать эффективность.

[0399] В настоящем описании представлены системы, композиции, иммунотерапевтические средства и способы иммунотерапии рака. Эти композиции обеспечивают регулирующую регуляцию экспрессии и функции генов при иммунотерапии. В настоящем раскрытии также представлены системы биосхемы CA2, эффекторные модули CA2, элементы ответа на стимул (SRE) и грузы, а также полинуклеотиды, кодирующие любое из вышеперечисленного. В одном аспекте системы, композиции, иммунотерапевтические средства и другие компоненты, описанные в данном документе, можно регулировать с помощью отдельно добавляемого стимула, который обеспечивает значительную гибкость для регулирования иммунотерапии рака. Кроме того, системы, композиции и способы согласно настоящему раскрытию также могут быть объединены с терапевтическими средствами, такими как химиотерапевтические средства, малые молекулы, генная терапия и антитела.

[0400] Настраиваемая природа систем и композиций, описанных в данном документе, может улучшить эффективность и продолжительность эффективности иммунотерапии. Обратимое подавление биологической активности адоптивно перенесенных клеток с использованием композиций согласно настоящему раскрытию позволяет максимизировать потенциал клеточной терапии без безвозвратного уничтожения и прекращения терапии.

[0401] В настоящем описании представлены способы точной настройки иммунотерапии после введения пациентам. Это, в свою очередь, повышает безопасность и эффективность иммунотерапии и увеличивает количество субъектов, которым иммунотерапия может принести пользу.

[0402] В одном варианте осуществления для иммунотерапии можно использовать системы биосхемы CA2, эффекторные модули CA2, SRE и компоненты, которые регулируют уровни экспрессии и активности любых средств. В качестве неограничивающих примеров иммунотерапевтическое средство может представлять собой антитело и его фрагменты и варианты, специфический для рака Т-клеточный рецептор (TCR) и его варианты, противоопухолевый химерный антигенный рецептор (CAR), химерного рецептора-переключателя, ингибитор коингибиторного рецептора или лиганда, агонист костимулирующего рецептора и лиганда, цитокин, хемокин, рецептор цитокина, рецептор хемокина, растворимый фактор роста, фактор метаболизма, суицидный ген, хоминговый рецептор или любое средство, которое вызывает иммунный ответ в клетке и у

субъекта.

[0403] В некоторых вариантах осуществления композиция для индукции иммунного ответа может содержать эффекторный модуль CA2. В некоторых вариантах осуществления эффекторный модуль CA2 может содержать элемент ответа на стимул (SRE), функционально связанный по меньшей мере с одним грузом. В одном аспекте грузом может быть иммунотерапевтическое средство.

[0404] В некоторых вариантах осуществления системы биосхемы CA2, эффекторные модули CA2 и композиции согласно настоящему раскрытию относятся к посттрансляционной регуляции функции белка (груза) противоопухолевых иммунных ответов иммунотерапевтических средств.

### **1. Адоптивный перенос клеток (адоптивная иммунотерапия)**

[0405] В некоторых вариантах осуществления для адоптивной клеточной терапии (АСТ) можно использовать клетки, которые генетически модифицированы для экспрессии по меньшей мере одной системы биосхемы CA2, эффекторного модуля CA2, SRE и/или представляющего интерес груза (например, иммунотерапевтического средства). В рамках настоящего изобретения термин «адоптивный перенос клеток» относится к введению иммунных клеток (от аутологичных, аллогенных или генетически модифицированных хозяев) с прямой противораковой активностью. АСТ показала себя многообещающей в клиническом применении против злокачественных и инфекционных заболеваний. Например, Т-клетки, генетически сконструированные для распознавания CD19, были использованы для лечения фолликулярной В-клеточной лимфомы (Kochenderfer et al., Blood, 2010, 116: 4099-4102; и Kochenderfer and Rosenberg, Nat Rev Clin Oncol., 2013, 10 (5): 267-276), и АСТ с использованием аутологичных лимфоцитов, генетически модифицированных для экспрессии противоопухолевых Т-клеточных рецепторов, была использована для лечения метастатической меланомы (Rosenberg and Dudley, Curr. Opin. Immunol. 2009, 21: 233-240).

[0406] Согласно настоящему раскрытию биосхемы и системы CA2 можно использовать при разработке и осуществления клеточной терапии, такой как адоптивная клеточная терапия. Некоторые эффекторные модули, используемые в клеточной терапии, представлены на фиг. 7-12 в международной публикации № WO2017/180587, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Биосхемы CA2, эффекторные модули CA2 и их SRE и грузы можно использовать в клеточной терапии для воздействия на CAR-терапию, в манипуляции или регуляции TIL, в аллогенной клеточной терапии, в комбинированной терапии Т-лимфоцитами с другими способами лечения (например, облучением, цитокинами), для кодирования сконструированных TCR или модифицированных TCR, или для усиления Т-клеток, отличных от TCR (например, путем введения генов цитокинов, генов ингибиторов контрольных точек PD1, CTLA4).

[0407] В настоящем документе представлены способы для использования в адоптивной клеточной терапии. Способы включают предварительное кондиционирование нуждающегося в этом субъекта, модуляцию иммунных клеток с помощью биосхем SRE,

CA2 и композиций согласно настоящему раскрытию, введение субъекту сконструированных иммунных клеток, экспрессирующих композиции, описанные в данном документе, и успешное приживление сконструированных клеток внутри субъекта.

[0408] В некоторых вариантах осуществления SRE, биосхемы CA2 и композиции согласно настоящему раскрытию можно использовать для минимизации режимов предварительного кондиционирования, связанных с адоптивной клеточной терапией. В рамках настоящего изобретения термин «предварительное кондиционирование» относится к любой терапевтической схеме, вводимой субъекту для улучшения результатов адоптивной клеточной терапии. Стратегии прекодиционирования включают, но без ограничения, облучение всего тела и/или лимфодеплицитную химиотерапию. Клинические испытания аддитивной терапии без предварительной подготовки не продемонстрировали какой-либо клинической пользы, что указывает на ее важность при АСТ. Тем не менее, предварительное кондиционирование связано со значительной токсичностью и ограничивает когорту субъектов, подходящих для АСТ. В некоторых случаях иммунные клетки для АСТ могут быть сконструированы для экспрессии цитокинов, таких как IL12 и IL15, в качестве груза с использованием SRE согласно настоящему раскрытию, чтобы снизить потребность в предварительном кондиционировании (Pengram et al. (2012) Blood 119 (18): 4133-41; содержание которого полностью включено посредством ссылки).

[0409] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки для АСТ могут быть дендритными клетками, Т-клетками, такими как CD8<sup>+</sup> Т-клетки и CD4<sup>+</sup> Т-клетки, натуральными киллерами (NK), NK-Т-клетками, цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL), инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (TIL), активированными лимфокином киллерами (LAK), Т-клетками памяти, регуляторными Т-клетками (Treg), хелперными Т-клетками, индуцированными цитокином киллерами (CIK) и любыми их комбинациями. В других вариантах осуществления иммуностимулирующие клетки для АСТ могут быть получены из эмбриональных стволовых клеток (ESC) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC). В некоторых вариантах осуществления для АСТ используют аутологичные или аллогенные иммунные клетки.

[0410] В некоторых вариантах осуществления клетки, используемые для АСТ, могут быть Т-клетками, сконструированными для экспрессии CAR, содержащих антигенсвязывающий домен, специфичный к антигену на представляющих интерес опухолевых клетках. В других вариантах осуществления клетки, используемые для АСТ, могут быть NK-клетками, сконструированными для экспрессии CAR, содержащих антигенсвязывающий домен, специфичный к антигену на представляющих интерес опухолевых клетках. Помимо адоптивного переноса генетически модифицированных Т-клеток (например, CAR Т-клеток) для иммунотерапии, для адоптивной иммунотерапии можно использовать альтернативные типы CAR-экспрессирующих лейкоцитов, как отдельно, так и в комбинации с CAR Т-клетками. В одном примере для АСТ можно использовать смесь Т-клеток и NK-клеток. Уровень экспрессии CAR в Т-клетках и NK-клетках, согласно настоящему раскрытию, настраивают и регулируют с помощью малой

молекулы, которая связывается с DD, функционально связанными с CAR в эффекторном модуле CA2.

[0411] В некоторых вариантах осуществления CAR согласно настоящему раскрытию могут быть помещены под транскрипционную регуляцию константного локуса Т-клеточного альфа-рецептора (TRAC) в Т-клетках для достижения однородной экспрессии CAR при одновременном повышении активности Т-клеток. Локус TRAC можно разрушить с помощью CRISPR/Cas 9, нуклеаз цинковых пальцев (ZFN), TALEN с последующей вставкой конструкции CAR. Способы создания конструкций CAR, направленных на локус TRAC, описаны в Euquem J. et al. (2017) *Nature*.543 (7643): 113-117 (содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

[0412] В некоторых вариантах осуществления NK-клетки, сконструированные для экспрессии настоящих композиций, можно использовать для АСТ. Активация NK-клеток вызывает зависимый от перфорина/гранзима апоптоз в клетках-мишенях. Активация NK-клеток также вызывает секрецию цитокинов, таких как IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и GM-CSF. Эти цитокины усиливают фагоцитарную функцию макрофагов и их антимикробную активность, а также усиливают адаптивный иммунный ответ за счет повышения регуляции презентации антигена антигенпредставляющими клетками, такими как дендритные клетки (DC) (обзор Vivier et al., *Nat. Immunol.*, 2008, 9 (5): 503-510).

[0413] Другие примеры генетической модификации могут включать введение химерных антигенных рецепторов (CAR) и подавление ингибирующих рецепторов NK-клеток, таких как NKG2A.

[0414] NK-клетки также могут быть генетически перепрограммированы для обхода сигналов ингибирования NK-клеток при взаимодействии с опухолевыми клетками. Например, использование CRISPR, ZFN или TALEN для генетической модификации NK-клеток для подавления их ингибирующих рецепторов может повысить противоопухолевую активность NK-клеток.

[0415] Иммунные клетки можно выделять и размножать *ex vivo* с использованием множества способов, известных в данной области. Например, способы выделения и размножения цитотоксических Т-клеток описаны в патентах США №№ 6805861 и 6531451; публикации патента США № US20160348072A1 и международной патентной публикации № WO2016168595A1; содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Выделение и размножение NK-клеток описано в патентной публикации США № US20150152387A1, патенте США № 7435596; и Oyer, J.L. (2016). *Cytotherapy*.18(5):653-63; содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. В частности, первичные NK-клетки человека можно размножать в присутствии фидерных клеток, например, линии миелоидных клеток, которая была генетически модифицирована для экспрессии мембраносвязанных IL15, IL21, IL12 и 4-1BBL.

[0416] В некоторых случаях субпопуляции иммунных клеток могут быть обогащены АСТ. Способы обогащения иммунных клеток описаны в международной патентной

публикации № WO2015039100A1. В другом примере Т-клетки, положительные по маркеру аттенуатора В- и Т-лимфоцитов (ВТLА), можно использовать для обогащения Т-клетками, которые обладают противораковой реактивностью, как описано в патентах США № 9512401 (содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

[0417] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки для АСТ могут быть истощены в выбранных субпопуляциях для увеличения размножения Т-клеток. Например, иммунные клетки могут быть истощены по Foxp3+ Т-лимфоцитам для минимизации противоопухолевого иммунного ответа с использованием методов, описанных в публикации патента США № US 20160298081A1; содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0418] В некоторых вариантах осуществления активация и размножение Т-клеток для АСТ достигается антигенной стимуляцией временно экспрессируемого химерного антигенного рецептора (СAR) на поверхности клетки. Такие способы активации описаны в международном патенте № WO2017015427, содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0419] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки могут активироваться антигенами, связанными с антигенпрезентирующими клетками (АРС). В некоторых вариантах осуществления АРС могут быть дендритными клетками, макрофагами или В-клетками, которые являются антигенспецифическими или неспецифическими. АРС могут быть аутологичными или гомологичными для своего органа. В некоторых вариантах осуществления АРС могут быть искусственными антигенпрезентирующими клетками (аАРС), такими как аАРС на основе клеток или бесклеточные аАРС. Клеточные аАРС могут быть выбраны либо из генетически модифицированных аллогенных клеток, таких как клетки эритролейкемии человека, либо из ксеногенных клеток, таких как мышинные фибробласты и клетки дрозодилы. Альтернативно, АРС могут быть бесклеточными, где антигены или костимулирующие домены представлены на синтетических поверхностях, таких как латексные шарики, полистирольные шарики, липидные везикулы или экзосомы.

[0420] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, в частности Т-клетки, можно размножить с использованием платформ искусственных клеток. В одном варианте зрелые Т-клетки могут быть получены с использованием искусственных органоидов тимуса (АТО), описанных Seet CS et al. 2017. Nat Methods. 14, 521-530 (содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки). АТО основаны на линии стромальных клеток, экспрессирующей дельта-подобным каноническим лигандом notch (DLL1). В этом методе стромальные клетки агрегируют с гемопоэтическими стволовыми клетками и клетками-предшественниками путем центрифугирования и размещают на вставке с культурой клеток на границе раздела воздух-текучая среда для создания культур органоидов. Т-клетки, происходящие из АТО, обладают наивными фенотипами, разнообразным репертуаром

рецепторов Т-клеток (TCR) и зависимой от TCR функцией.

[0421] В некоторых вариантах осуществления адоптивную клеточную терапию осуществляют путем аутологичного переноса, при этом клетки получают у субъекта, нуждающегося в лечении, и клетки после выделения и обработки вводят тому же субъекту. В других случаях АСТ может включать аллогенный перенос, при котором клетки выделяют и/или получают у субъекта-донора, отличного от субъекта-реципиента, который в конечном итоге получает клеточную терапию. Субъект-донор и субъект-реципиент могут быть генетически идентичными, похожими или могут экспрессировать один и тот же класс или подтип HLA.

[0422] В некоторых вариантах осуществления множественные иммунотерапевтические средства, введенные в иммунные клетки для АСТ (например, Т-клетки и NK-клетки), можно регулировать с помощью одной и той же системы биосхема CA2. В других вариантах осуществления множественные иммунотерапевтические средства, введенные в иммунные клетки для АСТ (например, Т-клетки и NK-клетки), можно регулировать с помощью различных систем биосхемы. В другом примере суицидный ген и конструкция CAR могут быть связаны с двумя отдельными эффекторными модулями.

[0423] После генетической модуляции с использованием SRE, биосхем CA2 и композиций, описанных в данном документе, клетки вводят нуждающемуся в этом субъекту. Способы введения клеток для адоптивной клеточной терапии известны и можно использовать в связи с предоставленными способами и композициями. Например, способы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2003/0170238, выданной Gruenberg et al; патенте США № 4690915, Rosenberg; Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol.* 8 (10): 577-85). См., например, Themeli et al. (2013) *Nat Biotechnol.* 31 (10): 928-933; Tsukahara et al (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 438 (1): 84-9; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8 (4): e61338; содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0424] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки для АСТ могут быть модифицированы для экспрессии одного или нескольких иммунотерапевтических средств, которые способствуют активации, инфильтрации, размножению, выживанию и противоопухолевым функциям иммунных клеток. Иммунотерапевтические средства могут быть вторыми CAR или TCR, специфичными для другой молекулы-мишени; цитокином или рецептором цитокина; химерного рецептора-переключателя, который преобразует ингибирующий сигнал в стимулирующий сигнал; хоминговый рецептор, который направляет адоптивно перенесенные клетки на участок-мишень, такой как опухолевая ткань; средство, оптимизирующее метаболизм иммунной клетки; или предохранительный ген-переключатель (например, суицидный ген), который убивает активированные Т-клетки, когда наблюдается тяжелое событие после адоптивного переноса клеток или когда перенесенные иммунные клетки больше не нужны.

[0425] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки, используемые для

адоптивного переноса клеток, можно генетически модифицировать для улучшения их устойчивости, цитотоксичности, способности нацеливания на опухоль и способности проникать на участки заболевания *in vivo*, с общей целью дальнейшего улучшения их способности уничтожения опухоли у онкологических больных. Одним из примеров является введение описанных в данном документе эффекторных модулей CA2, содержащих цитокины, такие как гамма-цитокины (IL2 и IL15), в иммунные клетки для стимулирования пролиферации и выживания иммунных клеток. Трансдукция генов цитокинов (например, гамма-цитокинов IL2 и IL15) в клетки будет способна размножать иммунные клетки без добавления экзогенных цитокинов, а НК-клетки, экспрессирующие цитокины, обладают повышенной противоопухолевой цитотоксичностью.

[0426] В некоторых вариантах осуществления биосхемы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 можно использовать для предотвращения истощения Т-клеток. В рамках настоящего изобретения термин «истощение Т-клеток» относится к постепенной и прогрессирующей потере функции Т-клеток, вызванной хронической активацией Т-клеток. Истощение Т-клеток является основным фактором, ограничивающим эффективность противовирусной и противоопухолевой иммунотерапии. Истощенные Т-клетки обладают низкой способностью к пролиферации и выработке цитокинов, одновременно с высокой скоростью апоптоза и высокой поверхностной экспрессией множественных ингибирующих рецепторов. Активация Т-клеток, приводящая к истощению, может происходить как в присутствии, так и в отсутствие антигена.

[0427] В некоторых вариантах осуществления биосхемы CA2 и их компоненты можно использовать для предотвращения истощения Т-клеток в контексте терапии Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR-T). В этом контексте истощение в некоторых случаях может быть вызвано олигомеризацией scFv CAR на поверхности клетки, что приводит к непрерывной активации внутриклеточных доменов CAR. В качестве неограничивающего примера CAR согласно настоящему раскрытию могут включать scFv, которые не могут олигомеризоваться. В качестве другого неограничивающего примера CAR, которые быстро интернализуются и повторно экспрессируются после воздействия антигена, также могут быть выбраны для предотвращения хронической олигомеризации scFv на поверхности клетки. В одном варианте осуществления каркасная область scFv может быть модифицирована для предотвращения конститутивной передачи сигналов CAR (Long et al. 2014. *Cancer Research*. 74 (19) S1; содержание которого полностью включено посредством ссылки). Настраиваемые системы биосхемы CA2 согласно настоящему раскрытию также можно использовать для регулирования поверхностной экспрессии CAR на поверхности Т-клеток, чтобы предотвратить хроническую активацию Т-клеток. Описанные в данном документе CAR также могут быть спроектированы так, чтобы минимизировать истощение. В качестве неограничивающего примера, сигнальный домен 41-BB может быть включен в конструкцию CAR для уменьшения истощения Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления любая из стратегий, раскрытых Long HA et al. можно использовать для предотвращения истощения (Long A H et al. (2015) *Nature Medicine* 21,

581-590; содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

[0428] В некоторых вариантах осуществления настраиваемая природа биосхем CA2 согласно настоящему раскрытию может быть использована для обращения вспять истощения человеческих Т-клеток, наблюдаемого при тонической передаче сигналов CAR. Обратимое подавление биологической активности адоптивно перенесенных клеток с использованием композиций согласно настоящему раскрытию можно использовать для отмены тонической передачи сигналов, которая, в свою очередь, может оживить Т-клетки. Обратное истощение можно измерить по подавлению множественных ингибирующих рецепторов, связанных с истощением.

[0429] В некоторых вариантах осуществления метаболические пути Т-клеток могут быть изменены, чтобы снизить предрасположенность Т-клеток к истощению. Метаболические пути могут включать, но без ограничения, гликолиз, цикл мочевины, цикл лимонной кислоты, бета-окисление, биосинтез жирных кислот, пентозофосфатный путь, биосинтез нуклеотидов и метаболические пути гликогена. В качестве неограничивающего примера для ограничения или предотвращения истощения Т-клеток можно использовать грузы, которые снижают скорость гликолиза (Long et al. *Journal for Immunotherapy of Cancer* 2013, 1 (Suppl 1): P21; содержание которого полностью включено посредством ссылки). В одном варианте осуществления Т-клетки согласно настоящему раскрытию можно использовать в комбинации с ингибиторами гликолиза, такими как 2-дезоксиглюкоза и рапамицин.

[0430] В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули CA2 согласно настоящему раскрытию, полезные для иммунотерапии, могут быть помещены под транскрипционную регуляцию константного локуса Т-клеточного альфа-рецептора (TRAC) в Т-клетках. Еуquem et al. показали, что экспрессия CAR из локуса TRAC предотвращает истощение Т-клеток и ускоренную дифференцировку Т-клеток, вызванную чрезмерной активацией Т-клеток (Еуquem J. et al (2017) *Nature*.543 (7643): 113-117; содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

[0431] В некоторых вариантах осуществления грузы, описанные в данном документе, можно использовать в сочетании с антителами или фрагментами, которые нацелены на маркеры поверхности Т-клеток, связанные с истощением Т-клеток. Маркеры поверхности Т-клеток, связанные с истощением Т-клеток, которые можно использовать, включают, но без ограничения, CTLA-1, PD-1, TGIT, LAG-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA и CD96.

[0432] В одном варианте осуществления груз, описанный в настоящем документе, может представлять собой CD276 CAR (с внутриклеточными доменами CD28, 4-1BB и CD3 дзета), который не показывает повышенную регуляцию маркеров, связанных с ранним истощением Т-клеток (см. публикацию международного патента № WO2017044699, содержание которой полностью включено посредством ссылки).

[0433] В некоторых вариантах осуществления композиции согласно настоящему

раскрытию можно использовать для изменения популяций TIL (инфильтрирующих опухоль лимфоцитов) у субъекта. В одном варианте осуществления любой из грузов, описанных в данном документе, можно использовать для изменения соотношения популяций CD4-положительных и CD8-положительных клеток. В некоторых вариантах осуществления TIL могут быть отсортированы *ex vivo* и сконструированы для экспрессии любого из цитокинов, описанных в данном документе. Описанные в данном документе грузы можно использовать для размножения популяций CD4 и/или CD8 TIL для усиления опосредованного TIL иммунного ответа.

## **2. Противораковые вакцины**

[0434] В некоторых вариантах осуществления биосхемы SA2, эффекторные модули SA2, грузы (например, иммунотерапевтические средства), векторы, клетки и композиции согласно настоящему раскрытию можно использовать в сочетании с противораковыми вакцинами.

[0435] В некоторых вариантах осуществления противораковая вакцина может содержать пептиды и/или белки, полученные из антигена, ассоциированного с опухолью (ТАА). Такие стратегии можно использовать для вызова иммунного ответа у субъекта, который в некоторых случаях может быть ответом цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL). Пептиды, используемые для противораковых вакцин, также можно модифицировать, чтобы они соответствовали мутационному профилю субъекта. Например, пептиды, полученные из EGFR, с мутациями, соответствующими мутациям, обнаруженным у нуждающегося в терапии субъекта, были успешно использованы у пациентов с раком легких (Li F et al. (2016) *Oncoimmunology*. 7 октября; 5 (12): e1238539; содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

[0436] В одном варианте осуществления противораковые вакцины согласно настоящему раскрытию могут представлять собой суперагонистически измененные пептидные лиганды (APL), полученные из ТАА. Это мутантные пептидные лиганды, которые отклоняются от нативной пептидной последовательности на одну или несколько аминокислот, которые активируют специфические клоны CTL более эффективно, чем нативные эпитопы. Эти изменения могут позволить пептиду лучше связываться с ограничивающей молекулой МНС класса I или более благоприятно взаимодействовать с TCR данной опухолеспецифической подгруппы CTL. APL могут быть выбраны с использованием методов, описанных в патентной публикации США № US 20160317633A1, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

## **3. Комбинированные способы лечения.**

[0437] В некоторых вариантах осуществления желательно комбинировать описанные в данном документе композиции, векторы и клетки для введения субъекту. Описанные в данном документе композиции, содержащие различные иммунотерапевтические средства, можно использовать в комбинации для усиления иммунотерапии.

