(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2023.11.21

(21) Номер заявки

202190288

(22) Дата подачи заявки

2019.07.17

(51) Int. Cl. *C07K 14/705* (2006.01) **C07K 14/725** (2006.01) **C07K 16/28** (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01) **A61K 35/17** (2014.01) A61P 35/00 (2006.01)

СВЯЗЫВАЮЩИЙ Т-КЛЕТКУ С АНТИГЕНОМ АГЕНТ С РАЗЛИЧНОЙ ОПТИМИЗАЦИЕЙ КОНСТРУКЦИЙ

(31) 62/699,173; 62/703,037; 62/773,120; 62/826,853; 62/828,879; 62/839,235; 16/442,274; 62/874,426

(32) 2018.07.17; 2018.07.25; 2018.11.29; 2019.03.29; 2019.04.03; 2019.04.26; 2019.06.14; 2019.07.15

(33) US

(43) 2021.04.16

(86) PCT/US2019/042297

(87) WO 2020/018727 2020.01.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ТРИУМВИРА ИММЬЮНОЛОДЖИКС ЮЭсЭй, ИНК. (US); MAKMACTEPC ЮНИВЕРСИТИ (СА)

(72) Изобретатель:

Брэмсон Джонатан Лорн, Хелсен Кристофер В., Хэммилл Джоанн Алисия, Мваваси Кеннет Энтони (СА)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

US-A1-2016-0368964 US-A1-2016-0362472 (56) US-A1-2015-0322169 WO-A1-2013-092001

ALABANZA, L. et al., "Function of Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptors with Human Variable Regions Is Affected by Hinge and Transmembrane Domains', Molecular Therapy, 2017, Vol. 25, No. 11, pp. 2452-2465. See the whole document.

Изобретение относится к трифункциональной молекуле, содержащей (i) специфический для (57) мишени лиганд, (ii) лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, и (iii) полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора. Изобретение относится к вариантам молекулы, включая варианты, для которых показана оптимизированная поверхностная экспрессия, эффективность трансдукции и эффекторная функциональность. Варианты включают, например, различные лиганды, связывающие CD3-эпсилон (например, ОКТ3, L2K, F6A, UCHT1 и гуманизированный UCHT1), различные передающие сигналы домены и различные линкеры между доменами.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По изобретению испрашивается приоритет Предварительной заявки США No. 62/699173, поданной 17 июля 2018 г., предварительной заявки США No. 62/703037, поданной 25 июля 2018 г., предварительной заявки США No. 62/773120, поданной 29 ноября 2018 г., предварительной заявки США No. 62/826853, поданной 29 марта 2019 г., предварительной заявки США No. 62/828879, поданной 03 апреля 2019 г., предварительной заявки США No. 62/839235, поданной 26 апреля 2019 г., Обычной заявки США No. 16/442274, поданной 14 июня 2019 г., и предварительной заявки США No. 62/874426, поданной 15 июля 2019 г., полное содержание каждой из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

Список последовательностей

Изобретение содержит список последовательностей, который был подан в электронной форме в формате ASCII и полное содержание которого, таким образом, приведено в качестве ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 17 июля 2019 г., названа 55247704601 SL.txt и имеет размер 131072 байт.

Сущность изобретения

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к последовательностям нуклеиновой кислоты, кодирующим СD19-трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (CD19-TAC). В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая СD19-трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (CD19-TAC), содержит: (а) первый полинуклеотид, кодирующий лиганд, избирательно связывающий антиген CD19. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая СD19трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (CD19-TAC), содержит: (b) второй полинуклеотид, кодирующий лиганд UCHT1, связывающий CD3. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая СD19-трифункциональный связывающий Тклетку с антигеном агент (CD19-TAC), содержит: (c) третий полинуклеотид, кодирующий полипептид передающего сигналы домена ТСР, содержащий цитозольный домен и трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления, компоненты, кодируемые первым, вторым и/или третьим полинуклеотидами, соединены любым подходящим образом, например, в любом подходящим порядке и/или с содержанием любых пригодных линкера(линкеров). В некоторых вариантах осуществления, компоненты, кодируемые (а), компоненты, кодируемые (b), и компоненты, кодируемые (c), слиты непосредственно друг с другом, или соединены посредством по меньшей мере одного линкера. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, избирательно связывающий антиген CD19, представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления, лиганд, избирательно связывающий антиген CD19, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 представляет собой одноцепочечное антитело. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 содержит мутацию Y182T (SEQ ID NO: 72). В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 представляет собой гуманизированный вариант лиганда UCHT1 (huUCHT1) (SEO ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 представляет собой гуманизированный вариант UCHT1, содержащий мутацию Y177T (huUCHT1 (Y177T)) (SEQ ID NO: 46). В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления, цитозольный домен представляет собой цитозольный домен СD4, и трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD4. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, компонент, кодируемый посредством (а), и компонент, кодируемый посредством (с), слиты с компонентом, кодируемым посредством (b). В некоторых вариантах осуществления, компонент, кодируемый посредством (b), и компонент, кодируемый посредством (с), слиты с компонентом, кодируемым посредством (а). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один линкер соединяет компонент, кодируемый посредством (а), с компонентом, кодируемым посредством (b). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один линкер представляет собой гибкий линкер G4S (SEQ ID NO: 73), большой домен белка, структуру длинной спирали или структуру короткой спирали. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один линкер содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12 (гибкий линкер G4S ("G4S", описанный как SEQ ID NO: 73)), SEQ ID NO: 32 (большой домен белка), SEQ ID NO: 30 (структура длинной спирали) или SEQ ID NO: 28 (структура короткой спирали). В некоторых вариантах осуществления, CD3 происходит из комплекса TCR на клетке, экспрессирующей второй полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, связывание CD3 индуцирует активацию клетки, экспрессирующей второй полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует активирующий домен.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к векторным конструкциям, содержащим: (а) последовательность нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем описании (например, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CD19-TAC); и (b) промотор, функциональный в клетке млекопитающего.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к Т-клеткам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем описании (например, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CD19-TAC).