[0438] В некоторых вариантах осуществления желательно комбинировать

описанные в данном документе композиции с вспомогательными средствами, которые могут повышать эффективность и продолжительность антиген-специфических иммунных ответов. Вспомогательные средства, используемые в качестве иммуностимуляторов в комбинированной терапии, включают биологические молекулы или носители для доставки, которые доставляют антигены. В качестве неограничивающих примеров композиции согласно настоящему раскрытию можно комбинировать с биологическими вспомогательными средствами, такими как цитокины, Toll-подобные рецепторы, бактериальные токсины и/или сапонины. В других вариантах осуществления композиции согласно настоящему раскрытию можно комбинировать с носителями для доставки. Примеры носителей для доставки включают полимерные микросферы, иммуностимулирующие комплексы, эмульсии (масло в воде или вода в масле), соли алюминия, липосомы или виросомы.

[0439] В некоторых вариантах осуществления эффекторные иммунные клетки, модифицированные для экспрессии биосхем CA2, эффекторных модулей CA2, SRE и грузов, описанных в данном документе, могут быть объединены с биологическими вспомогательными средствами, описанными в данном документе, с двойной регуляцией CAR и цитокинов, и лигандов для отделения кинетического регулирования опосредованной мишенью активации от естественного размножения Т-клеток. Такое двойное регулирование также сводит к минимуму необходимость в режимах предварительного кондиционирования пациентов.

[0440] В некоторых вариантах осуществления эффекторные иммунные клетки, модифицированные для экспрессии одного или нескольких антигенспецифических TCR или CAR, могут быть объединены с описанными в данном документе композициями, содержащими иммунотерапевтические средства, которые преобразуют иммуносупрессивную микросреду опухоли.

[0441] В одном аспекте эффекторные могут быть объединены иммунные клетки, модифицированные для экспрессии CAR, специфичных для разных молекул-мишеней в одной и той же клетке. В другом аспекте различные иммунные клетки, модифицированные для экспрессии одной и той же конструкции CAR, такие как NK-клетки и Т-клетки, можно использовать в комбинации для лечения опухоли, например, Т-клетки, модифицированные для экспрессии CAR CD19, можно объединить с NK-клетками, модифицированными для экспрессии того же самого CD19 CAR для лечения В-клеточного злокачественного новообразования.

[0442] В других вариантах осуществления иммунные клетки, модифицированные для экспрессии CAR, можно комбинировать со средствами, блокирующими контрольные точки.

[0443] В некоторых вариантах осуществления эффекторные иммунные клетки, модифицированные для экспрессии биосхем CA2, эффекторных модулей CA2, SRE и грузов, описанных в настоящем документе, могут быть объединены с противораковыми вакцинами, описанными в настоящем документе.

[0444] В некоторых вариантах осуществления способы согласно настоящему раскрытию могут включать комбинацию композиций согласно настоящему раскрытию с другими средствами, эффективными при лечении рака, инфекционных заболеваний и других иммунодефицитных нарушений, такими как противораковые средства. В рамках настоящего изобретения термин «противораковое средство» относится к любому средству, которое способно отрицательно влиять на рак у субъекта, например, убивая раковые клетки, индуцируя апоптоз в раковых клетках, снижая скорость роста раковых клеток, уменьшая частоту или количество метастазов, уменьшая размер опухоли, ингибируя рост опухоли, уменьшая кровоснабжение опухоли или раковых клеток, стимулируя иммунный ответ против раковых клеток или опухоли, предотвращая или подавляя прогрессирование рака или увеличивая продолжительность жизни субъекта с раком.

[0445] В некоторых вариантах осуществления противораковое средство или терапия может представлять собой химиотерапевтическое средство или лучевую терапию, иммунотерапевтическое средство, хирургическое вмешательство или любое другое терапевтическое средство, которое в сочетании с настоящим раскрытием улучшает терапевтическую эффективность лечения.

[0446] В одном варианте осуществления эффекторный модуль CA2, содержащий CD19 CAR, может быть использован в комбинации с производными аминопиримидина, такими как ингибитор киназы тирозинового рецептора Беркитта (ВТК), с использованием способов, изложенных в международной патентной заявке № WO2016164580, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0447] В некоторых вариантах осуществления композиции согласно настоящему раскрытию можно использовать в комбинации с иммунотерапевтическими средствами, отличными от терапии согласно изобретению, описанной в данном документе, например, с антителами, специфичными к некоторым молекулам-мишеням на поверхности опухолевой клетки.

[0448] Примерами химиотерапевтических средств являются, без ограничения, ацивицин; акларубицин; акодазола гидрохлорид; акронин; адозелезин; альдеслейкин; альтретамин; амбомицин; аметантрона ацетат; амсакрин; анастрозол; антрамицин; аспарагиназа; асперрин, сулиндак, куркумин, алкилирующие средства, включая: азотные иприты, такие как мехлорэтамин, циклофосфамид, ифосфамид, мелфалан и хлорамбуцил; нитрозомочевины, такие как кармустин (BCU), ломустин (CCNU) и семустин (метил-CCU); тиленимины/метилмеламин, такие как триэтиленмеламин (ТЕМ), триэтилен, тиофосфорамид (тиотепа), гексаметилмеламин (НММ, альтретамин); алкилсульфонаты, такие как бусульфат; триазины, такие как дакарбазин (DTIC); антиметаболиты, в том числе аналоги фолиевой кислоты, такие как метотрексат и триметрексат, аналоги пирролидина, такие как 5-фторурацил, фтордезоксифуридин, гемцитабин, цитозинарабинозид (AraC, цитарабин), 5-азациитидин, 2,2'-дифтордеоксицитидин, аналоги пурина, такие как 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, азатиоприн, 2'-дезоксикоформин (пентостатин), эритрогидроксинониладенин (EHNA), флударабин фосфат и 2-хлордезоксиаденозин

(кладрибин, 2-CdA); натуральные продукты, включая антимиотические препараты, такие как паклитаксел, алкалоиды барвинка, включая винбластин (VLB), винкристин и винорелбин, таксотер, эстрамустин и эстрамустин фосфат; эпиподофилотоксины, такие как этопозид и тенипозид; антибиотики, такие как актимицин D, дауномицин (рубидомицин), доксорубицин, митоксантрон, идарубицин, блеомицины, пликамицин (митрамицин), митомицин С и актиномицин; ферменты, такие как L-аспарагиназа, цитокины, такие как интерферон (IFN)-гамма, фактор некроза опухоли (TNF)-альфа, TNF-бета и GM-CSF, антиангиогенные факторы, такие как ангиостатин и эндостатин, ингибиторы FGF или VEGF, такие как растворимые формы рецепторов ангиогенных факторов, включая растворимые рецепторы VGF/VEGF, координационные комплексы платины, такие как цисплатин и карбоплатин, антрацендионы, такие как митоксантрон, замещенная мочевины, такая как гидроксимочевина, производные метилгидразина, включая N-метилгидразин (MIFf) и прокарбазин, супрессоры адренкортикальной карциномы, такие как митотан (о, р'-DDD) и аминоклутетимид; гормоны и антагонисты, включая антагонисты адренкортикостероидов, такие как преднизон и его эквиваленты, дексаметазон и аминоклутетимид; прогестин, такой как гидроксипрогестерона капроат, медроксипрогестерона ацетат и мегестрола ацетат; эстроген, такой как эквиваленты диэтилстильбэстрола и этинилэстрадиола; антиэстроген, такой как тамоксифен; андрогены, включая пропионат и флуоксиместерон/эквиваленты тестостерона; антиандрогены, такие как флутамид, аналоги гонадотропин-рилизинг гормона и лейпролид; нестероидные антиандрогены, такие как флутамид; ингибиторы киназ, ингибиторы гистондеацетилазы, ингибиторы метилирования, ингибиторы протеасом, моноклональные антитела, оксиданты, антиоксиданты, ингибиторы теломеразы, миметики ВНЗ, ингибиторы убиквитинлигазы, ингибиторы stat и ингибиторы рецепторной тирозинкиназы, такие как иматиниба мезилат (продается как Gleevec или Glivec) и эрлотиниб (ингибитор рецептора EGF), который сейчас продается как Tarveca; противовирусные препараты, такие как осельтамивир фосфат, амфотерицин В и паливизумаб; Миметики Sdi 1; семустин; ингибитор старения 1; спарфоновая кислота; спикамицин D; спиромустин; спленопентин; спонгистатин 1; скваламин; стипиамид; ингибиторы стромелизина; сульфинозин; суперактивный антагонист вазоактивных кишечных пептидов; веларезол; верамин; вердины; вертепорфин; винорелбин; винксалтин; витаксин; ворозол; занотерон; зениплатин; зиласкорб; и стималамер зиностатина; низкомолекулярный ингибитор PI3K $\beta$ , GSK2636771; ингибитор пан-PI3K (BKM120); ингибиторы BRAF, вемурафениб (зелбораф) и дабрафениб (тафинлар); или любой аналог, производное и вариант вышеизложенного.

[0449] Радиотерапевтические средства и факторы включают излучение и волны, которые вызывают повреждение ДНК, например,  $\gamma$ -облучение, рентгеновские лучи, УФ-облучение, микроволны, электронные излучения, радиоизотопы и тому подобное. Терапия может быть достигнута путем облучения локализованного участка опухоли описанными выше формами излучения. Наиболее вероятно, что все эти факторы влияют на широкий спектр повреждений ДНК, на предшественников ДНК, репликацию и репарацию ДНК, а

также сборку и поддержание хромосом. Диапазоны дозировки рентгеновских лучей варьируются от суточных доз от 50 до 200 рентген в течение продолжительных периодов времени (от 3 до 4 недель) до разовых доз от 2000 до 6000 рентген. Диапазоны дозировки радиоизотопов широко варьируются и зависят от периода полураспада изотопа, силы и типа испускаемого излучения, а также от поглощения неопластическими клетками.

[0450] В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство может быть иммуномодулирующим средством, таким как леналидомид (LEN). Недавние исследования показали, что леналидомид может усиливать противоопухолевые функции модифицированных CAR T-клеток (Otahal et al., *Oncoimmunology*, 2015, 5 (4): e1115940). Некоторые примеры противоопухолевых антител включают тоцилизумаб, силтуксимаб.

[0451] Другие средства, которые можно использовать в комбинации с композициями согласно настоящему раскрытию, могут также включать, но без ограничения, средства, которые влияют на повышающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности и их лигандов, таких как лиганд Fas/Fas, DR4 или DR5/TRAIL и GAP-сшивки, цитостатические средства и средства дифференцировки, ингибиторы клеточной адгезии, такие как ингибиторы киназы фокальной адгезии (ФАК) и ловастатин, или средства, повышающие чувствительность гиперпролиферативных клеток к индукторам апоптоза, таким как антитело C225.

[0452] Комбинации могут включать введение композиций согласно настоящему раскрытию и других средств одновременно или по отдельности. Альтернативно, настоящая иммунотерапия может предшествовать или следовать за другим средством/терапией с интервалами в диапазоне от минут, дней, недель до месяцев.

#### **4. Болезни**

[0453] В настоящем описании предложен способ уменьшения объема опухоли или опухолевой нагрузки у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту композиции, описанной в данном документе.

[0454] В настоящем описании также представлены способы лечения рака у субъекта, включающие введение субъекту эффективного количества эффекторной иммунной клетки, генетически модифицированной для экспрессии по меньшей мере одного эффекторного модуля CA2, описанного в данном документе.

#### **Рак**

[0455] Различные виды рака можно лечить фармацевтическими композициями, биосхемами CA2, компонентами биосхем CA2, эффекторными модулями CA2, содержащими их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию. В рамках настоящего изобретения термин «рак» относится к любому из различных злокачественных новообразований, характеризующихся пролиферацией анапластических клеток, которые имеют тенденцию вторгаться в окружающие ткани и метастазировать в новые участки тела, а также относится к патологическому состоянию, характеризующемуся такими злокачественными новообразованиями. Раками могут быть опухоли или гематологические злокачественные новообразования, и они включают, но без ограничения, все типы

лимфом/лейкозов, карцином и сарком, таких как раковые образования или опухоли, обнаруженные в заднем проходе, мочевом пузыре, желчных протоках, костях, головном мозге, молочной железе, шейке матки, толстой/прямой кишке, эндометрии, пищеводе, глазе, желчном пузыре, голове и шее, печени, почке, гортани, легком, средостении (груди), во рту, яичниках, поджелудочной железе, половом члене, простате, коже, тонком кишечнике, желудке, спинном мозге, копчике, яичках, щитовидной железе и матке.

[0456] Типы карцином, которые можно лечить композициями согласно настоящему раскрытию, включают, но без ограничения, папиллому/карциному, хориокарциному, опухоль энтодермального синуса, тератому, аденому/аденокарциному, меланому, фиброму, липому, лейомиому, рабдомиому, мезотелиому, ангиому, остеому, хондрому, глиому, лимфому/лейкемию, плоскоклеточную карциному, мелкоклеточную карциному, крупноклеточную недифференцированную карциному, базальноклеточную карциному и недифференцированную карциному носовых пазух.

[0457] Типы сарком, которые можно лечить с помощью композиций согласно настоящему раскрытию, включают, но без ограничения, саркомы мягких тканей, такие как саркома альвеолярной мягкой части, ангиосаркома, дерматофибросаркома, десмоидная опухоль, десмопластическая мелкоклеточная опухоль, внескелетная хондросаркома, внескелетная остеосаркома, фибросаркома, гемангиоперицома, гемангиосаркома, саркома Капоши, лейомиосаркома, липосаркома, лимфангиосаркома, лимфосаркома, злокачественная фиброзная гистиоцитома, нейрофибросаркома, рабдомиосаркома, синовиальная саркома, и опухоль Аскина, саркома Юинга (примитивная нейроэктодермальная опухоль), злокачественная гемангиоэндотелиома, злокачественная шваннома, остеосаркома и хондросаркома.

[0458] В качестве неограничивающего примера карцинома, которую можно лечить, может представлять собой острый гранулоцитарный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз, аденокарциному, аденосаркому, рак надпочечников, адренкортикальную карциному, рак анального канала, анапластическую астроцитому, ангиосаркому, рак аппендикса, астроцитому, базально-клеточную карциному, В-клеточную лимфому, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак кости, рак кишечника, рак головного мозга, глиому ствола головного мозга, опухоль головного мозга, рак молочной железы, карциноидные опухоли, рак шейки матки, холангиокарциному, хондросаркому, хронический лимфолейкоз, хронический миелогенный лейкоз, рак толстой кишки, колоректальный рак, краниофарингиому, лимфому кожи, меланому кожи, диффузную астроцитому, протоковую карциному *in situ*, рак эндометрия, эпендимому, эпителиоидную саркому, рак пищевода, саркому Юинга, рак внепеченочных желчных протоков, рак глаза, рак маточной трубы, фибросаркому, рак желчного пузыря, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, карциноид желудочно-кишечного тракта, стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта, герминогенную опухоль, мультиформную глиобластому, глиому, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, гемангиоэндотелиому, лимфому Ходжкина, болезнь Ходжкина, рак гортани, инфильтрирующую протоковую карциному,

инфильтрирующую дольковую карциному, отечно-инфильтративный рак молочной железы, рак кишечника, рак внутривенных желчных протоков, инвазивный/инфильтрирующий рак молочной железы, рак островковых клеток, рак челюсти, саркому Капоши, рак почки, рак гортани, лейомиосаркому, лептоменингеальные метастазы, лейкемию, рак губы, липосаркому, рак печени, дольковую карциному *in situ*, астроцитому низкой степени злокачественности, рак легких, рак лимфатических узлов, лимфому, рак молочной железы у мужчин, медуллярную карциному, медуллобластому, меланому, менингиому, карциному из клеток Меркеля, мезенхимальную хондросаркому, мезенхимоз, мезотелиому, метастатический рак молочной железы, метастатическую меланому, метастатический плоскоклеточный рак шеи, смешанные глиомы, рак ротовой полости, муцинозную карциному, меланому слизистой оболочки, множественную миелому, рак полости носа, рак носоглотки, рак шеи, нейробластому, нейроэндокринные опухоли, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легкого, овсяноклеточный рак, рак глаза, меланому глаза, олигодендроглиому, рак полости рта, рак ротоглотки, остеогенную саркому, остеосаркому, рак яичников, эпителиальный рак яичников, герминогенную опухоль яичников, первичную перитонеальную карциному яичников, опухоль стромы полового канатика яичников, болезнь Педжета, рак поджелудочной железы, папиллярную карциному, рак придаточных пазух носа, рак парашитовидной железы, рак малого таза, рак полового члена, рак периферического нерва, рак брюшины, рак глотки, феохромоцитому, пилоцитарную астроцитому, опухоль шишковидной железы, пинеобластому, рак гипофиза, первичную лимфому центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечно-клеточный рак, рак почечной лоханки, рабдомиосаркому, рак слюнной железы, саркому, саркому кости, саркому мягких тканей, саркому матки, рак придаточной пазухи, рак кожи, мелкоклеточный рак легкого, рак тонкой кишки, рак позвоночника, рак позвоночника, рак спинного мозга, опухоль позвоночника, плоскоклеточный рак, рак желудка, синовиальную саркому, Т-клеточную лимфому, рак яичка, рак горла, тимому/карциному тимуса, рак щитовидной железы, рак языка, рак миндалин, переходно-клеточный рак, трижды негативный рак молочной железы, рак маточной трубы, трубную карциному, рак мочеочника, рак уретры, аденокарциному матки, рак матки, саркому матки, рак влагалища и рак вульвы.

### **Инфекционные заболевания**

[0459] В некоторых вариантах осуществления биосхемы CA2, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения инфекционных заболеваний. Биосхемы CA2 согласно настоящему раскрытию можно вводить в клетки, подходящие для адоптивного переноса клеток, такие как макрофаги, дендритные клетки, натуральные клетки-киллеры и/или Т-клетки. Инфекционные заболевания, которые лечат с помощью биосхем CA2 согласно настоящему раскрытию, могут быть заболеваниями, вызываемыми вирусами, бактериями, грибами и/или паразитами. Грузы IL15-IL15Ra согласно настоящему раскрытию можно использовать для увеличения пролиферации иммунных клеток и/или устойчивости иммунных клеток, полезных при лечении инфекционных

заболеваний.

[0460] «Инфекционные заболевания» в данном документе относятся к заболеваниям, вызываемым любым патогеном или агентом, который инфицирует клетки млекопитающих, предпочтительно клетки человека, и вызывает болезненное состояние. Их примеры включают бактерии, дрожжи, грибы, простейшие, микоплазмы, вирусы, прионы и паразиты. Примеры включают патогены или агенты, которые вовлечены в (а) вирусные заболевания, такие как, например, заболевания, возникшие в результате инфицирования аденовирусом, вирусом герпеса (например, HSV-I, HSV-II, CMV или VZV), поксвирусом (например, ортопоксвирусом, таким как натуральная оспа или коровья оспа, или контагиозный моллюск), пикорнавирусом (например, риновирусом или энтеровирусом), ортомиксовирусом (например, вирусом гриппа), парамиксовирусом (например, вирусом парагриппа, вирусом эпидемического паротита, вирусом кори и респираторно-синцитиальным вирусом (RSV)), коронавирусом (например, SARS), паповавирусом (например, папилломавирусом, таким как те, которые вызывают остроконечные кондиломы, обычные бородавки или подошвенные бородавки), гепаднавирусом (например, вирусом гепатита В), флавивирусом (например, вирусом гепатита С или вирусом денге) или ретровирусом (например, лентивирусом, таким как HIV); (b) бактериальные заболевания, такие как, например, заболевания, вызванные инфицированием бактериями, например, рода *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Listeria*, *Aerobacter*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Pneumococcus*, *Neisseria*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Serratia*, *Providencia*, *Chromobacterium*, *Brucella*, *Yersinia*, *Haemophilus* или *Bordetella*; (c) другие инфекционные заболевания, такие как хламидиоз, грибковые заболевания, включая, но без ограничения, кандидоз, аспергиллез, гистоплазмоз, криптококковый менингит, паразитарные заболевания, включая, но без ограничения, малярию, пневмоцистную пневмонию, лейшманиоз, криптоспоридиоз, токсоплазмоз и трипаносомную инфекцию и прионы, вызывающие такие заболевания человека, как болезнь Крейтцфельда-Якоба (CJD), вариант болезни Крейтцфельда-Якоба (vCJD), синдром Герстманна-Штрауслера-Шейнкера, фатальная семейная бессонница и куру.

#### **Комбинированное лечение**

[0461] Настоящее раскрытие дополнительно относится к применению фармацевтических композиций, биосхем CA2, компонентов биосхемы CA2, эффекторных модулей CA2, содержащие их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию, для лечения одной или нескольких форм рака в сочетании с другими фармацевтическими препаратами и/или другими терапевтическими методами, например, с использованием известных фармацевтических препаратов и/или известных терапевтических методов, таких как, например, те, которые в настоящее время используют для лечения этих нарушений. Например, фармацевтические композиции, биосхемы CA2, компоненты биосхем CA2, эффекторные модули CA2, содержащие их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию, также можно вводить в сочетании с одним или несколькими дополнительными

противораковыми методами лечения, такими как биологическая, химиотерапия и лучевая терапия. Соответственно, лечение может включать, например, иматиниб (гливек), полностью транс-ретиноевую кислоту, лечение моноклональными антителами (гемтузумаб, озогамицин), химиотерапию (например, хлорамбуцил, преднизон, преднизолон, винкристин, цитарабин, клофарабин, фарнезил, ингибиторы трансферазы, децитабин, ингибиторы MDR1), ритуксимаб, интерферон- $\alpha$ , антрациклиновые препараты (такие как даунорубицин или идарубицин), L-аспарагиназа, доксорубицин, циклофосфамид, доксорубицин, блеомицин, флударабин, этопозид, пентостатин или кладрибин, трансплантацию костного мозга, трансплантацию стволовых клеток, лучевую терапию, антимаболитные препараты (метотрексат и 6-меркаптопурин) или любые антитела, указанные в Таблице 5 международной публикации № WO2017/180587 (содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки) или их комбинации.

#### **Сочетания с облучением**

[0462] Лучевая терапия (также называемая радиотерапией, рентгеновской терапией или облучением) - это использование ионизирующего излучения для уничтожения раковых клеток и уменьшения размеров опухолей. Лучевую терапию можно проводить наружно с помощью дистанционной лучевой терапии (EBRT) или внутренне с помощью брахитерапии. Эффекты лучевой терапии локализованы и ограничены областью лечения. Лучевую терапию можно использовать для лечения почти всех типов солидных опухолей, включая рак головного мозга, молочной железы, шейки матки, гортани, легких, поджелудочной железы, простаты, кожи, желудка, матки или сарком мягких тканей. Радиацию также используют для лечения лейкемии и лимфомы.

#### **Сочетание с химиотерапией**

[0463] Химиотерапия - это лечение рака с помощью лекарств, которые могут разрушать раковые клетки. В настоящее время термин «химиотерапия» обычно относится к цитотоксическим лекарствам, которые влияют на быстро делящиеся клетки в целом, в отличие от таргетной терапии. Химиотерапевтические препараты мешают делению клеток различными способами, например, с дубликацией ДНК или разделением новообразованных хромосом. Большинство форм химиотерапии нацелены на все быстро делящиеся клетки и не специфичны для раковых клеток, хотя некоторая степень специфичности может быть обусловлена неспособностью многих раковых клеток восстанавливать повреждения ДНК, в то время как нормальные клетки, как правило, могут.

[0464] Большинство схем химиотерапии назначают в комбинации. Примеры химиотерапевтических средств включают, но без ограничения, энхансер 5-FU, 9-AC, AG2037, AG3340, ингибитор агреканызы, аминоклутетимид, амсакрин (m-AMSA), аспарагиназу, азацитидин, батимагат (BB94), BAY 12-9566, BCH-4556, бис-нафталимид, бусульфан, капецитабин, карбоплатин, кармастейн+полифепросан, ингибиторы cdk4/cdk2, хлорамбуцил, CI-994, цисплатин, кладрибин, CS-682, цитарабин HCl, D2163, дактиномицин, даунорубицин HCl, депоцит, дексифосамид, доцетаксел, доластаин,

доксифлуридин, доксорубин, DX8951f, E 7070, EGFR, эпирубин, эритропоэтин, эстрамустинофосфат натрия, этопозид (VP16-213), ингибитор фарнезилтрансферазы, FK 317, флавопиридол, флоксуридин, флударабин, фторурацил (5-FU), флутамид, фрагилин, гемцитабин, гексаметилмеламин (HMM), гидроксимочевина (гидроксикарбамид), ифосфамид, интерферон альфа-2а, интерферон альфа-2b, интерлейкин-2, иринотекан, ISI 641, крестин, лемонал DP 2202, лейпролида ацетат (аналог рилизинг-фактора LHRH), левамизол, LiGLA (литий-гамма-линоленат), Lodine Seeds, лометексол, ломустин (CCNU), маримистат, мехлоретамин HCl (азотистый иприт), мегестрола ацетат, мегламин GLA, меркаптопурин, месна, митогуазон (метил-GAG; метилглиоксальбис-гуанилгидразон; MGBG), митотан (о.р'-DDD), митоксантрон, митоксантрон HCl, MMI 270, MMP, MTA/LY 231514, октреотид, ODN 698, OK-432, пероральный платинум, пероральный таксоид, паклитаксел (TAXOL.RTM), ингибиторы PARP, PD 183805, пентостатин (2'-дезоксикоформицин), PKC 412, пликамицин, прокарбазин HCl, PSC 833, ралитрексед, ингибитор фарнезилтрансферазы RAS, ингибитор онкогена RAS, семустин (метил-CCNU), стрептозоцин, сурамин, тамоксифена цитрат, аналог таксана, темозоломид, тенипозид (VM-26), тиогуанин, тиотепа, топотекан, тирозинкиназа, UFT (тегафур/урацил), валрубин, винбластин сульфат, виндезинсульфат, VX-710, VX-853, YM 116, ZD 0101, ZD 0473/Анормед, ZD 1839, ZD 9331.

#### **Иммуноонкология и клеточная терапия**

[0465] Недавний прогресс в области иммунологии рака позволил разработать несколько подходов, которые помогают иммунной системе сдерживать рак. Такие иммунотерапевтические подходы включают нацеливание на раковые антигены с помощью моноклональных антител или адаптивного переноса сконструированных ex vivo Т-клеток (например, которые содержат химерные антигенные рецепторы или сконструированные Т-клеточные рецепторы).

[0466] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, биосхемы CA2, компоненты биосхем CA2, эффекторные модули CA2, содержащие их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию, можно использовать для модуляции, изменения или использования иммунной системы для нацеливания на один или несколько видов рака. Этот подход также можно рассматривать с другими такими биологическими подходами, например, методами лечения, модифицирующими иммунный ответ, такими как применение интерферонов, интерлейкинов, колониестимулирующих факторов, других моноклональных антител, вакцин, генной терапии и неспецифических иммуномодулирующих средств, которые также рассматриваются как противораковая терапия, которую необходимо комбинировать с фармацевтическими композициями, биосхемами CA2, компонентами биосхем CA2, эффекторными модулями CA2, содержащими их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию.

[0467] Иммунотерапия рака относится к разнообразному набору терапевтических стратегий, разработанных для побуждения собственной иммунной системы пациента к борьбе с раком. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции,

биосхемы CA2, компоненты биосхем CA2, эффекторные модули CA2, содержащие их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию, разработаны в виде иммуноонкологических терапевтических средств.

### **Клеточная терапия**

[0468] Существует несколько типов клеточной иммунотерапии, включая терапию инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (TIL), генно-инженерные Т-клетки, несущие химерные антигенные рецепторы (CAR), и технологию рекомбинантных TCR.

[0469] Согласно настоящему раскрытию биосхемы и системы CA2 можно использовать для разработки и осуществления клеточной терапии, такой как адоптивная клеточная терапия. Некоторые эффекторные модули, используемые в клеточной терапии, представлены на фиг. 8-13 международной публикации WO2017/180587 (содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки). Биосхемы CA2, эффекторные модули CA2 и их SRE и грузы можно использовать в клеточной терапии для осуществления удаления TCR-разрушения гена TCR, конструирования TCR, для регулирования рецепторов, меченных эпитопами, в платформах APC для стимуляции Т-клеток, в качестве инструмента для усиления стимуляции APC *ex vivo*, для улучшения методов размножения Т-клеток, стимуляции антигеном *ex vivo*, в комбинациях TCR/CAR, в манипуляции или регуляции TIL, в терапии аллогенными клетками, в комбинированной Т-клеточной терапии с другими методами лечения (например, облучением, цитокинами), для кодирования сконструированных TCR или модифицированных TCR, или для усиления Т-клеток, отличных от TCR (например, путем введения генов цитокинов, генов ингибиторов контрольных точек PD1, CTLA4).

[0470] В некоторых вариантах осуществления в поддержку клеточной терапии получены улучшенные показатели ответа.

[0471] Размножение и сохранение клеточных популяций может быть достигнуто посредством регулирования или точной настройки грузов, например, рецепторов или компонентов пути в Т-клетках, NK-клетках или других связанных с иммунитетом клетках. В некоторых вариантах осуществления биосхемы CA2, их компоненты, SRE или эффекторные модули CA2 предназначены для пространственного и/или временного регулирования экспрессии белков, которые усиливают ответ Т-клеток или NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления биосхемы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 предназначены для пространственного и/или временного контроля экспрессии белков, которые ингибируют ответ Т-клеток или NK-клеток.

[0472] В некоторых вариантах осуществления биосхемы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 предназначены для изменения формы микросреды опухоли, чтобы расширить применимость биосхемы или фармацевтической композиции дальше прямого уничтожения клеток.

[0473] В некоторых вариантах осуществления биосхемы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 предназначены для уменьшения, смягчения или устранения CAR цитокинового шторма. В некоторых вариантах осуществления такое уменьшение,

смягчение и/или устранение происходит в солидных опухолях или в микросреде опухоли.

[0474] В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули CA2 могут кодировать один или несколько цитокинов.

[0475] В одном аспекте эффекторный модуль CA2 согласно настоящему раскрытию может быть полипептидом CA2 DD-CD40L. Регулируемый полипептид DD-CD40L можно непосредственно использовать в качестве иммунотерапевтического средства или трансдуцировать в эффекторные иммунные клетки (Т-клетки и ТИЛ-клетки) для создания модифицированных Т-клеток с большей способностью к размножению и выживанию *in vivo* для адоптивного переноса клеток. Необходимость в жестких режимах прекондиционирования в современной адоптивной клеточной терапии может быть сведена к минимуму с помощью регулируемого CA2 DD-CD40L для модификации микросреды опухоли и повышения устойчивости солидных опухолей, которые в настоящее время невосприимчивы к терапии, направленной на опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки, экспрессирующие CAR, могут быть защищены DD-регулируемым CD40L для снятия иммуносупрессии без системной токсичности.

[0476] Иммунную систему можно использовать для лечения заболеваний помимо рака. Биосхемы CA2, их компоненты, SRE или эффекторные модули CA2 можно использовать в иммунотерапии для лечения заболеваний, включая, но без ограничения, аутоиммунные заболевания, аллергии, болезнь трансплантата против хозяина, а также заболевания и расстройства, которые могут привести к иммунодефициту, например, приобретенному синдрому иммунодефицита (AIDS).

[0477] В некоторых вариантах осуществления груз согласно настоящему раскрытию может представлять собой химерный антигенный рецептор (CAR), который при трансдукции в иммунные клетки (например, Т-клетки и НК-клетки) может перенаправлять иммунные клетки против мишени (например, опухолевой клетки), которая экспрессирует молекулу, распознаваемую внеклеточным фрагментом-мишенью CAR.

[0478] В рамках настоящего изобретения термин «химерный антигенный рецептор (CAR)» относится к синтетическому рецептору, который имитирует TCR на поверхности Т-клеток. В общем, CAR состоит из внеклеточного нацеливающего домена, трансмембранного домена/области и внутриклеточного домена передачи сигналов/активации. В стандартном рецепторе CAR компоненты: внеклеточный нацеливающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен передачи сигналов/активации построены линейно в виде единого белка слияния. Внеклеточная область содержит нацеливающий домен/фрагмент (например, scFv), который распознает специфический опухолевый антиген или другие молекулы на поверхности опухолевых клеток. Внутриклеточная область может содержать сигнальный домен комплекса TCR (например, сигнальную область CD3 $\zeta$ ) и/или один или несколько костимулирующих сигнальных доменов, таких как домены CD28, 4-1BB (CD137) и OX-40 (CD134). Например, «CAR первого поколения» имеет только сигнальный домен CD3 $\zeta$ , тогда как CAR второго поколения имеют сигнальный домен CD3 $\zeta$  плюс один костимулирующий сигнальный

домен, а CAR третьего поколения имеют сигнальный домен CD3 $\zeta$  плюс два или более костимулирующих сигнальных домена. CAR, когда экспрессируется T-клеткой, наделяет T-клетку антигенной специфичностью, определяемой внеклеточным нацеливающим фрагментом CAR. Также желательно добавить один или несколько элементов, таких как хоминговые и суицидные гены, чтобы разработать более компетентную и безопасную архитектуру CAR, которая дала начало так называемому CAR четвертого поколения.

[0479] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный нацеливающий домен присоединен через шарнир (также называемый пространственным доменом или спейсером) и трансмембранные области с внутриклеточным сигнальным доменом. Шарнир, возможно, потребуется изменить для оптимизации эффективности клеток, экспрессирующих CAR, по отношению к раковым клеткам из-за размера белка-мишени, с которым связывается нацеливающий фрагмент, а также размера и аффинности самого нацеливающего домена. После распознавания и связывания нацеливающего фрагмента с клеткой-мишенью внутриклеточный сигнальный домен приводит к сигналу активации для CAR T-клетки, который дополнительно усиливается «вторым сигналом» от одного или нескольких внутриклеточных костимулирующих доменов. CAR T-клетка после активации может разрушить клетку-мишень.

[0480] Согласно настоящему раскрытию груз согласно настоящему раскрытию может быть CAR первого поколения, или CAR второго поколения, или CAR третьего поколения, или CAR четвертого поколения. Типичные варианты осуществления эффекторного модуля, содержащие конструкции CAR, показаны на фиг. 13-18 международной публикации № WO2017/180587 (содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

[0481] В соответствии с настоящим раскрытием внеклеточный фрагмент-мишень CAR может быть любым средством, которое распознает и связывается с данной молекулой-мишенью, например, неоантигеном на опухолевых клетках, с высокой специфичностью и аффинностью. Фрагмент-мишень может представлять собой антитело и его варианты, которые специфически связываются с молекулой-мишенью на опухолевых клетках, или пептидный аптамер, выбранный из пула случайных последовательностей на основании его способности связываться с молекулой-мишенью на опухолевых клетках, или их вариант или фрагмент, которые могут связываться с молекулой-мишенью на опухолевых клетках или доменом распознавания антигена из нативного T-клеточного рецептора (TCR) (например, внеклеточного домена CD4 для распознавания ВИЧ-инфицированных клеток) или экзотическими компонентами распознавания, такими как связанный цитокин, который приводит к распознаванию клеток-мишеней, несущих рецептор цитокина или природный лиганд рецептора.

[0482] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент конструкции CAR может быть природным лигандом молекулы-мишени или ее вариантом и/или фрагментом, способным связывать молекулу-мишень. В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент CAR может быть рецептором молекулы-мишени.

[0483] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент CAR может распознавать опухолеспецифический антиген (TSA), например, неоантиген рака, экспрессия которого ограничена опухолевыми клетками.

[0484] В качестве неограничивающих примеров, CAR согласно настоящему раскрытию может содержать внеклеточный нацеливающий домен, способный связываться с опухолеспецифическим антигеном, выбранным из 5T4, 707-AP, A33, AFP ( $\alpha$ -фетопротейна), АКАР-4 (якорного белка киназы 4), ALK,  $\alpha 5\beta 1$ -интегрина, рецептора андрогена, аннексина II, альфа-актинина-4, ART-4, B1, B7H3, B7H4, BAGE (антигена меланомы B), BCMA, белка слияния BCR-ABL, бета-катенина, BKT-антигена, BTAA, CA-I (карбоангидразы I), CA50 (раковый антиген 50), CA125, CA15-3, CA195, CA242, кальретинина, CAIX (карбоангидразы), CAMEL (цитотоксического распознаваемого Т-лимфоцитом антигена на меланоме), CAM43, CAP-1, каспазы-8/m, CD4, CD5, CD7, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD27, CD27/m, CD28, CD30, CD33, CD34, CD36, CD38, CD40/CD154, CD41, CD44v6, CD44v7/8, CD45, CD49f, CD56, CD68\KP1, CD74, CD79a/CD79b, CD103, CD123, CD133, CD138, CD171, cdc27/m, CDK4 (циклинзависимой киназы 4), CDKN2A, CDS, CEA (карциноэмбрионального антигена), CEACAM5, CEACAM6, хромогранина, c-Met, c-Myc, coa-1, C SAp, CT7, CT10, циклофилина B, циклина B1, цитоплазматических тирозинкиназ, цитокератина, DAM-10, DAM-6, белка слияния dectan, десмина, DEPDC1 (домена DEP, содержащего белок 1), E2A-PRL, EBNA, EGF-R (рецептора эпидермального фактора роста), EGP-1 (эпителиального гликопротеина-1) (TROP-2), EGP-2, EGP-40, EGFR (рецептора эпидермального фактора роста), EGFRvIII, EF-2, ELF2M, EMMPRIN, EpCAM (молекулы адгезии эпителиальных клеток), EphA2, антигенов вируса Эпштейна-Барра, Erb (ErbB1; ErbB3; ErbB4), ETA (эпителиального опухолевого антигена), белка слияния ETV6-AML1, FAP (белка активации фибробластов), FBP (связывающего фолат белка), FGF-5, рецептора фолиевой кислоты  $\alpha$ , связанного с FOS антигена 1, фукозила GM1, G250, GAGE (GAGE-1; GAGE-2), галактина, GD2 (ганглиозида), GD3, GFAP (глиального фибриллярного кислого белка), GM2 (онкофетального антиген-иммуногенного-1; OFA-I-1), GnT-V, Gp100, H4-RET, HAGE (антигена геликазы), HER-2/neu, HIF (факторов, индуцируемых гипоксией), HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HLA-A2, HLA-A\*0201-R170I, HLA-All, HMWMAA, Hom/Mel-40, HSP70-2M (белка теплового шока 70), HST-2, HTgp-175, hTERT (или hTRT), вируса папилломы человека-E6/вируса папилломы человека-E7 и E6, iCE (EIA с иммунным захватом), IGF-1R, IGH-IGK, IL2R, IL5, ILK (связанной с интегрином киназы), IMP3 (мРНК-связывающий белок 3 инсулиноподобного фактора роста II), IRF4 (фактора регуляции интерферона 4), KDR (рецептора домена вставки киназы), KIAA0205, KRAB-белка цинкового пальца (KID)-3; KID31, KSA (17-1A), K-ras, LAGE, LCK, LDLR/FUT (белка слияния LDLR-фукозилтрансферазаAS), LeY (Y Lewis), MAD-CT-1, MAGE (тирозины, антигена, связанного с меланомой) (MAGE-1; MAGE-3), опухолевого антигена мелан-А (MART), MART-2/Ski, MC1R (рецептора меланокортина 1), MDM2, мезотелина, MPHOSPH1, MSA (мышечно-специфического актина), mTOR (мишени рапамицина для млекопитающих),

MUC-1, MUC-2, MUM-1 (антигена, связанного с меланомой (мутированного) 1), MUM-2, MUM-3, миозина/m, MYL-RAR, NA88-A, N-ацетилглюкозаминилтрансферазы, нео-PAP, NF-KB (ядерного фактора-каппа В), нейрофиламента, NSE (нейрон-специфической энтолазы), рецепторов Notch, NuMa, N-Ras, NY-BR-1, NY-CO-1, NY-ESO-1, онкостатина М, OS-9, OY-TE51, мутантов p53, минорного bcr-abl p190, pl5(58), pl85erbB2, pl80erbB-3, PAGE (гена, связанного с простатой), PAP (кислой фосфатазы простаты), PAX3, PAX5, PDGFR (рецептора фактора роста тромбоцитов), цитохрома P450, участвующего в утилизации пиперидина и пирролидина (PIPA), белка слияния Pml-RAR альфа, PR-3 (протеиназы 3), PSA (специфического для простаты антигена), PSM, PSMA (антигена стволовых клеток простаты), PRAME (преимущественно экспрессируемого антигена меланомы), PTPRK, RAGE (антигена опухоли почек), Raf (A-Raf, B-Raf и C-Raf), Ras, рецептора тирозинкиназы, RCAS1, RGSS, ROR1 (орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1), RU1, RU2, SAGE, SART-1, SART-3, SCP-1, SDCCAG16, SP-17 (белка спермы 17), src-семейства, SSX (точки останова синовиальной саркомы X)-1, SSX-2 (НОМ-MEL-40), SSX-3, SSX-4, SSX-5, STAT-3, STAT-5, STAT-6, STEAD, STn, сурвивина, syk-ZAP70, TA-90 (Mac-2-связывающего белка\связанного с циклофилином С белка), TAAL6, TACSTD1 (опухолессоциированного трансдуктора кальциевого сигнала 1), TACSTD2, TAG-72-4, TAGE, TARP (белка альтернативной рамки считывания гамма Т-клеточного рецептора), белка слияния TEL/AML1, TEM1, TEM8 (эндосиалина или CD248), TGFβ, TIE2, TLP, гена слияния TMPRSS2 ETS, рецептора TNF (рецептора TNF-α, рецептора TNF-β; или рецептора TNF-γ), рецептора трансферрина, TPS, TRP-1 (родственного тирозину белка 1), TRP-2, TRP-2/INT2, TSP-180, рецептора VEGF, WNT, WT-1 (опухолевого антигена Вильма) и XAGE.

[0485] В качестве неограничивающих примеров, нацеливающий фрагмент настоящего раскрытия может представлять собой антитело scFv, которое распознает опухолеспецифический антиген (TSA), например, scFv антител SS, SS1 и HN1, которые специфически распознают и связываются с мезотелином человека (патент США №: 9359447), scFv антитела против GD2 (патент США № 9315585), антигенсвязывающий домен CD19 (патент США № 9328156); домен связывания лиганда NKG2D (патент США № 927283; патентная публикация США №: US 20160311906 A1); scFv человека против мезотелина, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11 и 12 патента США № 9272002; связывающее средство против CS1 (публикация патента США №: US20160075784); связывающий домен против BCMA (международная патентная публикация №: WO2016/014565); scFv-антитело против CD19 SEQ ID NO: 20 в патенте США №: 9102761; антигенсвязывающие фрагменты GFR альфа 4, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 59 и 79 международной патентной публикации NO: 2016/025880; связывающие домены против CLL-1 (лектин-подобная молекула 1 С-типа), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 47, 44, 48, 49, 50, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 51, 73, 70, 74, 75, 76, 65, 66, 67, 68, 69, 71, 72, 77, 195, 86, 83, 87, 88, 89, 78, 79, 80, 81, 82, 84, 85, 90 и 196, международной патентной публикации №:

WO2016014535); связывающие CD33 домены, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 39-46, международной патентной публикации №: WO2016014576; связывающий домен GPC3 (глипикан-3) (SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4 международной патентной публикации №: WO2016036973); связывающий домен GFR альфа4 (рецептора клеточной поверхности  $\alpha$ -рецептора 4 семейства GDNF, связанного с гликозилфосфатидилинозитолом (GPI)) (международная патентная публикация №: WO2016025880); связывающие домены CD123, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 480, 483, 485, 478, 158, 159, 160, 157, 217, 218, 219, 216, 276, 277, 278 и 275 из международной патентной публикации. №: WO20160258896; антитело против ROR1 или его фрагменты (международная патентная публикация №: WO2016016344); scFv, специфичные для GPC-3 (SEQ ID NO: 1 и 24 из международной патентной публикации №: WO2016049459); scFv для CSPG4 (SEQ ID NO: 2 из международной патентной публикации №: WO2015080981); scFv для фолатного рецептора альфа (патентная публикация США №: US20170002072A1); содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0486] Внутриклеточный домен полипептида слияния CAR после связывания с его молекулой-мишенью передает сигнал эффекторной иммунной клетке, активируя по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций эффекторных иммунных клеток, включая цитолитическую активность (например, секрецию цитокинов) или вспомогательную активность. Следовательно, внутриклеточный домен включает в себя «внутриклеточный сигнальный домен» Т-клеточного рецептора (TCR). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен согласно настоящему раскрытию может содержать сигнальные мотивы, которые известны как мотивы активации на основе тирозина иммунорецептора (ITAM). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная область согласно настоящему раскрытию дополнительно содержит один или несколько костимулирующих сигнальных доменов, которые обеспечивают дополнительные сигналы эффекторным иммунным клеткам. Эти костимулирующие сигнальные домены в сочетании с сигнальным доменом могут дополнительно улучшать рост, активацию, память, персистенность и эффективность уничтожения опухолей сконструированных CAR иммунных клеток (например, CAR Т-клеток). В некоторых случаях костимулирующая сигнальная область содержит 1, 2, 3 или 4 цитоплазматических домена одной или нескольких внутриклеточных сигнальных и/или костимулирующих молекул.

[0487] В одном варианте осуществления настоящего раскрытия CAR согласно настоящему раскрытию представляет собой CAR, специфичный для CD19. В контексте настоящего раскрытия эффекторный модуль CA2 может содержать CA2 DD, функционально связанный с конструкцией слияния CD19 CAR.

[0488] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, биосхемы CA2, компоненты биосхем CA2, эффекторные модули CA2, содержащие их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию, можно использовать для модуляции,

изменения или использования иммунной системы с целью нацеливания одного или нескольких самореактивных иммунных компонентов, таких как аутоантитела и самореактивные иммунные клетки, для ослабления аутоиммунных заболеваний. В некоторых вариантах осуществления SRE согласно настоящему раскрытию можно использовать для регулирования или настройки Т-клеточной терапии на основе химерного рецептора аутоантитела (CAAR), чтобы оптимизировать ее применение при лечении аутоиммунных заболеваний (Ellebrecht CT et al., Science. 2016. Jul 8; 353 (6295): 179-84; содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления биосхемы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 предназначены для модуляции Treg для ослабления аутоиммунных нарушений.

[0489] В некоторых вариантах осуществления биосхемы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 можно использовать в основанных на иммунотерапии методах лечения для облегчения или ослабления болезни трансплантат против хозяина (GVHD). РТПХ относится к состоянию после трансплантации стволовых клеток или костного мозга, при котором иммунные клетки аллогенного донора реагируют на ткань хозяина. В некоторых вариантах осуществления биосхемы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 предназначены для модуляции Treg для лечения GVHD. В одном варианте осуществления биосхемы CA2, содержащие эффекторный модуль CA2, кодирующий TNF-альфа, можно использовать для модуляции Tregs для минимизации GVHD (Pierini, A. et al., Blood. 2016. Aug 11; 128 (6): 866-71; the содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

[0490] В некоторых вариантах осуществления биосхемы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 разработаны так, чтобы быть значительно менее иммуногенными, чем другие биосхемы или переключатели, известные в данной области.

[0491] В рамках настоящего изобретения термин «значительно менее иммуногенный» относится к поддающемуся обнаружению снижению иммуногенности. В другом варианте осуществления термин относится к кратному снижению иммуногенности. В другом варианте осуществления термин относится к такому уменьшению, чтобы эффективное количество биосхем CA2, SRE или эффекторных модулей CA2, которые можно было вводить без запуска поддающегося обнаружению иммунного ответа. В другом варианте осуществления термин относится к такому уменьшению, чтобы биосхемы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 можно было вводить повторно, не вызывая иммунного ответа. В другом варианте осуществления снижение таково, что биосхемы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 можно вводить повторно, не вызывая иммунного ответа.

[0492] В другом варианте осуществления биосхемы CA2, SRE или эффекторные модули CA2 в 2 раза менее иммуногенны, чем их немодифицированный аналог или эталонное соединение. В другом варианте иммуногенность снижается в 3 раза. В другом варианте иммуногенность снижается в 5 раз. В другом варианте иммуногенность снижается в 7 раз. В другом варианте иммуногенность снижается в 10 раз. В другом варианте иммуногенность снижается в 15 раз. В другом варианте иммуногенность снижается в

кратном размере. В другом варианте иммуногенность снижается в 50 раз. В другом варианте иммуногенность снижается в 100 раз. В другом варианте иммуногенность снижается в 200 раз. В другом варианте иммуногенность снижается в 500 раз. В другом варианте иммуногенность снижается в 1000 раз. В другом варианте иммуногенность снижается в 2000 раз. В другом варианте осуществления иммуногенность снижается с иным кратным отличием.

[0493] Способы определения иммуногенности хорошо известны в данной области и включают, например, измерение секреции цитокинов (например, IL12, IFN альфа, TNF-альфа, RANTES, MIP-1альфа или бета, IL6, IFN-бета или IL8), измерение экспрессии маркеров активации DC (например, CD83, HLA-DR, CD80 и CD86) или измерение способности действовать в качестве вспомогательного средства для адаптивного иммунного ответа.

### **Заболевания и токсины**

[0494] Различные инфекционные заболевания можно лечить фармацевтическими композициями, биосхемами CA2, компонентами биосхем CA2, эффекторными модулями CA2, содержащими их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию. В рамках настоящего изобретения термин «инфекционное заболевание» относится к любым нарушениям, вызываемым такими организмами, как бактерии, вирусы, грибки или паразиты.

[0495] Различные токсины можно лечить фармацевтическими композициями, биосхемами CA2, компонентами биосхем CA2, эффекторными модулями CA2, содержащими их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию. Неограниченные примеры токсинов включают рицин, *Bacillus anthracis*, токсин Shiga и токсин типа Shiga, ботулинические токсины.

[0496] Различные тропические заболевания можно лечить фармацевтическими композициями, биосхемами CA2, компонентами биосхем CA2, эффекторными модулями CA2, содержащими их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию. Неограниченные примеры тропических болезней включают лихорадку чикунгунья, лихорадку денге, болезнь Шагаса, бешенство, малярию, вирус Эбола, вирус Марбург, вирус Западного Нила, желтую лихорадку, вирус японского энцефалита, вирус энцефалита Сент-Луиса.

[0497] Различные заболевания пищевого происхождения и гастроэнтерит можно лечить фармацевтическими композициями, биосхемами CA2, компонентами биосхем CA2, эффекторными модулями CA2, содержащими их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию. Неограниченные примеры болезней пищевого происхождения и гастроэнтерита включают ротавирус, вирус Norwalk (Norwirus), *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, *Entamoeba histolytica*, *Helicobacter pylori*, энтеротоксин В золотистого стафилококка, вирус гепатита А (HAV), гепатит *Salmonella Etopes.*, *Clostridium perfringens* и *Salmonella*.

[0498] Различные инфекционные агенты можно лечить фармацевтическими композициями, биосхемами CA2, компонентами биосхем CA2, эффекторными модулями

CA2, содержащими их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию. Неограниченные примеры инфекционных агентов включают аденовирусы, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ascaris lumbricoides*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacteriodes* sp, вирус леса Барма, *Bartonella bacilliformis*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, бета-токсин *Clostridium perfringens*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia miyamotoi*, *Borrelia recurrentis*, *Borrelia* sp., ботулинический токсин, *Brucella* sp., *Burkholderia pseudomallei*, вирус калифорнийского энцефалита, *Campylobacter*, *Candida albicans*, вирус чикунгуньи, бактерии *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Clonorchis sinensis*, *Clostridium difficile*, *Clostridium tetani*, вирус лихорадки колорадского клеща, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium minutissimum*, *Coxiella burnetii*, coxsackie A, coxsackie B, вирус крымско-конго геморрагической лихорадки, цитомегаловирус, вирус денге, вирус восточного лошадиного энцефалита, вирусы Эбола, эховирус, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia* sp., *Entamoeba histolytica*, *Enterobacter* sp., *Enterococcus faecalis*, энтеровирус 71, вирус Эпштейна-Барра (EBV), *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia coli*, флавивирус, *Fusobacterium necrophorum*, *Gardnerella vaginalis*, стрептококк группы В, *Haemophilus aegyptius*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, хантавирус, *Helicobacter pylori*, гепатит А, гепатит В, гепатит С, гепатит D, гепатит Е, вирус простого герпеса 1 и 2, вирус герпеса человека 6, вирус герпеса человека 8, вирус иммунодефицита человека 1 и 2, вирусы Т-клеточного лейкоза человека I и II, вирусы гриппа (А, В, С), вирус Джеймстаун-Каньон, антигенный вирус японского энцефалита, вирус японского энцефалита, Вирус Джона Каннингема, *Juninivirus*, вирус герпеса, ассоциированный с саркомой Капоши (KSHV), *Klebsiella granulomatis*, *Klebsiella* sp., вирус болезни Кьясанурского леса, вирус La Crosse, вирус Ласса, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, вирус лимфоцитарного хориоменингита, лиссавирус, мачуповирус, вирус Марбург, вирус кори, коронавирус MERS (MERS-CoV), *Micrococcus sedentarius*, *Mobiluncus* sp., *Molluscipoxvirus*, *Moraxella catarrhalis*, вирус Morbilli-Rubeola, вирус эпидемического паротита, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma* sp, *Nairovirus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia*, вирус Norwalk, норовирус, вирус омской геморрагической лихорадки, вирус папилломы, вирусы парагриппа 1-3, парапоксвирус, парвовирус B19, *Peptostreptococcus* sp., *Plasmodium* sp., полиовирусы типов I, II и III, *Proteus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Pseudomonas* sp., вирус бешенства, респираторно-синцитиальный вирус, токсин рицина, *Rickettsia australis*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia honei*, *Rickettsia prowazekii*, вирус Росс-Ривер, ротавирус, вирус краснухи, энцефалит Сент-Луиса, *Salmonella Typhi*, *Sarcoptes scabiei*, SARS-ассоциированный коронавирус (SARS-CoV), *Serratia* sp., шига-токсин и шига-подобный токсин, *Shigella* sp., вирус Sin Nombre, вирус малого беляка, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptobacillus moniliformis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Str. eptococcus agalactiae*, *Streptococcus* группы А-Н, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum* subsp. *Pallidum*, *Treponema pallidum*

var. carateum, *Treponema pallidum* var. endemicum, *Tropheryma whippelii*, *Ureaplasma urealyticum*, вирус ветряной оспы, вирус натуральной оспы, холерный вибрион, вирус Западного Нила, вирус желтой лихорадки, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* и вирус Зика.

[0499] Различные редкие заболевания можно лечить фармацевтическими композициями, биосхемами CA2, компонентами биосхем CA2, эффекторными модулями CA2, содержащими их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию. В рамках настоящего изобретения термин «редкое заболевание» относится к любому заболеванию, поражающему небольшой процент населения.

[0500] Различные аутоиммунные заболевания и родственные аутоиммунные заболевания можно лечить с помощью фармацевтических композиций, биосхем CA2, компонентов биосхем CA2, эффекторных модулей CA2, содержащих их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию. В рамках настоящего изобретения термин «аутоиммунное заболевание» относится к заболеванию, при котором организм вырабатывает антитела, которые атакуют его собственные ткани. В качестве неограничивающего примера аутоиммунное заболевание может представлять собой острый диссеминированный энцефаломиелит (ADEM), острый некротизирующий геморрагический лейкоэнцефалит, болезнь Аддисона, агаммаглобулинемию, очаговую алопецию, амилоидоз, анкилозирующий спондилит, нефрит, обусловленный антителами против ТВ/против GBM, антифосфолипидный синдром (APS), аутоиммунный ангионевротический отек, аутоиммунная апластическая анемия, аутоиммунная дизавтономия, аутоиммунный гепатит, аутоиммунная гиперлипидемия, аутоиммунный иммунодефицит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный миокардит, аутоиммунный оофорит, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунную ретинопатию, аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ATP), аутоиммунное заболевание щитовидной железы, аутоиммунную крапивницу, аксональные и нейрональные невропатии, болезнь Бало, болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, кардиомиопатию, болезнь Кастлемана, целиакию, болезнь Шагаса, синдром хронической усталости, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (CIDP), хронический рецидивирующий мультифокальный стомиелит (CRMO), синдром Чарга-Стросса, рубцовый пемфигоид/доброкачественный пемфигоид слизистых оболочек, болезнь Крона, синдром Когана, болезнь холодовых агглютининов, врожденную блокаду сердца, миокардит Коксаки, болезнь CREST, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, демиелинизирующую невропатию, герпетиформный дерматит, дерматомиозит, болезнь Девика (оптиконеуромиелит), дискоидную волчанку, синдром Дресслера, эндометриоз, эозинофильный эзофагит, эозинофильный фасциит, узловатую эритему, экспериментальный аллергический энцефаломиелит, синдром Эванса, фибромиалгию, фиброзирующий альвеолит, гигантоклеточный артериит (височный артериит), гигантоклеточный миокардит, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, гранулематоз с полиангиитом (GPA) (ранее называвшийся гранулематозом Вегенера),

болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, энцефалит Хашимото, тиреоидит Хашимото, гемолитическую анемию, пурпуру Шенлейна-Геноха, герпес беременных, гипогаммаглобулинемию, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), IgA-нефропатию, склерозирующее заболевание, связанное с IgG4, иммунорегуляторные липопротеины, миозит с тельцами включения, интерстициальный цистит, ювенильный артрит, ювенильный диабет (диабет 1 типа), ювенильный миозит, синдром Кавасаки, синдром Ламберта-Итона, лейкоцитокластический васкулит, красный плоский лишай, склероз лихена, деревянистый конъюнктивит, линейную болезнь IgA (LAD), волчанку (SLE), болезнь Лайма, хроническую болезнь Меньера, микроскопический полиангиит, смешанное заболевание соединительной ткани (MCTD), язву Мурена, болезнь Муха-Габермана, рассеянный склероз, миастению, миозит, нарколепсию, оптиконейромиелит (болезнь Девика), нейтропению, глазной рубцовый пемфигид, неврит зрительного нерва, палиндромный ревматизм, PANDAS (детские аутоиммунные нервно-психические расстройства, связанные со стрептококком), паранеопластическую дегенерацию мозжечка, пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH), синдром Парри-Ромберга, синдром Парсоннажа-Тернера, планит Paps (периферический увеит), пузырьчатку, периферическую невропатию, перивенозный энцефаломиелит, пернициозную анемию, синдром ROEMS, узелковый полиартериит, аутоиммунные полигландулярные синдромы I, II и III типа, ревматическую полимиалгию, полимиозит, постинфарктный синдром, постперикардотомный синдром, прогестероновый дерматит, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит, псориаз, псориатический артрит, идиопатический легочный фиброз, гангренозную пиодермию, чистую эритроцитарную аплазию, феномен Рейно, реактивный артрит, рефлекторную симпатическую дистрофию, синдром Рейтера, рецидивирующий полихондрит, синдром беспокойных ног, брюшинный фиброз, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, саркоидоз, синдром Шмидта, склерит, склеродермию, синдром Шегрена, аутоиммунитет сперматозоидов и яичек, синдром тугоподвижного человека, подострый бактериальный эндокардит (SBE), синдром Сусака, симпатическую офтальмию, артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП), синдром Толоса-Ханта, поперечный миелит, язвенный колит, недифференцированное заболевание соединительной ткани (UCTD), увеит, васкулит, везикулобуллезный дерматоз, витилиго и гранулематоз Вегенера (теперь называемый гранулематозом с полиангиитом (GPA)).

[0501] Различные заболевания почек можно лечить фармацевтическими композициями, биосхемами CA2, компонентами биосхемы CA2, эффекторными модулями CA2, содержащими их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию.

[0502] Различные сердечно-сосудистые заболевания можно лечить фармацевтическими композициями, биосхемами CA2, компонентами биосхемы CA2, эффекторными модулями CA2, содержащими их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию. В качестве неограничивающего примера сердечно-сосудистым заболеванием

может быть ишемическая болезнь сердца, также известная как ишемическая болезнь сердца, цереброваскулярное заболевание (инсульт), заболевание периферических сосудов, сердечная недостаточность, ревматическая болезнь сердца и врожденная болезнь сердца.

[0503] Различные дефициты антител можно лечить фармацевтическими композициями, биосхемами CA2, компонентами биосхемы CA2, эффекторными модулями CA2, содержащими их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию. В качестве неограничивающего примера дефицитом антител может быть X-связанная агаммаглобулинемия (XLA), аутосомно-рецессивная агаммаглобулинемия (ARA), общий переменный иммунный дефицит (CVID), дефицит подкласса IgG (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), селективный дефицит IgA, специфический дефицит антител (SAD), транзиторная гипогаммаглобулинемия новорожденных, дефицит антител с нормальным или повышенным иммуноглобулином, селективный дефицит IgM, иммунодефицит с тимомой (синдром Гуда), дефицит транскобаламина II, бородавки, гипогаммаглобулинемия, инфекция, синдром миелокатексиса (WHIM), дефицит антител, вызванный лекарственными препаратами, дефицит каппа-цепи, дефицит тяжелых цепей, постмейотическая сегрегация (PMS2) и неутонченная гипогаммаглобулинемия.

[0504] Различные глазные заболевания можно лечить фармацевтическими композициями, биосхемами CA2, компонентами биосхемы CA2, эффекторными модулями CA2, содержащими их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию. В качестве неограничивающего примера, глазное заболевание может представлять собой заболевание щитовидной железы (TED), болезнь Грейвса (GD) и орбитопатию, дегенерацию сетчатки, катаракту, атрофию зрительного нерва, дегенерацию желтого пятна, врожденный амавроз Лебера, дегенерацию сетчатки, палочко-колбочковую дистрофию, синдром Ушера, синдром леопарда, светобоязнь и фотоаверсию.

[0505] Различные неврологические заболевания можно лечить фармацевтическими композициями, биосхемами CA2, компонентами биосхем CA2, эффекторными модулями CA2, содержащими их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию.

[0506] Различные психологические расстройства можно лечить с помощью фармацевтических композиций, биосхем CA2, компонентов биосхем CA2, эффекторных модулей CA2, содержащих их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию.

[0507] Различные заболевания легких можно лечить фармацевтическими композициями, биосхемами CA2, компонентами биосхем CA2, эффекторными модулями CA2, содержащими их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию. В качестве неограничивающего примера заболеваниями легких могут быть асбестоз, астма, бронхоэктазы, бронхит, хронический кашель, хроническая обструктивная болезнь легких (COPD), круп, муковисцидоз, хантавирус, идиопатический легочный фиброз, коклюш, плеврит, пневмония, легочная гипертензия, саркоидоз, апноэ во сне, спирометрия, синдром внезапной детской смерти (SIDS), туберкулез, синдром Алажиля, аутоиммунный гепатит, атрезия желчных протоков, цирроз, ERCP (эндоскопическая ретроградная холангиопанкреатография), гемохроматоз, безалкогольный стеатогепатит, порфирия,

первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит.

[0508] Различные заболевания костей можно лечить фармацевтическими композициями, биосхемами CA2, компонентами биосхемы CA2, эффекторными модулями CA2, содержащими их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию. В качестве неограничивающего примера заболеваниями костей могут быть остеопороз, нейрофиброматоз, несовершенный остеогенез (OI), рахит, остеосаркома, ахондроплазия, переломы, остеомиелит, опухоль костей Юинга, остеомаляция, дисплазия бедра, болезнь костей Педжета, мраморная болезнь, остеохондрома, рак костей, заболевание костей, остеохондроз, остеома, фиброзная дисплазия, клидокраниальный дизостоз, остеокластома, костная киста, метаболическая болезнь костей, мелореостоз, мозоль, синдром Каффи и нижнечелюстной дисостоз.

[0509] Различные заболевания крови можно лечить фармацевтическими композициями, биосхемами CA2, компонентами биосхем CA2, эффекторными модулями CA2, содержащими их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию. В качестве неограничивающего примера заболеваниями крови могут быть анемия и СКД (для специалистов здравоохранения), апластическая анемия и миелодиспластические синдромы, тромбоз глубоких вен, гемохроматоз, гемофилия, пурпура Шенлейна-Геноха, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, железодефицитная пурпура, пернициозная анемия, легочная эмболия, серповидноклеточная анемия, серповидноклеточная аномалия и другие гемоглобинопатии, талассемия, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура и болезнь фон Виллебранда.

### **Центральная нервная система (ЦНС)**

[0510] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, биосхемы CA2, компоненты биосхем CA2, эффекторные модули CA2, содержащие их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию, можно использовать для модуляции, изменения или использования белков в центральной нервной системе, включая спинномозговые (CSF) белки.

[0511] В некоторых примерах, фармацевтические композиции, биосхемы CA2, компоненты биосхем CA2, эффекторные модули CA2, содержащие их SRE или грузы согласно настоящему раскрытию, можно использовать для обеспечения регулируемых продуктов ERT (заместительной ферментной терапии) в центральную нервную систему. Многие лизосомные болезни накопления (LSD) включают симптомы ЦНС, такие как умственная отсталость, судороги, глубокая нейродегенерация, поведенческие аномалии и психомоторные дефекты. ERT для LSD - одна из истинных историй успеха современной молекулярной медицины. Успешное применение ERT зависит от контролируемых лизосомальных белков (например, ферментов) и их доставки в клетки ЦНС.

### **Метаболические пептиды и гормоны**

[0512] В некоторых вариантах осуществления биосхемы CA2 настоящего раскрытия и/или любые их компоненты можно использовать для регулирования пептидов, природных или синтетических. Природные пептиды могут включать, но без ограничения, пептидные

гормоны, натрийуретические пептиды, пищевые пептиды, а также производные и предшественники.

[0513] Биосхемы СА2 согласно настоящему раскрытию и/или любые их компоненты также можно использовать для пульсирующего высвобождения гормонов или других пептидных лекарственных средств.

### **Стратификация пациентов**

[0514] В одном варианте осуществления пациентов также можно стратифицировать в соответствии с иммуногенными пептидами, представленными их иммунными клетками, и можно использовать в качестве параметра для определения подходящих групп пациентов, которые могут иметь терапевтический эффект от композиций согласно настоящему раскрытию.

### Трансгенные организмы

[0515] В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие относится к трансгенным организмам, которые экспрессируют нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды согласно настоящему раскрытию. В рамках настоящего изобретения термин «трансгенный организм» относится к любому объекту, не являющемуся человеком, который содержит искусственно перенесенный экзогенный генетический материал. Этот подход обеспечивает возможность временно регулировать грузы в определенных клетках, тканях или во всем организме. Такие методы могут быть полезны при создании трансгенных моделей для определенных болезненных состояний или для изучения эмбрионального развития.

[0516] Трансгенные организмы, описанные в данном документе, могут включать грызунов, рыб, рептилий, а также беспозвоночных. В предпочтительном варианте осуществления такие трансгенные организмы могут быть выбраны из семейства грызунов, включая мышь и крысу.

### Настраиваемая регуляция

[0517] Биосхемы СА2 согласно настоящему раскрытию и/или любые их компоненты также можно использовать для регуляции экспрессии другого эффекторного модуля СА2, такого как рекомбинантная конструкция, содержащая POI. В некоторых вариантах осуществления биосхемы СА2 и/или эффекторные модули СА2 могут содержать протеазу (также называемую пептидазой или протеиназой). Настраиваемая протеаза может расщеплять неактивную конструкцию до активной конструкции, когда два компонента совместно вводят в клетку, ткань или организм.

[0518] В других примерах биосхемы СА2 и/или эффекторные модули СА2, содержащие протеазу, также можно использовать для регулирования процессинга белка, включая расщепление исходного белкового продукта с образованием меньшего по размеру активного белка или пептида.

[0519] В некоторых вариантах осуществления биосхемы СА2 согласно настоящему раскрытию и/или любые их компоненты могут содержать любой из факторов, которые играют роль в процессинге и модификации белка. Посттрансляционная модификация белка

может включать, но без ограничения, добавление гидрофобных групп с помощью фермента (например, миристоилирование, пальмитоилирование, изопренилирование, пренилирование, фарнезилирование, геранилгеранилирование, глипирирование и прикрепление гликозилфосфатидинозитола (GPI)); присоединение кофакторов для усиления функции (например, липоилирование, флавин, фосфопантетеинилирование и гем С); добавление небольших химических групп (например, ацилирование, формилирование, алкилирование, фосфорилирование, метилирование, аргинилирование, полиглутамилирование, полиглицилирование, бутирилирование, гликозилирование, пропионилирование, S-глутатионилирование, S-нитрозилирование, S-сульфенилирование, сукцинилирование, сульфатирование и ацетилирование); связывание других белков и/или пептидов, например, ISG-илирование, сумоилирование, убиквитинирование, неддилирование и пупилирование; химическая модификация аминокислот; и структурные изменения.

### Биофабрики

[0520] Биосхемы СА2 согласно настоящему раскрытию и/или любые их компоненты можно использовать для регулирования уровней продукции белка на биофабрике. В рамках настоящего изобретения термин «биофабрика» относится к генетически модифицированным или не генетически модифицированным клеткам, тканям, органам или организмам, которые могут продуцировать белки для множества вариантов применения, включая терапевтические цели (ингибиторы, ферменты, антитела, антигены и так далее) или первичные или вторичные продукты, представляющие промышленный интерес. В некоторых примерах клетка может быть прокариотической клеткой, эукариотической клеткой, клеткой млекопитающего, растительной клеткой и так далее.

[0521] В некоторых вариантах осуществления биосхемы СА2 согласно настоящему раскрытию можно использовать для регулирования белков лекарственных препаратов, продуцируемых в ткани-мишени, например, в печени и почках. Печень - это орган, который производит секретируемые белки, в том числе основные белки плазмы, факторы гемостаза и фибринолиза, белки-носители, гормоны, прогормоны и аполипопротеины, или различные короткоживущие метаболические пептиды и ферменты, которые обычно жестко регулируются, или другие нерегулируемые печеночные белки. В этом контексте печень выполняет роль фабрики экспрессии генов (биофабрики), поставляя белок для лечения заболевания, например, метаболического заболевания.

[0522] В других вариантах осуществления биосхемы СА2 настоящего раскрытия можно использовать для регулирования белков в промышленных процессах.

### Нацеливание на печень

[0523] Печень является важным органом, который вырабатывает белки и обеспечивает свертывание крови и ряд метаболических функций. Различные заболевания могут поражать печень, и нацеливание на печень для лечения заболевания было многообещающим подходом, особенно таргетная генная терапия печени. Биосхемы СА2 согласно настоящему раскрытию и/или любые их компоненты можно использовать для

регулирования таргетной генной терапии печени и переноса генов.

[0524] Белки, которые могут быть нацелены на печень и встроены в настоящие биосхемы CA2 для регуляции, могут включать белки при раке печени, таком как гепатоцеллюлярная карцинома (HCC), фиброламеллярная HCC, холангиокарцинома, ангиосаркома и вторичный рак печени; наследственные нарушения, вызванные дефектными генами, такие как гемохроматоз, болезнь Вильсона, тирозинемия, дефицит альфа-1-антитрипсина, болезнь накопления гликогена; метаболические нарушения из-за дефицита ферментов, такие как синдром Жильбера, дефицит лизосомальной кислой липазы (LALD) и болезнь Гоше; аутоиммунный гепатит; жировые заболевания печени; и вирусный гепатит (A, B и C). В некоторых примерах настоящие биосхемы CA2 можно использовать для направления IL12 при гепатоцеллюлярной карциноме (HCC) и IL10 при диабетической невропатии.

#### Микрофлюидика

[0525] В некоторых вариантах осуществления клетки, содержащие биосхемы CA2 согласно настоящему раскрытию и/или любые их компоненты, могут быть использованы в микрофлюидных устройствах. В рамках настоящего изобретения термин «микрофлюидное устройство» относится к преобразованию пиколитра в объемы текучих сред нанолитрового масштаба в искусственно созданных микросистемах. Микрофлюидные устройства, содержащие биосхемы CA2 согласно настоящему раскрытию, можно использовать для изучения моделей клеточных культур, клеточной микросреды, секреции клеток, хемотаксиса, апоптоза, функции сосудов, роста нейронных клеток, эмбрионального развития, метаболомики отдельных клеток, экспрессии генов, исследования лекарственных средств, разделения клеток, биологии стволовых клеток, биореакторов, трехмерных культур клеток и тканевой инженерии.

#### Инструменты и средства для получения терапевтических средств

[0526] В настоящем раскрытии представлены инструменты и средства, которые можно использовать для создания терапевтических средств, таких как, но без ограничения, иммунотерапевтические средства для уменьшения объема опухоли или нагрузки у нуждающегося в этом субъекта. В производстве терапевтического средства участвует значительное количество переменных, таких как структура груза, тип клеток, метод переноса генов, метод и время размножения *ex vivo*, предварительное кондиционирование, а также величина и тип опухолевой нагрузки у субъекта. Такие параметры можно оптимизировать с помощью описанных в данном документе инструментов и средств.

#### **Клеточные линии**

[0527] В настоящем раскрытии представлена клетка млекопитающего, которая была генетически модифицирована композициями согласно настоящему раскрытию. Подходящие клетки млекопитающих включают первичные клетки и иммортализованные клеточные линии. Подходящие линии клеток млекопитающих включают, но без ограничения, линию 293 клеток эмбриональной почки человека, линию NIH 3T3 клеток фибробластов, линию HCT116 клеток колоректальной карциномы человека, линию SKOV-

3 клеток карциномы яичника, иммортализованные линии Т-клеток (например, клетки Jurkat и клетки SupT1), линию клеток лимфомы Raji, клетки NALM-6, клетки K562, клетки HeLa, клетки PC12, клетки HL-60, линии клеток NK (например, NKL, NK92, NK962 и YTS) и тому подобное. В некоторых случаях клетка не является иммортализованной клеточной линией, а вместо этого является клеткой, полученной у индивидуума и именуемой в данном документе первичной клеткой. Например, клетка представляет собой Т-лимфоцит, полученный у человека. Другие примеры включают, но без ограничения, цитотоксические клетки, стволовые клетки, моноклеарные клетки периферической крови или клетки-предшественники, полученные у индивидуума.

#### **Отслеживание SRE, биосхем и клеточных линий**

[0528] В некоторых вариантах осуществления может быть желательно отслеживать композиции согласно настоящему раскрытию или клетки, модифицированные композициями, описанными в данном документе. Отслеживание может быть достигнуто с использованием груза, такого как репортерные фрагменты, которые в рамках настоящего изобретения относятся к любому белку, способному создавать поддающийся обнаружению сигнал в ответ на ввод. Примеры включают щелочную фосфатазу,  $\beta$ -галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу,  $\beta$ -глюкуронидазу, пероксидазу,  $\beta$ -лактамазу, каталитические антитела, биолюминесцентные белки, например, люциферазу и флуоресцентные белки, такие как зеленый флуоресцентный белок (GFP).

[0529] Репортерные фрагменты можно использовать для мониторинга реакции SRE на добавление лиганда, соответствующего SRE. В других случаях репортерные фрагменты можно использовать для отслеживания выживаемости, устойчивости, роста и/или локализации клеток *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

[0530] В некоторых вариантах осуществления предпочтительным репортерным фрагментом могут быть белки люциферазы.

#### **Шапероны**

[0531] В некоторых вариантах осуществления эффекторные модули CA2 согласно настоящему раскрытию могут включать в себя один или несколько шаперонов для регулирования экспрессии груза. Шапероны, используемые в настоящем описании, могут быть клеточными шаперонами или малыми молекулами, называемыми фармакологическими шаперонами. Клеточные шапероны относятся к большой группе неродственных семейств белков, роль которых заключается в стабилизации развернутых клиентских белков или в разворачивании клиентских белков для транслокации через мембраны или для деградации, и/или для помощи в их правильном складывании и сборке. Шапероны также взаимодействуют с другими компонентами сети протеостаза, такими как протеасомная система и аутофагия, чтобы способствовать клиренсу белка. Примеры семейств молекулярных шаперонов включают небольшие белки теплового шока, такие как hsp25; белки семейства 60 белков теплового шока, такие как cpn60 и GroEL; белки семейства 70 белков теплового шока, такие как DnaK и BiP; белки семейства 90 белков теплового шока; белки семейства 100 белков теплового шока, такие как Cpr; лектиновые

шапероны, такие как кальнексин и кальретикулин; и сворачивающиеся шапероны, такие как протеин-дисульфидные изомеразы (PDI), пептидилпролил-ци-транс-изомераза (PPI) и ERp57. В некоторых вариантах осуществления груз согласно настоящему раскрытию может быть клеточным шапероном. В отсутствие стимула, который стабилизирует SRE, клеточный шаперон может связываться с SRE и, следовательно, недоступен для взаимодействия со своими клиентскими белками. В присутствии стимула, специфичного для SRE, SRE стабилизируется, и шаперон доступен для взаимодействия с клиентскими белками. В некоторых вариантах осуществления грузы согласно настоящему раскрытию могут быть добавлены к шаперонам таким образом, чтобы можно было повысить стабильность или нестабильность груза. В других вариантах осуществления SRE согласно настоящему раскрытию могут состоять из одного или нескольких молекулярных шаперонов.

[0532] Шапероны, применимые в настоящем описании, также могут включать фармакологические шапероны, в которых использованы малые молекулы для облегчения правильной укладки и стабилизации клеточных белков. Мутации в клеточных белках могут приводить к неправильной укладке и/или агрегации белков, что в конечном итоге приводит к их деградации. Фармакологические шапероны были разработаны для связывания с неправильно свернутыми белками-мишенями, облегчая их правильную укладку и тем самым предотвращая их разрушение. В некоторых вариантах осуществления SRE согласно настоящему раскрытию могут содержать один или несколько неправильно свернутых белков, а стимул, специфичный для SRE, может содержать один или несколько фармакологических шаперонов, так что эффекторный модуль CA2 стабилизируется только в присутствии фармакологического шаперона.

### **Животные Модели**

[0533] Пригодность и эффективность композиций согласно настоящему раскрытию можно тестировать на животных моделях *in vivo*, предпочтительно на мышинных моделях. Используемые мышинные модели могут быть сингенными мышинными моделями, в которых мышинные клетки модифицированы композициями согласно настоящему раскрытию и протестированы на мышах с таким же генетическим фоном. Примеры включают мышинные модели pMEL-1 и 4T1. Альтернативно, в таких исследованиях можно также использовать ксенотрансплантатные модели, в которых человеческие клетки, такие как опухолевые клетки и иммунные клетки, вводят иммунодефицитным мышам. Используемыми иммунодефицитными мышами могут быть мыши CByJ.Cg-Foxn1nu/J, B6;129S7-Rag1tm1Mom/J, B6.129S7-Rag1tm1Mom/J, B6. CB17-Prkdcscid/SzJ, NOD.129S7(B6)-Rag1tm1Mom/J, NOD.Cg-Rag1tm1MomPrf1tm1Sdz/Sz, NOD.CB17-Prkdcscid/SzJ, NOD.Cg-PrkdcscidB2mtm1Unc/J, NOD-scid IL2Rgnull, Nude (nu), мыши SCID, мыши NOD, мыши RAG1/RAG2, мыши NOD-Scid, мыши IL2rgnull, мыши b2mnull, мыши NOD-scid IL2rgnull, мыши NOD-scid-B2mnull, мыши бежевого цвета и трансгенные мыши HLA.

### **Клеточные анализы**

[0534] В некоторых вариантах осуществления эффективность композиций согласно

раскрытию в качестве иммунотерапевтических средств может быть оценена с использованием клеточных анализов. Уровни экспрессии и/или идентичности описанных в данном документе композиций могут быть определены любыми способами, известными в данной области для идентификации белков и/или количественного определения уровней белков. В некоторых вариантах осуществления такие методы могут включать вестерн-блоттинг, проточную цитометрию и иммуноанализы.

[0535] В настоящем документе представлены способы функциональной характеристики клеток, экспрессирующих SRE, биосхем CA2, и композиций согласно настоящему раскрытию. В некоторых вариантах осуществления функциональная характеристика проводится в первичных иммунных клетках или иммортализованных линиях иммунных клеток и может быть определена по экспрессии маркеров клеточной поверхности. Примеры маркеров клеточной поверхности для Т-клеток включают, но без ограничения, CD3, CD4, CD8, CD14, CD20, CD11b, CD16, CD45 и HLA-DR, CD69, CD28, CD44, IFN $\gamma$ . Маркеры истощения Т-лимфоцитов включают PD1, TIM3, BTLA, CD160, 2B4, CD39 и LAG3. Примеры маркеров клеточной поверхности для антигенпрезентирующих клеток включают, но без ограничения, МНС класса I, МНС класса II, CD40, CD45, В7-1, В7-2, рецептор IFN $\gamma$  и рецептор IL2, ICAM-1 и/или рецептор Fc $\gamma$ . Примеры маркеров клеточной поверхности для дендритных клеток включают, но без ограничения, МНС класса I, МНС класса II, В7-2, CD18, CD29, CD31, CD43, CD44, CD45, CD54, CD58, CD83, CD86, CMRF- 44, CMRF-56, DCIR и/или дектин-1 и тому подобное; в то время как в некоторых случаях также отсутствуют CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD56 и/или CD57. Примеры маркеров клеточной поверхности для NK-клеток включают, но без ограничения, CCL3, CCL4, CCL5, CCR4, CXCR4, CXCR3, NKG2D, CD71, CD69, CCR5, фосфо JAK/STAT, фосфо ERK, фосфо p38/MAPK, фосфо АКТ, фосфо STAT3, гранулизин, гранзим В, гранзим К, IL10, IL22, IFN $\gamma$ , LAP, перфорин и TNF $\alpha$ .

#### Истощение Т-клеток

[0536] В некоторых вариантах осуществления биосхемы CA2, SRE или эффекторный модуль CA2 можно использовать для предотвращения истощения Т-клеток. В рамках настоящего изобретения термин «истощение Т-клеток» относится к постепенной и прогрессирующей потере функции Т-клеток, вызванной хронической активацией Т-клеток. Истощение Т-клеток является основным фактором, ограничивающим эффективность противовирусной и противоопухолевой иммунотерапии. Истощенные Т-клетки обладают низкой способностью к пролиферации и выработке цитокинов, одновременно с высокой скоростью апоптоза и высокой поверхностной экспрессией множественных ингибирующих рецепторов. Активация Т-клеток, приводящая к истощению, может происходить как в присутствии, так и в отсутствие антигена.

#### Клетки

[0537] В соответствии с настоящим раскрытием, предоставлены клетки, генетически модифицированные для экспрессии по меньшей мере одной биосхемы CA2, SRE (например, CA2 DD), эффекторного модуля CA2 и иммунотерапевтического средства

согласно настоящему раскрытию. Клетки согласно настоящему раскрытию могут включать, без ограничения, иммунные клетки, стволовые клетки и опухолевые клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой эффекторно-иммунные клетки, включая, но без ограничения, Т-клетки, такие как CD8<sup>+</sup> Т-клетки и CD4<sup>+</sup> Т-клетки (например, Th1, Th2, Th17, Foxp3<sup>+</sup> клетки), Т-клетки памяти, такие как стволовые Т-клетки памяти, центральные Т-клетки памяти и эффекторно-Т-клетки памяти, терминально дифференцированные эффекторно-Т-клетки, натуральные клетки-киллеры (NK), NK-Т-клетки, инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), регуляторные Т-клетки (Treg) и дендритные клетки (DC), другие иммунные клетки, которые могут вызывать эффекторную функцию, или их смесь. Т-клетки могут быть Т $\alpha\beta$ -клетками и Т $\gamma\delta$ -клетками. В некоторых вариантах осуществления стволовые клетки могут происходить из эмбриональных стволовых клеток человека, мезенхимальных стволовых клеток и нервных стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут быть истощенными эндогенными Т-клеточными рецепторами (см. патенты США № 9273283; 9181527; и 9028812; содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

[0538] В некоторых вариантах осуществления клетки согласно настоящему раскрытию могут быть аутологичными, аллогенными, сингенными или ксеногенными по отношению к конкретному индивидуальному субъекту.

[0539] В некоторых вариантах осуществления клетки согласно настоящему раскрытию могут быть клетками млекопитающих, в частности клетками человека. Описанные в данном документе клетки могут быть первичными клетками или иммортализованными клеточными линиями.

[0540] В некоторых вариантах осуществления клетки согласно настоящему раскрытию могут включать в себя факторы размножения в качестве груза для запуска пролиферации и размножения клеток. Иллюстративные грузы включают членов суперсемейства RAS.

[0541] Сконструированные иммунные клетки могут быть получены путем трансдукции клеточной композиции полипептидом биосхемы CA2, эффекторным модулем CA2, SRE и/или представляющей интерес грузом (например, иммунотерапевтическим средством) или полинуклеотидом, кодирующим указанный полипептид, или вектор, содержащий указанный полинуклеотид. Вектор может быть вирусным вектором, таким как лентивирусный вектор, гамма-ретровирусный вектор, рекомбинантный AAV, аденовирусный вектор и онколитический вирусный вектор. В других аспектах также можно использовать невирусные векторы, например, наночастицы и липосомы. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки согласно настоящему раскрытию генетически модифицированы для экспрессии по меньшей мере одного описанного в данном документе иммунотерапевтического средства, которое настраивается с помощью стимула. В некоторых примерах в клетку вводят два, три или более иммунотерапевтических средства, сконструированных в одной и той же биосхеме CA2 и эффекторном модуле CA2. В других

примерах в клетку можно вводить две, три или более биосхем, эффекторных модулей, каждый из которых содержит иммунотерапевтическое средство.

[0542] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки согласно настоящему раскрытию могут быть Т-клетками, модифицированными для экспрессии антигенспецифического Т-клеточного рецептора (TCR) или антигенспецифического химерного антигенного рецептора (CAR), описанного в настоящем документе (известными как CAR Т-клетки). Соответственно, в Т-клетку вводят по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий систему CAR (или TCR), описанную в данном документе, или вектор, содержащий полинуклеотид. Т-клетка, экспрессирующая CAR или TCR, связывается со специфическим антигеном через внеклеточный нацеливающий фрагмент CAR или TCR, таким образом, сигнал через внутриклеточный сигнальный домен (домены) передается в Т-клетку, и в результате Т-клетка активируется. Активированная CAR Т-клетка изменяет свое поведение, включая высвобождение цитотоксического цитокина (например, фактора некроза опухоли, лимфотоксина и так далее), улучшение скорости пролиферации клеток, изменение молекулы на поверхности клетки и тому подобное. Такие изменения вызывают разрушение клетки-мишени, экспрессирующей антиген, распознаваемый CAR или TCR. Кроме того, высвобождение цитокина или изменение молекулы клеточной поверхности стимулирует другие иммунные клетки, например, В-клетку, дендритную клетку, НК-клетку и макрофаг.

[0543] В некоторых вариантах осуществления CAR Т-клетки согласно настоящему раскрытию могут быть дополнительно модифицированы для экспрессии еще одного, двух, трех или более иммунотерапевтических средств. Иммунотерапевтические средства могут представлять собой другой CAR или TCR, специфичный для другой молекулы-мишени; цитокин, такой как IL2, IL12, IL15 и IL18, или рецептор цитокина, такой как IL15Ra; химерный рецептор-переключатель, который преобразует ингибирующий сигнал в стимулирующий сигнал; хоминговый рецептор, который направляет адоптивно перенесенные клетки на участок-мишень, такой как опухолевая ткань; средство, оптимизирующее метаболизм иммунной клетки; или предохранительный ген-переключатель (например, суицидный ген), который убивает активированные Т-клетки, когда наблюдается тяжелое событие после адоптивного переноса клеток или когда перенесенные иммунные клетки больше не нужны. Эти молекулы могут быть включены в один и тот же эффекторный модуль или в отдельные эффекторные модули.

[0544] В родственных вариантах осуществления вышеизложенного, сконструированная клетка, например, иммунная клетка, как описано в данном документе, может быть подвергнута генетическим манипуляциям для экспрессии одного или нескольких иммунотерапевтических средств, при этом одно или несколько иммунотерапевтических средств регулируют с использованием описанных в данном документе эффекторных модулей. В иллюстративном варианте осуществления сконструированная клетка содержит: i) первый полинуклеотид, который кодирует первый полипептид, указанный первый полипептид содержит: а. первый элемент ответа на стимул

(SRE), где первый SRE содержит домен, чувствительный к лекарству (DRD), указанный DRD содержит человеческую карбоангидразу 2 (CA2; SEQ ID NO. 5810) или ее область, а также содержит одну или несколько мутаций относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO. 5810; и b. первый груз, который функционально связан с первым SRE, где (I) первый груз содержит CD40L (SEQ ID NO. 6) или его часть; или (II) первый груз содержит CD40L (SEQ ID NO. 6) или его часть, содержащую одну или несколько мутаций относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO. 6; и ii) второй полинуклеотид, который кодирует один или несколько дополнительных полипептидов, при этом один или несколько дополнительных полипептидов содержат иммунотерапевтическое средство, выбранное из группы, состоящей из T-клеточного рецептора (TCR) и его вариантов или химерного антигенного рецептора (CAR); где по меньшей мере одна мутация из одной или нескольких мутаций в DRD первого SRE дестабилизирует DRD и первый груз в отсутствие первого стимула, и где DRD и первый груз стабилизируются в присутствии первого стимула, и второй полипептид экспрессируется независимо от первого груза.

[0545] В различных вариантах осуществления груз сконструированных клеток может содержать: i) CD40L (SEQ ID NO. 6) или его часть, содержащую по меньшей мере одну мутацию; или ii) CD40L (SEQ ID NO. 6) или его часть, содержащую по меньшей мере две мутации, при этом необязательно, по меньшей мере две мутации выбраны из: (i) H224G и G226F; (ii) H224G и G226H; (iii) Y172G и G226F; (iv) H125 и G227; (v) Y120G, H224G и G226W; и vi) S110G, F111G, E112S, M113G, Q114G и K115S. Иллюстративные сконструированные клетки, как указано выше, имеют второе иммунотерапевтическое средство, наряду с регулируемым первым иммуно-терапевтическим средством, например, CD40L, один или несколько дополнительных полипептидов, содержащих второе иммунотерапевтическое средство, могут быть связаны со вторым SRE, содержащим второй DRD, и в некоторых примерах второй DRD такой же или отличается от DRD в первом SRE, связанном с первым грузом, и второй DRD и второй полипептид оба дестабилизируются в отсутствие первого или второго стимула, и при этом второй DRD и второй полипептид стабилизируются в присутствии первого или второго стимула. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит первый груз, например, CD40L, функционально связанный с первым DRD, и второе иммунотерапевтическое средство, например, CAR или TCR, введенное в сконструированную клетку так, что второе иммунотерапевтическое средство, например, CAR или TCR экспрессируются независимо от первого груза, и полинуклеотид, кодирующий второе иммунотерапевтическое средство, может быть стабильно интегрирован в геном сконструированной клетки так, что второе иммунотерапевтическое средство конститутивно экспрессируется или экспрессируется индуцибельным образом с использованием индуцибельного промотора в сконструированной клетке. В различных вариантах осуществления сконструированная клетка выбрана из CD8<sup>+</sup> T-клетки, CD4<sup>+</sup> T-клетки, вспомогательной T-клетки, натуральных клеток-киллеров (NK), NKT-клеток, цитотоксических T-лимфоцитов (CTL),

инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), Т-клетки памяти, регуляторной Т-клетки (Treg), индуцированной цитокином клетки-киллере (CIK), дендритной клетки, активированной лимфокином клетки-киллере (LAK), эмбриональной стволовой клетки человека, мезенхимальной стволовой клетки, гемопоэтической стволовой клетки или их смеси.

[0546] В одном варианте осуществления CAR Т-клетка (включая TCR Т-клетку) согласно настоящему раскрытию может быть «вооруженной» CAR Т-клеткой, которая трансформирована эффекторным модулем CA2, содержащим CAR, и эффекторным модулем CA2, содержащим цитокин. Индуцируемые или конститутивно секретируемые активные цитокины дополнительно защищают CAR Т-клетки для повышения эффективности и устойчивости. В этом контексте такая CAR-Т-клетка также упоминается как «вооруженная CAR-Т-клетка». Молекула «брони» может быть выбрана на основе микросреды опухоли и других элементов врожденной и адаптивной иммунной систем. В некоторых вариантах осуществления молекула может быть стимулирующим фактором, таким как IL2, IL12, IL15, IL18, IFN типа I, CD40L и 4-1BBL, которые, как было показано, дополнительно повышают эффективность и устойчивость CAR Т-клеток перед лицом микросреды враждебной опухоли с помощью различных механизмов (Yeku et al., *Biochem Soc Trans.*, 2016, 44 (2): 412-418).

[0547] В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки согласно настоящему раскрытию могут быть НК-клетками, модифицированными для экспрессии антигенспецифического рецептора Т-клеток (TCR) или рецептора антигенспецифического химерного антигена (CAR), описанного в настоящем документе.

[0548] НК-клетки могут быть выделены из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) или получены из эмбриональных стволовых (ES) клеток человека и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC). Первичные НК-клетки, выделенные из PBMC, могут быть дополнительно размножены для адоптивной иммунотерапии. Стратегии и протоколы, используемые для размножения НК-клеток, могут включать стимуляцию интерлейкином 2 (IL2) и использование аутологичных фидерных клеток или использование генетически модифицированных аллогенных фидерных клеток. В некоторых аспектах НК-клетки можно избирательно размножать с помощью комбинации стимулирующих лигандов, включая IL15, IL21, IL2, 41BBL, IL12, IL18, MICA, 2B4, LFA-1 и BSM1/SLAMF2 (например, публикация патента США № US20150190471).

[0549] Иммунные клетки, экспрессирующие эффекторные модули CA2, содержащие CAR и/или другие иммунотерапевтические средства, можно использовать в качестве иммунотерапии рака. Иммунотерапия включает клетки, экспрессирующие CAR и/или другие иммунотерапевтические средства в качестве активного ингредиента, и может дополнительно включать подходящее вспомогательное средство. Примеры вспомогательного средства могут включать вышеупомянутые фармацевтически приемлемые вспомогательные средства, включая различные среды для культивирования клеток и изотонический хлорид натрия.

[0550] В некоторых вариантах осуществления клетки согласно настоящему раскрытию могут быть дендритными клетками, которые генетически модифицированы для экспрессии композиций согласно настоящему раскрытию. Такие клетки можно использовать в качестве противораковых вакцин.

#### **V. ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

[0551] В различных местах настоящего описания характеристики или функции композиций согласно настоящему раскрытию раскрыты в группах или в диапазонах. В частности, предполагается, что настоящее раскрытие включает каждую отдельную субкомбинацию членов таких групп и диапазонов. Ниже приводится неограничивающий список определений терминов.

[0552] Активность: В рамках настоящего изобретения термин «активность» относится к состоянию, в котором что-то происходит или случается. Композиции, описанные в данном документе, могут обладать активностью, и эта активность может включать одно или несколько биологических событий. В некоторых вариантах осуществления биологические события могут включать события передачи сигналов клетки. В некоторых вариантах осуществления биологические события могут включать события передачи сигналов клетки, связанные с взаимодействием белков с одним или несколькими соответствующими белками, рецепторами, малыми молекулами или любым из компонентов биосхем, описанных в данном документе.

[0553] Адоптивная клеточная терапия (АКТ): термины «адоптивная клеточная терапия» или «адоптивный перенос клеток» в рамках настоящего изобретения относятся к клеточной терапии, включающей перенос клеток пациенту, при этом клетки могут происходить из пациента или другого человека, и их конструируют (изменяют) перед передачей обратно пациенту. Терапевтические клетки могут происходить из иммунной системы, такие как эффекторные иммунные клетки: CD4<sup>+</sup> Т-клетка; CD8<sup>+</sup> Т-клетка, натуральная клетка-киллер (НК-клетка); и В-клетки и инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), полученные из резецированных опухолей. Чаще всего переносимые клетки являются аутологичными противоопухолевыми Т-клетками после размножения или манипуляции *ex vivo*. Например, аутологичные лимфоциты периферической крови могут быть генетически сконструированы для распознавания специфических опухолевых антигенов путем экспрессии Т-клеточных рецепторов (TCR) или химерных антигенных рецепторов (CAR).

[0554] Средство: В рамках настоящего изобретения термин «средство» относится к биологическому, фармацевтическому или химическому соединению. Неограничивающие примеры включают простую или сложную органическую или неорганическую молекулу, пептид, белок, олигонуклеотид, антитело, производное антитела, фрагмент антитела, рецептор и растворимый фактор.

[0555] Агонист: термин «агонист» в рамках настоящего изобретения относится к соединению, которое в комбинации с рецептором может вызывать клеточный ответ. Агонистом может быть лиганд, который напрямую связывается с рецептором.

Альтернативно, агонист может соединяться с рецептором косвенно, например, (а) образуя комплекс с другой молекулой, которая напрямую связывается с рецептором, или (b) иным образом приводя к модификации другого соединения, так что другое соединение напрямую связывается с рецептором. Агонист может называться агонистом конкретного рецептора или семейства рецепторов, например, агонистом костимулирующего рецептора.

[0556] Антагонист: термин «антагонист» в рамках настоящего изобретения относится к любому средству, которое ингибирует или снижает биологическую активность мишени (мишеней), которую он связывает.

[0557] Антиген: термин «антиген» в рамках настоящего изобретения определяется как молекула, которая вызывает иммунный ответ, когда ее вводят субъекту, или субъект ее продуцирует, например, опухолевые антигены, которые возникают в результате самого развития рака. Этот иммунный ответ может включать либо выработку антител, либо активацию специфических иммунологически компетентных клеток, таких как цитотоксические Т-лимфоциты и Т-хелперы, либо и то, и другое. Антиген может происходить из организмов, субъединиц белков/антигенов, убитых или инактивированных целых клеток или лизатов. В контексте настоящего раскрытия термины «представляющие интерес антигены» или «желаемые антигены» относятся к тем белкам и/или другим биомолекулам, представленным в настоящем документе, которые иммуноспецифически связаны или взаимодействуют с антителами согласно настоящему раскрытию и/или фрагментами, мутантами, их вариантами и/или модификациями, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления интересующие антигены могут включать любой из полипептидов, грузов или белков, описанных в данном документе, или их фрагментов или частей.

[0558] Примерно: в рамках настоящего изобретения термин «приблизительно» или «примерно» в применении к одному или нескольким представляющим интерес значениям относится к значению, которое аналогично заявленному эталонному значению. В некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» или «примерно» относится к диапазону значений, которые попадают в пределы 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или меньше в любом направлении (больше или меньше) от заявленного эталонного значения, если иное не указано или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое количество превышает 100 из возможного значения).

[0559] Связанный: В рамках настоящего изобретения термины «ассоциированный», «конъюгированный», «связанный», «присоединенный» и «прикрепленный», когда они использованы в отношении двух или более фрагментов, означают, что фрагменты физически ассоциированы или связаны друг с другом, либо напрямую, либо через один или несколько дополнительных фрагментов, которые служат в качестве связывающих средств, с образованием структуры, которая является достаточно стабильной, чтобы части оставались физически связанными в условиях, в которых используется структура, например, физиологических условия. «Ассоциация» не обязательно должна быть строгой прямой ковалентной химической связью. Это также может предполагать ионную или

водородную связь или связность на основе гибридизации, достаточно стабильную, чтобы «связанные» объекты оставались физически связанными.

[0560] Аутологичный: термин «аутологичный» в рамках настоящего изобретения предназначен для обозначения любого материала, полученного у того же человека, которому он позже будет повторно введен.

[0561] Штрих-код: термин «штрих-код» в рамках настоящего изобретения относится к полинуклеотидной или аминокислотной последовательности, которая отличает один полинуклеотид или аминокислоту от другого.

[0562] Рак: термин «рак» в рамках настоящего изобретения относится к широкой группе различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводит к образованию злокачественных опухолей, которые проникают в соседние ткани и в конечном итоге метастазируют в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровотоки.

[0563] Костимулирующая молекула: в рамках настоящего изобретения в соответствии с его значением для активации иммунных Т-клеток, относится к группе рецепторов/лигандов на поверхности иммунных клеток, которые взаимодействуют между Т-клетками и APC и генерируют стимулирующий сигнал в Т-клетках, который сочетается со стимулирующим сигналом в Т-клетках, который возникает в результате распознавания Т-клеточным рецептором (TCR) комплекса антиген/МНС (pMHC) на APC.

[0564] Цитокины: термин «citoкины» в рамках настоящего изобретения относится к семейству небольших растворимых факторов с плейотропными функциями, которые продуцируются многими типами клеток, которые могут влиять и регулировать функцию иммунной системы.

[0565] Доставка: термин «доставка» в рамках настоящего изобретения относится к действию или способу доставки соединения, вещества, объекта, фрагмента, груза или полезного груза. «Средство доставки» относится к любому средству, которое облегчает, по крайней мере частично, доставку *in vivo* одного или нескольких веществ (включая, но без ограничения, соединение и/или композицию согласно настоящему раскрытию) в клетку, субъекту или клетки других биологических систем.

[0566] Дестабилизированный: в рамках настоящего изобретения термин «дестабилизирующий», «дестабилизирующий», «участок дестабилизации» или «домен дестабилизации» означает участок или молекулу, которые менее стабильны, чем исходная, эталонная, дикого типа или нативная форма того же участка или молекулы.

[0567] Домен дестабилизации (DD): в рамках настоящего изобретения термин «домен дестабилизации» относится к белку или его области или домену, которые могут быть функционально связаны с представляющей интерес грузом (POI). В отсутствие связывающего DD лиганда DD делает функционально связанный POI нестабильным, так что POI быстро разрушается внутри клетки. В присутствии связывающего DD лиганда функционально связанный POI стабилизируется, и функция белка восстанавливается. В

рамках настоящего изобретения термины «домен дестабилизации» и «домен, чувствительный к лекарству» (DRD) являются взаимозаменяемыми.

[0568] Сконструированный: в рамках настоящего изобретения варианты осуществления настоящего раскрытия являются «сконструированными», когда они выполнены с наличием особенности или свойства, структурного или химического, которое варьируется от начальной точки, дикого типа или нативной молекулы.

[0569] Экспрессия: В рамках настоящего изобретения термин «экспрессия» последовательности нуклеиновой кислоты относится к одному или нескольким из следующих событий: (1) получение матрицы РНК из последовательности ДНК (например, путем транскрипции); (2) обработка транскрипта РНК (например, путем сплайсинга, редактирования, образования 5'-кэпирования и/или процессинга 3'-конца); (3) трансляция РНК в полипептид или белок; (4) складывание полипептида или белка; и (5) посттрансляционная модификация полипептида или белка.

[0570] Признак: В рамках настоящего изобретения термин «признак» относится к характеристике, свойству или отличительному элементу.

[0571] Препарат: В рамках настоящего изобретения термин «препарат» включает по меньшей мере соединение и/или композицию согласно настоящему раскрытию и средство доставки.

[0572] Фрагмент: «фрагмент» в рамках настоящего изобретения относится к части. Например, фрагменты белков могут содержать полипептиды, полученные путем расщепления полноразмерного белка. В некоторых вариантах осуществления фрагмент белка содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250 или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагменты антитела содержат части антитела.

[0573] Функциональная: в рамках настоящего изобретения «функциональная» биологическая молекула представляет собой биологический объект со структурой и в форме, в которой она проявляет свойство и/или активность, которыми она характеризуется.

[0574] Иммунные клетки: термин «иммунная клетка» в рамках настоящего изобретения относится к любой клетке иммунной системы, которая происходит из гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге, которая дает начало двум основным линиям, миелоидным клеткам-предшественникам (которые дают начало миелоидным клеткам, таким как моноциты, макрофаги, дендритные клетки, мегакарициты и гранулоциты) и лимфоидным клеткам-предшественникам (которые дают начало лимфоидным клеткам, таким как Т-клетки, В-клетки и натуральные клетки-киллеры (NK)). Примеры клеток иммунной системы включают CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, CD4- CD8- двойные отрицательные Т-клетки, Т-клетки  $\gamma\delta$ , Т-клетки  $\alpha\beta$ , регуляторные Т-клетки, натуральные клетки-киллеры и дендритные клетки. Макрофаги и дендритные клетки могут называться «антигенпрезентирующими клетками» или «АРС», которые представляют собой специализированные клетки, которые могут активировать Т-клетки, когда рецептор главного комплекса гистосовместимости (МНС) на поверхности АРС в комплексе с

пептидом взаимодействует с TCR на поверхности Т-клетки.

[0575] Иммуноterapia: термин «иммуноterapia» в рамках настоящего изобретения относится к типу лечения заболевания путем индукции или восстановления реактивности иммунной системы по отношению к заболеванию.

[0576] Иммунотерапевтическое средство: Термин «иммунотерапевтическое средство» в рамках настоящего изобретения относится к биологическому, фармацевтическому или химическому соединению, которое можно использовать для лечения заболевания путем индукции или восстановления реактивности иммунной системы по отношению к заболеванию.

[0577] In vitro: В рамках настоящего изобретения термин «in vitro» относится к событиям, которые происходят в искусственной среде, например, в пробирке или реакционном сосуде, в культуре клеток, в чашке Петри и так далее, а не в внутри организма (например, животного, растения или микроорганизма).

[0578] In vivo: в рамках настоящего изобретения термин «in vivo» относится к событиям, которые происходят в организме (например, животном, растении или микроорганизме или их клетке или ткани).

[0579] Линкер: В рамках настоящего изобретения термин «линкер» относится к фрагменту, который соединяет два или более домена, фрагмента или объекта. В одном варианте линкер может содержать 10 или более атомов. В дополнительном варианте осуществления линкер может содержать группу атомов, например, 10-1000 атомов, и может состоять из атомов или групп, таких как, но без ограничения, углерод, аминокислота, алкиламино, кислород, сера, сульфоксид, сульфонил, карбонил и имин. В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать одну или несколько нуклеиновых кислот, содержащих один или несколько нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать аминокислоту, пептид, полипептид или белок. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, связанный линкером, может содержать, но без ограничения, атом, химическую группу, нуклеозид, нуклеотид, азотистое основание, сахар, нуклеиновую кислоту, аминокислоту, пептид, полипептид, белок, белковый комплекс, груз (например, терапевтическое средство) или маркер (включая, но без ограничения, химический, флуоресцентный, радиоактивный или биолюминесцентный маркер). Линкер можно использовать для любой полезной цели, например, для образования мультимеров или конъюгатов, а также для введения груза, как описано в данном документе. Примеры химических групп, которые могут быть включены в линкер, включают, но без ограничения, алкил, алкенил, алкинил, амидо, аминокислота, простой эфир, тиоэфир, сложный эфир, алкилен, гетероалкилен, арил или гетероцикл, каждый из которых может быть необязательно замещен, как описано в данном документе. Примеры линкеров включают, но без ограничения, ненасыщенные алканы, полиэтиленгликоли (например, мономерные звенья этилен- или пропиленгликоля, например, диэтиленгликоль, дипропиленгликоль, триэтиленгликоль, трипропиленгликоль, тетраэтиленгликоль или тетрапропиленгликоль) и декстрановые полимеры. Другие примеры включают, но без ограничения, расщепляемые

фрагменты в линкере, такие как, например, дисульфидная связь (-S-S-) или азосвязь (-N=N-), которые могут быть расщеплены с использованием восстанавливающего средства или фотолиза. Неограничивающие примеры селективно расщепляемых связей включают амидную связь, которая может быть расщеплена, например, с использованием трис (2-карбокситил) фосфина (ТСЕР) или других восстанавливающих средств и/или фотолиза, а также сложноэфирной связи, которая может быть расщеплена, например, за счет кислотного или основного гидролиза.

[0580] Контрольная точка/фактор: В рамках настоящего изобретения фактор контрольной точки - это любой фрагмент или молекула, функция которых действует на стыке процесса. Например, белок, лиганд или рецептор контрольной точки могут останавливать или ускорять клеточный цикл.

[0581] Метаболиты: метаболиты представляют собой промежуточные продукты метаболических реакций, катализируемых ферментами, которые естественным образом существуют внутри клеток. Этот термин обычно используют для описания малых молекул, фрагментов более крупных биомолекул или продуктов переработки.

[0582] Модифицированный: В рамках настоящего изобретения термин «модифицированный» относится к измененному состоянию или структуре молекулы или объекта по сравнению с родительской или эталонной молекулой или объектом. Молекулы можно модифицировать разными способами, в том числе химически, структурно и функционально. В некоторых вариантах осуществления соединения и/или композиции согласно настоящему раскрытию модифицированы за счет введения неприродных аминокислот.

[0583] Мутация: В рамках настоящего изобретения термин «мутация» относится к изменению и/или замене. В некоторых вариантах осуществления мутации могут представлять собой изменения и/или замены белков (включая пептиды и полипептиды) и/или нуклеиновых кислот (включая полинуклеиновые кислоты). В некоторых вариантах осуществления мутации включают изменения и/или замены последовательности белка и/или нуклеиновой кислоты. Такие изменения и/или замены могут включать добавление, замену и или удаление одной или нескольких аминокислот (в случае белков и/или пептидов) и/или нуклеотидов (в случае нуклеиновых кислот и/или полинуклеиновых кислот, например, полинуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления, где мутации включают добавление и/или замену аминокислот и/или нуклеотидов, такие добавления и/или замены могут включать 1 или несколько аминокислотных и/или нуклеотидных остатков и могут включать модифицированные аминокислоты и/или нуклеотиды. Полученная конструкция, молекула или последовательность мутации, изменения и/или замены могут называться в данном документе мутантами.

[0584] Неоантиген: термин «неоантиген» в рамках настоящего изобретения относится к опухолевому антигену, который присутствует в опухолевых клетках, но не в нормальных клетках, и не индуцирует делецию их родственных антигенспецифических Т-клеток в тимусе (то есть центральную толерантность). Эти опухолевые неоантигены могут

обеспечивать «чужеродный» сигнал, подобный патогенам, для индукции эффективного иммунного ответа, необходимого для иммунотерапии рака. Неоантиген может быть ограничен конкретной опухолью. Неоантиген представляет собой пептид/белок с миссенс-мутацией (миссенс-неоантиген) или новый пептид с длинными, совершенно новыми участками аминокислот из новых открытых рамок считывания (neoORF). НеоОРС могут быть созданы в некоторых опухолях в результате вставок или делеций вне рамки считывания (из-за дефектов репарации несоответствия ДНК, вызывающих микросателлитную нестабильность), слияния генов, сквозного считывания мутаций в стоп-кодонах или трансляции неправильно сплайсированной РНК (например, Saeterdal et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 13255-13260).

[0585] Нецелевой: В рамках настоящего изобретения термин «нецелевой» относится к любому непреднамеренному воздействию на любую одну или несколько мишеней, генов, клеточных транскриптов, клеток и/или тканей.

[0586] Функционально связанный: В рамках настоящего изобретения термин «функционально связанный» относится к функциональной связи между двумя или более молекулами, конструкциями, транскриптами, объектами, фрагментами и тому подобное.

[0587] Груз или представляющий интерес груз (POI): термины «груз» и «представляющий интерес груз (POI)» в рамках настоящего изобретения использованы взаимозаменяемо. Представляющий интерес груз (POI) относится к любому полипептиду или белку, который функционально связан с доменом дестабилизации (DD). В контексте настоящего раскрытия POI является компонентом иммунной системы, включая как врожденную, так и адаптивную иммунную системы. Представляющий интерес груз может называться представляющим интерес белком.

[0588] Фармацевтически приемлемые вспомогательные средства: термин «фармацевтически приемлемое вспомогательное средство» в рамках настоящего изобретения относится к любому ингредиенту помимо активных средств (например, как описано в данном документе), присутствующих в фармацевтических композициях и обладающих по существу нетоксичными и невоспалительными свойствами для субъекта. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые вспомогательные средства представляют собой носители, способные суспендировать и/или растворять активные средства. Вспомогательные средства могут включать, например, антиадгезивы, антиоксиданты, связующие вещества, покрытия, добавки для прессования, разрыхлители, краски (красители), смягчающие вещества, эмульгаторы, наполнители (разбавители), пленкообразователи или покрытия, ароматизаторы, отдушки, глиданты (усилители текучести), смазки, консерванты, печатные краски, сорбенты, суспендирующие или диспергирующие средства, подсластители и средства гидратации. Иллюстративные вспомогательные средства включают, но без ограничения: бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), карбонат кальция, фосфат кальция (двухосновный), стеарат кальция, краскармеллозу, сшитый поливинилпирролидон, лимонную кислоту, кросповидон, цистеин, этилцеллюлозу, желатин, гидроксипропилцеллюлозу,

гидроксипропилметилцеллюлозу, лактозу, стеарат магния, мальтит, маннит, метионин, метилцеллюлозу, метилпарабен, микрокристаллическую целлюлозу, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, повидон, прежелатинизированный крахмал, пропилпарабен, ретинилпальмитат, шеллак, диоксид кремния, карбоксиметилцеллюлозу натрия, цитрат натрия, гликолят крахмала натрия, сорбит, крахмал (кукурузный), стеариновую кислоту, сахарозу, тальк, диоксид титана, витамин А, витамин Е, витамин С и ксилит.

[0589] **Фармацевтически приемлемые соли:** Фармацевтически приемлемые соли соединений, описанных в данном документе, представляют собой формы описанных соединений, в которых кислотный или основной фрагмент находится в его солевой форме (например, полученной при взаимодействии группы свободного основания с подходящей органической кислотой). Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, но без ограничения, соли минеральных или органических кислот с основными остатками, такими как амины; щелочные или органические соли кислотных остатков, таких как карбоновые кислоты; и тому подобное. Типичные кислотно-аддитивные соли включают ацетат, адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, полусульфат, гептонат, гексаноат, гидробромид, гидрохлорид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, толуолсульфонат, ундеканат, валератные соли и тому подобное. Типичные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают натрий, литий, калий, кальций, магний и тому подобное, а также нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и аминов, включая, но без ограничения, аммоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин, этиламин и тому подобное. Фармацевтически приемлемые соли включают обычные нетоксичные соли, например, нетоксичных неорганических или органических кислот. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемую соль получают из исходного соединения, которое содержит основной или кислотный фрагмент, обычными химическими методами. Обычно такие соли могут быть получены в результате реакции свободных кислотных или основных форм этих соединений со стехиометрическим количеством подходящего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе, или в их смеси; обычно предпочтительны неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил. Списки подходящих солей можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P.H. Stahl and C.G. Wermuth (eds), Wiley-VCH, 2008, и Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977), каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. **Фармацевтически приемлемый сольват:** термин «фармацевтически приемлемый сольват» в

рамках настоящего изобретения относится к кристаллической форме соединения, в которой молекулы подходящего растворителя включены в кристаллическую решетку. Например, сольваты могут быть получены путем кристаллизации, перекристаллизации или осаждения из раствора, который содержит органические растворители, воду или их смесь. Примерами подходящих растворителей являются этанол, вода (например, моно-, ди- и тригидраты), N-метилпирролидинон (NMP), диметилсульфоксид (DMSO), N, N'-диметилформамид (DMF), N, N'-диметилацетамид (DMAC), 1,3-диметил-2-имидазолидинон (DMEU), 1,3-диметил-3,4,5,6-тетрагидро-2-(1H)-пиримидинон (DMPU), ацетонитрил (ACN), пропиленгликоль, этилацетат, бензиловый спирт, 2-пирролидон, бензилбензоат и тому подобное. Когда растворителем является вода, сольват называют «гидратом». В некоторых вариантах осуществления растворитель, включенный в сольват, относится к типу или к уровню, который является физиологически приемлемым для организма, которому вводят сольват (например, в стандартной лекарственной форме фармацевтической композиции).

[0590] Стабильный: В рамках настоящего изобретения термин «стабильный» относится к соединению или объекту, который является достаточно устойчивым, чтобы выдержать выделение до приемлемой степени чистоты из реакционной смеси, и предпочтительно способным превращаться в эффективное терапевтическое средство.

[0591] Стабилизированный: в рамках настоящего изобретения термин «стабилизировать», «стабилизированный», «стабилизированная область» означает сделать или стать стабильным. В некоторых вариантах осуществления стабильность измеряют относительно абсолютного значения. В некоторых вариантах осуществления стабильность измеряют относительно вторичного статуса или состояния или относительно эталонного соединения или объекта.

[0592] Стандартный CAR: В рамках настоящего изобретения термин «стандартный CAR» относится к стандартной конструкции химерного антигенного рецептора. Компоненты белка слияния CAR, включая внеклеточный scFv-фрагмент, трансмембранный домен и один или несколько внутриклеточных доменов, линейно сконструированы как единый белок слияния.

[0593] Элемент ответа на стимул (SRE): термин «элемент ответа на стимул (SRE)» в рамках настоящего изобретения представляет собой компонент эффекторного модуля, который присоединен, прикреплен, связан или ассоциирован с одним или несколькими грузами эффекторного модуля, и в некоторых случаях отвечает за способность эффекторного модуля реагировать на один или несколько стимулов. В рамках настоящего изобретения термин способность SRE «реагировать» на стимул может характеризоваться ковалентным или нековалентным взаимодействием, прямой или косвенной ассоциацией или структурной или химической реакцией на стимул. Кроме того, ответ любого SRE на стимул может зависеть от степени или вида. Ответ может быть частичным. Ответ может быть обратимым. Ответ в конечном итоге может привести к регулируемому сигналу или выходу. Такой выходной сигнал может иметь относительный характер по отношению к стимулу, например, производить модулирующий эффект от 1 до 100 или увеличение или

уменьшение с учетом коэффициента, например, 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное, 10-кратное или более. Одним неограничивающим примером SRE является домен дестабилизации (DD).

[0594] Субъект: В рамках настоящего изобретения термин «субъект» или «пациент» относится к любому организму, которому может быть введена композиция в соответствии с настоящим раскрытием, например, для экспериментальных, диагностических, профилактических и/или терапевтических целей. Типичные субъекты включают животных (например, млекопитающих, таких как мыши, крысы, кролики, нечеловеческие приматы и люди) и/или растения.

[0595] Т-клетка: Т-клетка представляет собой иммунную клетку, которая продуцирует рецепторы Т-клеток (TCR). Т-клетки могут быть наивными (не подверженными действию антигена; повышенная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 и CD45RA и пониженная экспрессия CD45RO по сравнению с TCM), Т-клетками памяти (ТМ) (обученными антигеном и с длительным жизненным циклом) и эффекторными клетками (обученными антигеном, цитотоксическими). ТМ можно дополнительно разделить на подмножества Т-клеток центральной памяти (TCM, повышенная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO и CD95 и пониженная экспрессия CD54RA по сравнению с наивными Т-клетками и эффекторными Т-клетками памяти (TEM, пониженная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD45RA и повышенная экспрессия CD127 по сравнению с наивными Т-клетками или TCM). Эффекторные Т-клетки (TE) относятся к цитотоксическим Т-лимфоцитам CD8+, обученными антигеном, которые имеют пониженную экспрессию CD62L, CCR7, CD28 и являются положительными в отношении гранзима и перфорина по сравнению с TCM. Другие примеры Т-клеток включают регуляторные Т-клетки, такие как регуляторные Т-клетки CD4+ CD25+ (Foxp3+) и клетки Treg17, а также Tr1, Th3, CD8+ CD28- и Qa-1-рестриктированные Т-клетки.

[0596] Т-клеточный рецептор: Т-клеточный рецептор (TCR) относится к члену суперсемейства иммуноглобулинов, имеющему переменный антигенсвязывающий домен, константный домен, трансмембранную область и короткий цитоплазматический хвост, который способен специфически связываться с антигенным пептидом, связанным с рецептором МНС. TCR может находиться на поверхности клетки или в растворимой форме и обычно состоит из гетеродимера, имеющего  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи (также известные как TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , соответственно) или  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепи (также известные как TCR $\gamma$  и TCR $\delta$ , соответственно). Внеклеточная часть цепей TCR (например,  $\alpha$ -цепь,  $\beta$ -цепь) содержит два иммуноглобулиновых домена, переменный домен (например, переменный домен  $\alpha$ -цепи или V $\alpha$ , переменный домен  $\beta$ -цепи или V $\beta$ ) на N-конце, и один константный домен (например, константный домен  $\alpha$ -цепи или C $\alpha$  и константный домен  $\beta$ -цепи или C $\beta$ ), прилегающий к клеточной мембране. Подобно иммуноглобулину, переменные домены содержат определяющие комплементарность области (CDR), разделенные каркасными областями (FR). TCR обычно связывается с комплексом CD3 с образованием комплекса TCR. В рамках настоящего изобретения термин «комплекс TCR» относится к комплексу,

образованному ассоциацией CD3 с TCR. Например, комплекс TCR может состоять из цепи CD3 $\gamma$ , цепи CD3 $\delta$ , двух цепей CD3 $\epsilon$ , гомодимера цепей CD3 $\zeta$ , цепи TCR $\alpha$  и цепи TCR $\beta$ . Альтернативно, комплекс TCR может состоять из цепи CD3 $\gamma$ , цепи CD3 $\delta$ , двух цепей CD3 $\epsilon$ , гомодимера цепей CD3 $\zeta$ , цепи TCR $\gamma$  и цепи TCR $\delta$ . «Компонент комплекса TCR» в рамках настоящего изобретения относится к цепи TCR (то есть TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\gamma$  или TCR $\delta$ ), цепи CD3 (то есть CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  или CD3 $\zeta$ ) или комплексу, образованному двумя или более цепями TCR или цепями CD3 (например, комплексу TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , комплексу TCR $\gamma$  и TCR $\delta$ , комплексу CD3 $\epsilon$  и CD3 $\delta$ , комплексу CD3 $\gamma$  и CD3 $\epsilon$  или комплексу суб-TCR из TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  и двух цепей CD3 $\epsilon$ ).

[0597] Терапевтически эффективное количество: в рамках настоящего изобретения термин «терапевтически эффективное количество» означает количество доставляемого средства (например, нуклеиновой кислоты, лекарства, терапевтического средства, диагностического средства, профилактического средства и так далее), которое является достаточным при введении субъекту, страдающему или восприимчивому к инфекции, заболеванию, расстройству и/или состоянию, для лечения, улучшения симптомов, диагностики, предотвращения и/или отсрочки начала инфекции, заболевания, расстройства и/или или состояние. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество предоставлено в разовой дозе. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество вводят в режиме дозирования, предусматривающем множество доз. Специалисты в данной области поймут, что в некоторых вариантах осуществления стандартная лекарственная форма может рассматриваться как содержащая терапевтически эффективное количество конкретного средства или объекта, если она содержит количество, эффективное при введении как часть такого режима дозирования.

[0598] Лечение или обработка: в рамках настоящего изобретения термины «лечение» или «обработка» обозначают подход к получению полезного или желаемого результата, в том числе и предпочтительно полезный или желаемый клинический результат. Такие полезные или желаемые клинические результаты включают, но без ограничения, одно или несколько из следующего: уменьшение пролиферации (или уничтожение) раковых клеток или других больных клеток, уменьшение метастазирования раковых клеток, обнаруживаемых при раке, уменьшение размера опухоли., уменьшение симптомов, возникающих в результате заболевания, повышение качества жизни людей, страдающих этим заболеванием, уменьшение дозы других лекарств, необходимых для лечения заболевания, замедления прогрессирования заболевания и/или продления жизни людей.

[0599] Настроить: в рамках настоящего изобретения термин «настраивать» означает регулировать, уравновешивать или адаптировать одну вещь в ответ на стимул или в направлении конкретного результата. В одном неограничивающем примере SRE и/или DD согласно настоящему раскрытию регулируют, уравновешивают или адаптируют функцию или структуру композиций, к которым они добавлены, присоединены или связаны, в ответ

на конкретные стимулы и/или окружающую среду.

### **ЭКВИВАЛЕНТЫ И ОБЪЕМ**

[0600] Специалисты в данной области техники поймут или смогут установить, используя не более чем рутинное экспериментирование, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления в соответствии с настоящим раскрытием, описанным в данном документе. Объем настоящего раскрытия не предназначен для ограничения приведенным выше описанием, а вместо этого изложен в прилагаемой формуле изобретения.

[0601] В формуле изобретения формы единственного числа могут означать один или несколько, если иное не указано или иным образом не очевидно из контекста. Утверждения или описания, которые включают «или» между одним или несколькими членами группы, считаются удовлетворенными, если один, несколько или все члены группы присутствуют, используются или иным образом относятся к данному продукту или процессу, если иное не указано или иным образом не очевидно из контекста. Настоящее раскрытие включает варианты осуществления, в которых только один член группы присутствует, используется или иным образом относится к данному продукту или процессу. Настоящее раскрытие включает варианты осуществления, в которых более чем один или все члены группы присутствуют, используются или иным образом относятся к данному продукту или процессу.

[0602] Также следует отметить, что термин «содержащий» предназначен быть открытым и разрешает, но не требует включения дополнительных элементов или этапов. Когда в данном документе использован термин «содержащий», также включен и раскрыт термин «состоящий из».

[0603] Если указаны диапазоны, включены конечные точки. Кроме того, следует понимать, что, если иное не указано или иное не очевидно из контекста и понимания рядового специалиста в данной области, значения, выраженные в виде диапазонов, могут принимать любое конкретное значение или поддиапазон в указанных диапазонах в различных вариантах осуществления настоящего раскрытия, с точностью до десятых единиц нижнего предела диапазона, если контекст явно не диктует иное.

[0604] Кроме того, следует понимать, что любой конкретный вариант осуществления настоящего раскрытия, относящийся к известному уровню техники, может быть явно исключен из любого одного или нескольких пунктов формулы изобретения. Поскольку такие варианты осуществления считаются известными рядовому специалисту в данной области, они могут быть исключены, даже если исключение не изложено в данном документе явно. Любой конкретный вариант осуществления композиций согласно настоящему раскрытию (например, любой антибиотик, терапевтический или активный ингредиент; любой способ производства; любой способ применения и так далее) может быть исключен из любого одного или нескольких пунктов формулы изобретения по любой причине, независимо от того, связан он или нет и с существованием известного уровня техники.

[0605] Следует понимать, что использованные слова являются словами описания, а

не ограничения, и что изменения могут быть внесены в рамках прилагаемой формулы изобретения без отступления от истинного объема и сущности настоящего раскрытия в его более широких аспектах.

[0606] Хотя настоящее раскрытие было описано довольно подробно и с некоторой конкретностью в отношении нескольких описанных вариантов осуществления, не предполагается, что оно должно быть ограничено любыми такими подробностями или вариантами осуществления или каким-либо конкретным вариантом осуществления, но его следует истолковывать со ссылками на прилагаемую формулу изобретения, чтобы обеспечить максимально широкую интерпретацию такой формулы изобретения с учетом предшествующего уровня техники и, следовательно, эффективно охватить предполагаемый объем настоящего раскрытия. Настоящее раскрытие дополнительно проиллюстрировано следующими неограничивающими примерами.

### ПРИМЕРЫ

#### Пример 1. Регулирование CD40L in vitro в Т-клетках.

[0607] Конструкции CD40L, регулируемые DD карбоангидразы, были созданы и клонированы в лентивирусные векторы. Очищенные Т-клетки размораживали и культивировали с шариками Dynabeads aCD3 aCD28 (в соотношении 3 шарика на 1 Т-клетку).

[0608] На следующий день конструкции трансдуцировали в Т-клетки. Через 48 часов после добавления вируса тестировали лиганд-зависимую регуляцию с использованием 50 мкМ ацетазоламида или контроля в виде носителя (DMSO). Через 24 часа после добавления лиганда Т-клетки окрашивали на экспрессию CD40L и анализировали с помощью FACS. В присутствии ацетазоламида OT-001990 продемонстрировал увеличение экспрессии CD40L по сравнению с контролем в виде носителя и Т-клетками, экспрессирующими пустой вектор без вставки. Экспрессию CD40L в ответ на увеличивающиеся дозы ацетазоламида измеряли в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках. Клетки обрабатывали ацетазоламидом в течение 24 часов, и экспрессию CD40L измеряли с помощью FACS. Результаты показаны в виде медианной интенсивности флуоресценции в таблице 10 и в виде процента CD40L-положительных клеток в таблице 11.

Таблица 10. CD40L MFI

Ацетазоламид (мкМ)	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
0,01	112	105
0,05	123	104
0,2	185	136
0,8	481	307
3,1	840	380
12,5	2783	1599
50	3728	2184

Таблица 11. Процентное отношение CD40L-положительных клеток

Ацетазоламид (мкМ)	CD4+	CD8+
0,01	4,13	0,59
0,05	5,44	0,44
0,2	10,3	1,48
0,8	45,6	25,2
3,1	69,3	41,2
12,5	90,3	77,2
50	91,1	80,7

[0609] Как показано в Таблице 10 и Таблице 11, лиганд-зависимая регуляция наблюдалась как в CD4+ Т-клетках, так и в CD8+ Т-клетках, однако у CD4+ клеток абсолютные значения MFI и процент CD40L-положительных клеток были выше. Количество ацетазоламида, необходимое для стабилизации CD40L, на уровне лиганда, который может быть достигнут у человека.

Пример 2. Регуляция динамики CD40L in vitro в Т-клетках.

[0610] Конструкции CD40L, регулируемые DD карбоангидразы, были созданы и клонированы в лентивирусные векторы. Очищенные Т-клетки размораживали и культивировали с шариками Dynabeads aCD3 aCD28 (в соотношении 3 шарика на 1 Т-клетку).

[0611] Конструкции трансдуцировали в Т-клетки и добавляли 50 мкМ ацетазоламида или контрольного носителя (DMSO) в течение 48 часов. Также оценивали контроль в виде пустого вектора (EV) и конститутивного CD40L (OT-001661; аминокислота SEQ ID NO. 6067 и нуклеиновая кислота SEQ ID NO. 6068). Клетки фиксировали через 2, 4, 6, 8, 24 и 48 часов, а затем Т-клетки окрашивали на экспрессию CD40L и анализировали с помощью FACS. Результаты представлены в виде медианной интенсивности флуоресценции в таблице 12 и в виде процента CD40L-положительных клеток в таблице 13.

Таблица 12. CD40L MFI

Время (часов)	EV		Конститутивный CD40L (OT-001661)		CA2-регулируемый CD40L (OT-001990) DMSO		CA2-регулируемый CD40L (OT-001990) 50 мкМ ацетазоламида	
	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+
2	1030	482	4042	2212	406	305	620	351
4	1371	457	4651	2994	381	270	1731	540
6	1239	360	3156	1773	302	224	2410	742
24	1533	321	9491	3563	400	221	10982	2376

48	1282	283	5639	2313	396	210	10384	3050
----	------	-----	------	------	-----	-----	-------	------

**Таблица 13. Процентное отношение CD40L-положительных клеток**

Время (часов)	EV		Конститутивный CD40L (OT- 001661)		CA2- регулируемый CD40L (OT-001990) DMSO		CA2-регулируемый CD40L (OT-001990) 50 мкМ ацетазоламида	
	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+
2	52	28,6	72,8	56,9	12,1	4,9	34,7	10,8
4	67,6	17,8	77	63,2	11,6	5,9	72,2	28
6	65	9,6	67,2	48,5	6,6	1	81,2	42,7
24	77,5	10,7	93,3	71,2	10,5	1,1	96,3	73,7
48	69,3	6,8	88,5	71,1	11,2	2,2	97,4	79,2

[0612] В присутствии ацетазоламида OT-001990 продемонстрировал увеличение экспрессии CD40L по сравнению с контролем в виде носителя и Т-клетками, экспрессирующими пустой вектор без вставки. Экспрессию CD40L в ответ на увеличивающиеся дозы ацетазоламида измеряли в CD4+ и CD8+ Т-клетках. Как показано в Таблице 12 и Таблице 13, лиганд-зависимая регуляция наблюдалась как в CD4+ Т-клетках, так и в CD8+ Т-клетках. Абсолютные значения MFI и процент CD40L-положительных клеток были выше у CD4+ клеток. Экспрессия достигла своего пика через 24 часа, при этом самые высокие дозы экспрессии превышали основные уровни.

Пример 3. Регулирование CD40L в Т-клетках с помощью CA2.

[0613] Для тестирования регуляции активированные Т-клетки лентивирусно трансдуцировали CA2-регулируемым CD40L (OT-001990) и контролем CD40L (OT-001661). Двумя днями позже клетки обрабатывали носителем или 50 мМ лиганда в течение 24 часов, как описано в таблице 14, после чего их анализировали на поверхностную экспрессию CD40L. Результаты для клеток CD4+ и CD8+ и всех клеток показаны ниже. В таблице «Acz» - это ацетазоламид.

Таблица 14: Процент клеток, экспрессирующих CD40L

Конструкция (DD)	Лиганд	CD4+		CD8+		Все клетки	
		CD40L положительные	MFI	CD40L положительные	MFI	CD40L положительные	MFI
OT-001661 (CD40L контроль)	N/A	98,7%	24489	97,8%	14352	98%	20451

OT-001990 (CA2)	DMS O	4,9%	112	0,1%	97,9	4%	110
OT-001990 (CA2)	50 мкМ Acz	91,1%	3728	80,7%	2184	88,8%	3304

[0614] Регулируемая экспрессия с помощью доменов дестабилизации значительно усиливала экспрессию CD40L по сравнению с эндогенными уровнями. Домены дестабилизации CA2 демонстрируют уровни, близкие к конститутивной экспрессии с дозами лиганда, которые близки к клинически значимым уровням.

Пример 4. Регулирование CD40L доменами дестабилизации, происходящими из CA2.

Регуляцию CD40L посредством множества DD карбоангидраз тестировали с использованием следующих конструкций: OT-001990, OT-002072, OT-002073, OT-001968, OT-001969, OT-001970, OT-001971, OT-002074, OT-002075, OT-002076, OT-002077. Клетки НЕК 293Т временно трансфицировали конструкциями. Клетки обрабатывали 10 мкМ ацетазоламида в течение 24 часов, и с помощью проточной цитометрии измеряли экспрессию CD40L на клеточной поверхности. Результаты показаны в таблице 15, где SR указывает степень стабилизации.

Таблица 15: Процент клеток, экспрессирующих CD40L

Конструкция	DMSO	Ацетазоламид	SR
OT-001990	12,4	41,8	3,37
OT-001968	13,4	47,6	3,55
OT-002077	12,2	23,6	1,93
OT-002074	15,5	33,5	2,16
OT-002075	14	35	2,50
OT-002076	14	32,3	2,31

[0615] Все протестированные конструкции показали лиганд-зависимую стабилизацию с коэффициентами стабилизации более 1. OT-001990 и OT-001968 продемонстрировали самые высокие значения коэффициентов стабилизации. Подобная лиганд-зависимая стабилизация CD40L наблюдалась при тестировании следующих конструкций на клетках НЕК293Т: OT-002072, OT-002073, OT-001968, OT-001969, OT-001970 и OT-001971.

[0616] Исследования зависимости «доза-ответ» проводили на Т-клетках. Клетки трансдуцировали конструкциями, указанными в таблице 16. Исследования зависимости реакции от дозы ацетазоламида проводили через 4 и 9 дней после трансдукции. Эксперименты выполняли в двух повторностях (в данном документе именуется «повтор 1» и «повтор 2»). Результаты представлены в Таблице 16 и Таблице 17 в виде медианной

интенсивности флуоресценции CD40L, проанализированной с помощью проточной цитометрии.

Таблица 16: Исследования зависимости «доза-ответ» - день 4

Конструкция	Тип клеток	Ацетазоламид (мкМ)						
		0,01	0,05	0,2	0,8	3,1	12,5	50
OT-002073 (повтор 1)	CD4+	122	170	129	346	714	1667	2228
	CD8+	93,4	110	94,6	188	335	871	1143
OT-002073 (повтор 2)	CD4+	5,57	9,19	6,04	30,1	66,2	81,6	84
	CD8+	0,64	0,35	0,54	6,4	34,4	63,4	65,9
OT-001990 (повтор 1)	CD4+	112	123	185	481	840	2783	3728
	CD8+	105	104	136	307	380	1599	2184
OT-001990 (повтор 2)	CD4+	4,13	5,44	10,3	45,6	69,3	90,3	91,1
	CD8+	0,59	0,44	1,48	25,2	41,2	77,2	80,7
OT-001968 (повтор 1)	CD4+	127	132	162	242	420	1414	2851
	CD8+	110	112	135	174	376	803	1448
OT-001968 (повтор 2)	CD4+	5,49	5,85	8,22	17,3	39,7	78,7	84,8
	CD8+	0,87	0,61	1,89	4,9	30	62,1	69,9
OT-001971 (повтор 1)	CD4+	137	140	169	251	593	1342	1841
	CD8+	101	109	116	155	224	563	888
OT-001971 (повтор 2)	CD4+	7,63	6,64	9,41	17,1	57,6	80,5	82,5
	CD8+	0,87	0,75	0,72	3,17	16,7	49,4	62,1

[0617] Результаты в Таблице 16 и Таблице 17 предполагают, что регуляция CD40L на основе DD карбоангидразы является эффективной для регулирования экспрессии CD40L при обработке ацетазоламидом. CD4-положительные клетки показали большее увеличение экспрессии CD40L по сравнению с CD8-положительными клетками, вероятно, из-за эндогенной экспрессии CD40L в клетках CD4.

[0618] Здоровые донорские Т-клетки человека активировали, трансдуцировали лентивирусным вектором (LV), экспрессирующим CD40L, для OT-001990 и размножали с использованием шариков Dynabeads aCD3 aCD28. Т-клетки замораживали на 9 день после размножения. Ацетазоламид добавляли в клетки на 3 день, 8 день после оттаивания и после 24 часов повторной стимуляции aCD3 и aCD28. Т-клетки окрашивали на экспрессию CD40L через 24 часа после добавления лиганда. Результаты представлены в Таблице 18.

Таблица 18. Экспрессия CD40L в Т-клетках OT-001990

Ацетазоламид (доза мкМ)	День 4	День 9	После оттаивания	После оттаивания+стимулирования
0,01		282	178	995

0,05	310	319	175	954
0,2	381	339	180	999
0,8	1119	641	198	1406
3,1	2381	1486	273	2314
12,5	5517	2970	525	4355
50	5427	3143	688	4860

[0619] Как показано в Таблице 18, регуляция наблюдалась в повторно стимулированных клетках после оттаивания, но не в клетках без рестимуляции. Эти данные показывают, что регуляция CD40L чувствительна к состоянию активации Т-клеток.

[0620] Человеческие Т-клетки здоровых доноров активировали, трансдуцировали лентивирусным вектором (LV), экспрессирующим CD40L, размножали и замораживали. Аллогенные человеческие моноциты дифференцировали в дендритные клетки, полученные из моноцитов (moDC) и также замораживали. Культуры *in vitro* получали из свежееоттаявших клеток, которые помещали в культуру на 48 часов. Супернатант собирали и анализировали с помощью мезомасштабного исследования (MSD) на интерлейкин 12 (IL12). Результаты показаны в таблице 19. В таблице 19 ацетазоламид обозначен как «ACZ».

Таблица 19: Экспрессия IL 12

Описание	пг/мл IL-12
moDC+Пустой вектор	0,18
moDC+Пустой вектор (Стим)	5,84
moDC+OT-001990 DMSO	0,52
moDC+ OT-001990+Стим	0,84
moDC+OT-001990 50мкМ ACZ	0,40
moDC +OT-001990 50мкМ ACZ+Стим	472,28

[0621] Подобно регуляции CD40L, экспрессия IL12 Т-клетками, экспрессирующими CD40L, была чувствительна к состоянию активации Т-клеток.

Пример 5. Регулирование CA2 CD40L-CAR Т-клеток.

[0622] Для измерения эффекта экспрессии CD40L, которая регулируется биосхемами согласно настоящему раскрытию в контексте CAR, Т-клетки, экспрессирующие любую из описанных в данном документе конструкций CD40L-CAR CA2, совместно культивировали с дендритными клетками, полученными из моноцитов (DC).

[0623] Культуры *in vitro* создавали путем добавления  $1 \times 10^4$  DC в культуру с  $1 \times 10^5$  Nalm6 и  $1 \times 10^5$  CAR+ Т-клеток. 50 мкМ ацетазоламида добавляли одновременно с клетками в культуру. Супернатанты собирали через 24 часа и анализировали на IFNg и IL-12 с помощью анализа MSD. В качестве контроля использовали OT-001661 (SEQ ID NO. 6067; кодируется SEQ ID NO. 6068), который постоянно экспрессировал грузы CD40L.

Результаты представлены в таблице 20.

Таблица 20: Уровни IFN и IL12

Описание	IFNg (пг/мл)	IL12 (пг/мл)
DC+EV+Nalm6	2042,76	-
DC+OT-001661+Nalm6	1579,21	58,88
DC+OT-001990 Носитель+Nalm6	152,84	-
DC+OT-001990 +50мкМ ацетазоламида+Nalm6	135,50	-
DC+OT-001407+Nalm6	33363,09	21,289
DC+OT-001605+Nalm6	58239,22	366,83
DC+OT-002156 Носитель+Nalm6	70686,46	19,83
DC+OT-002156 +50мкМ ацетазоламида+Nalm6	76679,21	129,18

[0624] Секреция IL12 увеличена в супернатантах всех групп, кроме DC+OT-001990. Определяемые уровни гамма-интерферона наблюдались в DC+OT-001407+Nalm6; DC+OT-001605+Nalm6; DC+OT-002156 CAR+ Nalm6; и DC+OT-002156+50 мкМ ацетазамид+супернатанты Nalm6. Лиганд-зависимая регуляция IFN-гамма наблюдалась с OT-002156. Эти данные показывают, что активация Т-клеток, вызванная CAR, индуцирует зависимую от CD40L продукцию IL-12 аутологичными DC in vitro.

Пример 6. Уменьшение шеддинга с CD40L.

[0625] Для измерения эффекта экспрессии CD40L и шеддинга в результате замены сайта расщепления линкерной последовательностью клетки HEK293T временно трансфицировали контролем CD40L (OT-001661), CD40L, регулируемым CA2 (OT-001990), или CD40L-shed, регулируемым CA2 (OT-002172), и обрабатывали носителем (DMSO) или 10 мкМ ацетазоламида (ACZ) в течение 24 часов перед анализом среды для культивирования клеток с помощью ELISA на наличие растворимого CD40L. Как показано в Таблице 21, снижение шеддинга наблюдали, когда сайт расщепления был заменен линкерной последовательностью.

Таблица 21: Растворимый CD40L (sCD40L)

Описание	sCD40L (пг/мл)	
	Повтор 1	Повтор 2
OT-001661	2900	-
OT-001990+DMSO	1694,2	1534,5
OT-001990+10 мкМ ACZ	1728,8	1760,5
OT-002172+DMSO	160,8	144,3
OT-002172+10 мкМ ACZ	178,9	177,4

[0626] Кроме того, OT-001990 и OT-02172 трансфицировали в стабильно трансдуцированные клетки Jurkat, а затем клетки обрабатывали дозами ацетазоламида (ACZ) в течение 24 часов, и процент положительных CD40L+клеток и MFI показаны в

таблице 22.

Таблица 22: Процент положительных клеток CD40L и MFI через 24 часа

Процент CD40L+					MFI				
Доза ACZ, мкМ	OT-001990		OT-002172		Доза ACZ, мкМ	OT-001990		OT-002172	
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 1	Повтор 2		Повтор 1	Повтор 2	Повтор 1	Повтор 2
200	98,1	-	95,2	-	200	-	-	-	-
175	97,9	97,6	93,2	93,3	175	3101	3172	2248	2219
100	97,6	-	93,8	93,8	100	3101	3208	2102	2074
50	97,1	97,5	92,5	92,6	50	2885	2971	1974	2008
25	96,7	97,3	91,9	91,4	25	2570	2622	1796	1796
12,5	95,9	96	89,5	89,3	12,5	2176	2180	1475	1510
6,25	93,4	93,9	84,6	84,1	6,25	1586	1593	1110	1086
3,125	85,4	84,5	72,9	72,4	3,125	988	956	703	706
1,5625	63,2	62	48,1	48	1,5625	526	516	380	383
0,78125	22,4	22,9	17,8	18,1	0,78125	214	214	178	183
0,390625	4,1	4,4	4,7	4,8	0,390625	80,9	78	75,1	75,1
0,195313	1,9	1,6	1,5	1,4	0,195313	31,7	27,4	26	34,6
0,097656	0,9	1,0	0,8	0,9	0,097656	18,8	18,8	13	18,8
0,048828	0,8	1	0,6	0,5	0,048828	7,21	5,77	5,77	13

[0627] Хотя настоящее раскрытие было описано довольно подробно и с некоторой конкретностью в отношении нескольких описанных вариантов осуществления, не предполагается, что оно должно быть ограничено любыми такими подробностями или вариантами осуществления или каким-либо конкретным вариантом осуществления, но его следует истолковывать со ссылками на прилагаемую формулу изобретения, чтобы обеспечить максимально широкую интерпретацию такой формулы изобретения с учетом предшествующего уровня техники и, следовательно, эффективно охватить предполагаемый объем настоящего раскрытия.

[0628] Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, полностью включены посредством ссылки. В случае противоречия преимущественную силу имеет настоящее описание, включая определения. Кроме того, заголовки разделов, материалы, методы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Полипептид, содержащий эффекторный модуль, причем указанный эффекторный модуль содержит:

i) элемент ответа на стимулы (SRE), причем SRE содержит реагирующий на лекарственное средство домен (DRD), причем указанный DRD содержит карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO 5810) или ее область и дополнительно содержит одну или несколько мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 5810; и

ii) по меньшей мере один груз, который функционально связан с SRE, причем:

(a) груз содержит CD40L (SEQ ID NO 6) или его часть; или

(b) груз содержит CD40L (SEQ ID NO 6) или его часть, содержащую одну или несколько мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 6.

2. Полипептид по п. 1, причем DRD содержит мутацию H122Y в аминокислоте в позиции 122 (H122) SEQ ID NO 5810.

3. Полипептид по п. 2, причем DRD дополнительно содержит:

(i) мутацию R27L в аминокислоте в позиции 27 (R27) SEQ ID NO 5810;

(ii) мутацию T87I в аминокислоте в позиции 87 (T87) SEQ ID NO 5810;

(iii) мутацию N252D в аминокислоте в позиции 252 (N252) SEQ ID NO 5810; или

(iv) комбинацию (i) (ii) и/или (iii).

4. Полипептид по п. 1, причем DRD содержит мутацию E106D в аминокислоте в позиции 106 (E106) SEQ ID NO 5810.

5. Полипептид по п. 1, причем DRD содержит мутацию W208S в аминокислоте в позиции 208 (W208) SEQ ID NO 5810.

6. Полипептид по п. 4 или 5, причем DRD дополнительно содержит мутацию C205S в аминокислоте в позиции 205 (C205) SEQ ID NO 5810.

7. Полипептид по п. 1, причем DRD содержит мутацию I59N в аминокислоте в позиции 59 (I59) SEQ ID NO 5810.

8. Полипептид по п. 7, причем DRD дополнительно содержит мутацию G102R в аминокислоте в позиции 102 (G102) SEQ ID NO 5810.

9. Полипептид по п. 1, причем DRD содержит мутацию L156H в аминокислоте в позиции 156 (L156) SEQ ID NO 5810.

10. Полипептид по п. 9, причем DRD дополнительно содержит:

(i) мутацию W4Y в аминокислоте в позиции 4 (W4) SEQ ID NO 5810;

(ii) мутацию F225L в аминокислоте в позиции 225 (F225) SEQ ID NO 5810;

(iii) делецию аминокислот в позициях 257-260 SEQ ID NO 5810;

(iv) делецию аминокислот в позициях 1-5 SEQ ID NO 5810; или

(v) делецию аминокислот G234, E235 и P236 SEQ ID NO 5810.

11. Полипептид по п. 9, причем DRD содержит четыре мутации по сравнению с SEQ ID NO 5810, причем указанные мутации соответствуют:

(i) L156H, S172C, F178Y и E186D; или

(ii) D70N, D74N, D100N и L156H.

12. Полипептид по п. 1, причем DRD содержит первую мутацию и вторую мутацию по сравнению с SEQ ID NO 5810, причем:

(i) первая мутация представляет собой мутацию S73N в аминокислоте в позиции 73 (S73) SEQ ID NO 5810; а

(ii) вторая мутация представляет собой замену F или Y в аминокислотной позиции 89 (R89) SEQ ID NO 5810.

13. Полипептид по п. 1, причем DRD содержит замену N или F в аминокислотной позиции 56 (S56) SEQ ID NO 5810.

14. Полипептид по п. 13, причем DRD содержит мутацию S56N в аминокислоте в позиции 56 (S56) SEQ ID NO 5810.

15. Полипептид по п. 13, причем DRD содержит две замены по сравнению с SEQ ID NO 5810, которые соответствуют S56F и D71S.

16. Полипептид по п. 1, причем DRD содержит одну или несколько замен по сравнению с SEQ ID NO 5810, причем по меньшей мере одна замена представляет собой замену D или N в аминокислотной позиции 63 (G63) SEQ ID NO 5810, и при этом одна или несколько замен соответствуют:

G63D;

G63D и M240L;

G63D, E69V и N231I; или

T55K, G63N и Q248N.

17. Полипептид по п. 1, причем DRD содержит две или более замены по сравнению с SEQ ID NO 5810, причем одна, две или более замены представляют собой замену L или K в аминокислотной позиции 71 (D71) SEQ ID NO 5810, и при этом указанные две или более замены соответствуют:

D71L и T87N;

D71L и L250R;

D71L, T87N и L250R; или

D71K и T192F.

18. Полипептид по п. 1, причем DRD содержит две или более замены по сравнению с SEQ ID NO 5810, причем по меньшей мере одной, двумя или более заменами является:

(i) замена F в аминокислотной позиции 241 (V241) SEQ ID NO 5810; или

(ii) замена F или L в аминокислотной позиции 249 (P249) SEQ ID NO 5810; и

при этом две или более замены соответствуют:

D72F и V241F;

D72F и P249L;

D72F и P249F;

D72F, V241F и P249L;

A77I и P249F; или

V241F и P249L.

19. Полипептид по п. 1, причем DRD содержит одну или несколько замен по сравнению с SEQ ID NO 5810, выбранных из Y51T, L183S, Y193I, L197P и комбинации V134F и L228F.

20. Полипептид по любому из пп. 1-19, причем DRD содержит область CA2 человека, соответствующую аминокислотам 2-260 SEQ ID NO 5810.

21. Полипептид по любому из пп. 1-19, причем DRD содержит область CA2 человека, соответствующую полноразмерному CA2, содержащему аминокислоты 1-260 SEQ ID NO 5810.

22. Полипептид по любому из пп. 1-21, причем SRE реагирует на один или несколько стимулов.

23. Полипептид по п. 22, причем стимул представляет собой малую молекулу, причем малую молекулу выбирают из ацетазоламида, целекоксиба, вальдекоксиба, рофекоксиба, метазоламида, дорзоламида, бринзоламида, диклофенамида, этоксоламида, зонисамида, дансиламида или дихлорфенамида.

24. Полипептид по п. 23, причем малой молекулой является ацетазоламид.

25. Полипептид по любому из пп. 1-24, причем грузом является CD40L (SEQ ID NO б) или его часть, содержащая по меньшей мере одну мутацию.

26. Полипептид по любому из пп. 1-24, причем грузом является CD40L (SEQ ID NO б) или его часть, содержащая по меньшей мере две мутации, причем по меньшей мере две мутации выбирают из:

(i) H224G и G226F;

(ii) H224G и G226H;

(iii) Y172G и G226F;

(iv) H125 и G227;

(v) Y120G, H224G и G226W; и

(vi) S110G, F111G, E112S, M113G, Q114G и K115S.

27. Полипептид по любому из пп. 1-24, причем грузом является CD40L (SEQ ID NO: б).

28. Полипептид по любому из пп. 1-27, причем DRD расположен на N-конце груза.

29. Полипептид по любому из пп. 1-28, причем DRD отделен от груза линкером.

30. Полипептид по любому из пп. 1-29, причем эффекторный модуль дополнительно содержит сигнальный пептид, направляющий и/или проникающий пептид, линкер, белковую метку и/или сайт расщепления белка.

31. Композиция, содержащая полипептид по любому из пп. 1-30.

32. Полинуклеотид, кодирующий полипептид по любому из пп. 1-30, причем полинуклеотид представляет собой молекулу ДНК или молекулу РНК.

33. Полинуклеотид по п. 32, причем полинуклеотид является моноцистронным, бицистронным или мультицистронным.

34. Полинуклеотид по п. 33, причем полинуклеотид является бицистронным и кодирует второй полипептид, причем указанный второй полипептид содержит

иммунотерапевтическое средство, выбранное из антитела и его фрагментов и вариантов, Т-клеточного рецептора (TCR) и его вариантов, химерного антигенного рецептора (CAR), химерного рецептора-переключателя, ингибитора коингибиторного рецептора или лиганда, агониста костимулирующего рецептора и лиганда, цитокина, хемокина, цитокинового рецептора, хемокинового рецептора, продукта слияния цитокиновых рецепторов, растворимого фактора роста, метаболического фактора, гена самоубийства или хомингового рецептора.

35. Полинуклеотид по п. 33, причем полинуклеотид является мультицистронным и кодирует по меньшей мере два дополнительных полипептида, причем указанные по меньшей мере два дополнительных полипептида содержат иммунотерапевтическое средство, выбранное из антитела и его фрагментов и вариантов, Т-клеточного рецептора (TCR) и его вариантов, химерного антигенного рецептора (CAR), химерного рецептора-переключателя, ингибитора коингибиторного рецептора или лиганда, агониста костимулирующего рецептора и лиганда, цитокин, хемокин, цитокинового рецептора, хемокинового рецептора, продукта слияния цитокиновых рецепторов, растворимого фактора роста, метаболического фактора, гена самоубийства или хомингового рецептора.

36. Полинуклеотид по п. 34 или 35, причем второй полипептид или по меньшей мере два дополнительных полипептида функционально связаны со вторым SRE.

37. Полинуклеотид по п. 34 или 35, причем второй полипептид или по меньшей мере два дополнительных полипептида функционально не связаны ни с каким SRE.

38. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 32-37; причем, необязательно, вектор представляет собой вирусный вектор или плазмиду.

39. Вектор по п. 38, которым является вирусный вектор, и при этом вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, гамма-ретровирусный вектор, рекомбинантный AAV вектор, аденовирусный вектор или онколитический вирусный вектор.

40. Клетка, содержащая по меньшей мере одно из: эффекторного модуля по любому из пп. 1-30, полинуклеотида по любому из пп. 32-37 или вектора по п. 38 или 39.

41. Клетка, трансдуцированная или трансфицированная вектором по п. 38 или 39.

42. Клетка по п. 40 или 41, причем:

(i) указанной клеткой является иммунная клетка для адоптивного переноса клеток (ACT); или

(ii) указанной клеткой является CD8<sup>+</sup> Т-клетка, CD4<sup>+</sup> Т-клетка, хелперная Т-клетка, натуральная клетка-киллер (NK), NKT-клетка, цитотоксический Т-лимфоцит (CTL), инфильтрирующий опухоль лимфоцит (TIL), Т-клетка памяти, регуляторная Т-клетка (Treg), цитокин-индуцированная киллерная клетка (CIK), дендритная клетка, лимфокин-активированные клетки-киллеры (LAK), эмбриональные стволовые клетки человека, мезенхимальные стволовые клетки, гемопоэтическая стволовая клетка или их смесь.

43. Клетка по п. 42, причем указанную клетку модифицируют для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR) или антигенспецифического Т-клеточного

рецептора (TCR).

44. Клетка по п. 43, причем указанной клеткой является Т-клетка или NK-клетка.

45. Клетка, которая экспрессирует эффекторный модуль по любому из пп. 1-30 и/или содержит полинуклеотид по любому из пп. 32-37 и/или инфицирована, или трансфицирована вектором по п. 38 или 39, причем указанной клеткой является Т-клетка, модифицированная для экспрессии антигенспецифического Т-клеточного рецептора (TCR) или антигенспецифического химерного антигенного рецептора (CAR).

46. Фармацевтическая композиция, содержащая:

(i) полипептид по любому из пп. 1-30;

(ii) полинуклеотид по любому из пп. 32-37;

(iii) вектор по п. 38 или 39; или

(iv) клетку по любому из пп. 40-45; и

фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

47. Способ получения модифицированной клетки, причем указанный способ включает введение в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотид по любому из пп. 32-37.

48. Способ модулирования экспрессии, функции и/или уровня груза в клетке по любому из пп. 40-45, причем указанный способ включает введение в клетку стимула, причем SRE реагирует на стимул, и при этом экспрессия, функция и/или уровень по меньшей мере одного груза модулируется в ответ на стимул.

49. Способ лечения заболевания и/или индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, причем указанный способ включает:

(a) введение субъекту терапевтически эффективного количества любого из полипептидов по пп. 1-30, полинуклеотида по любому из пп. 32-37, вектора по п. 38 или 39, или клетки по любому из пп. 40-45; и

(b) введение субъекту терапевтически эффективного количества стимула, причем SRE реагирует на стимул, и при этом экспрессия по меньшей мере одного груза модулируется в ответ на стимул, чтобы тем самым лечить заболевание и/или индуцировать иммунный ответ.

50. Способ по п. 49, причем заболеванием является рак.

51. Способ по п. 49 или 50, причем стимул выбирают из ацетазоламида, целекоксиба, вальдекоксиба, рофекоксиба, метазоламида, дорзоламида, бринзоламида, диклофенамида, этосоламида, зонисамида, дансиламида или дихлорфенамида.

52. Сконструированная клетка, содержащая:

i) первый полинуклеотид, который кодирует первый полипептид, причем указанный первый полипептид содержит:

а. Первый элемент ответа на стимулы (SRE), причем первый SRE содержит реагирующий на лекарственное средство домен (DRD), причем указанный DRD содержит карбоангидразу 2 человека (CA2; SEQ ID NO 5810) или ее область и дополнительно содержит одну или несколько мутаций по сравнению с аминокислотной

последовательностью SEQ ID NO 5810; и

b. Первый груз, который функционально связан с первым SRE, причем: (I) первый груз содержит CD40L (SEQ ID NO 6) или его часть; или (II) первый груз содержит CD40L (SEQ ID NO 6) или его часть, содержащую одну или несколько мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 6; и

ii) второй полинуклеотид, который кодирует один или несколько дополнительных полипептидов, причем указанный один или несколько дополнительных полипептидов содержат иммунотерапевтическое средство, выбранное из группы, состоящей из: Т-клеточного рецептора (TCR) и его вариантов или химерного антигенного рецептора (CAR);

причем DRD и первый груз дестабилизированы в отсутствие первого стимула, и при этом DRD и первый груз стабилизированы в присутствии первого стимула, и один или несколько дополнительных полипептидов экспрессируются независимо от первого груза.

53. Сконструированная клетка по п. 52, причем первым грузом является:

a) CD40L (SEQ ID NO 6) или его часть, содержащая по меньшей мере одну мутацию; или

b) CD40L (SEQ ID NO 6) или его часть, содержащая по меньшей мере две мутации, причем необязательно по меньшей мере две мутации выбирают из:

(l) H224G и G226F;

(n) H224G и G226H;

(m) Y172G и G226F;

(IV) H125 и G227;

(v) Y120G, H224G и G226W; и

(vi) S110G, F111G, E112S, M113G, Q114G и K115S.

54. Сконструированная клетка по п. 52 или 53, причем один или несколько дополнительных полипептидов связаны со вторым SRE, содержащим второй DRD, причем второй DRD тот же самый или отличается от DRD в первом SRE, второй DRD и один или несколько дополнительных полипептидов дестабилизированы в отсутствие первого или второго стимула, и при этом второй DRD и один или несколько дополнительных полипептидов стабилизированы в присутствии первого или второго стимула.