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащем Т-клетку, описанную в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли, экспрессирующей CD19, у нуждающегося в этом индивидуума, включающим введение индивидууму фармацевтической композиции, описанной в настоящем описании, (например, фармацевтической композиции, содержащей Т-клетку, содержащую любую последовательность нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем описании, такую как любые последовательность или последовательности нуклеиновой кислоты, описанные в настоящем описании как кодирующие CD19-трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (CD19-TAC)). В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой В-клеточную лимфому, острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) или неходжкинскую лимфому. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическую композицию вводят трансартериально, подкожно, внутрикожно, внутрь опухоли, внутрь узлов, интрамедуллярно, внутримышечно, внутривенно или внутрибрюшинно.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (три-ТАС), содержащей: (а) первый полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд; (b) второй полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом ТСК; и (с) третий полинуклеотид, кодирующий полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора; где лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом ТСR, выбран из ОКТ3, F6A или L2K. В некоторых вариантах осуществления, компонент, кодируемый посредством (а), компонент, кодируемый посредством (b), и компонент, кодируемый посредством (c), слиты непосредственно друг с другом или соединены посредством по меньшей мере одного линкера. В некоторых вариантах осуществления, компонент, кодируемый посредством (а), и компонент, кодируемый посредством (b), непосредственно связаны и соединены с компонентом, кодируемым посредством (с), посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления, компонент, кодируемый посредством (b), и компонент, кодируемый посредством (с), непосредственно связаны и соединены с компонентом, кодируемым посредством (а), посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один линкер представляет собой гибкий линкер G4S (SEQ ID NO: 73), большой домен белка, структуру длинной спирали или структуру короткой спирали. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один линкер имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12 (гибкий линкер G4S ("G4S", описанный как SEQ ID NO: 73)), SEQ ID NO: 32 (большой домен белка), SEQ ID NO: 30 (структура длинной спирали) или SEQ ID NO: 28 (структура короткой спирали). В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом ТСР, представляет собой ОКТ3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом ТСР, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом ТСR, представляет собой F6A. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом ТСР, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой L2K. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой СD3. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд избирательно связывает антиген опухоли. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой сконструированный полипептид с анкириновым повтором (DARPin) или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд избирательно связывает антиген CD19, антиген HER2 или антиген BCMA. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд, избирательно связывающий антиген HER-2, содержит антигенсвязывающий домен антитела, выбранного из трастузумаба, пертузумаба, лапатиниба, нератиниба, адо-трастузумаба эмтанзина, ганкотамаба, маргетуксимаба, тимигутузумаба и эртумаксомаба. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд, избирательно связывающий антиген ВСМА, содержит антигенсвязывающий домен антитела, выбранного из белантамаба мафодотина и GSK2857916. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора содержит цитозольный домен и трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления, цитозольный домен представляет собой цитозольный домен CD4, и трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD4, или при этом цитозольный домен представляет собой цитозольный домен СD8, и трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD8. В некоторых вариантах осуществления, последовательности нуклеиновой кислоты дополнительно содержат лидерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления, CD3 происходит из комплекса TCR на клетке, экспрессирующей второй полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, связывание СD3 индуцирует активацию клетки, экспрессирующей второй полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98. по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60 или SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует активирующий домен.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (три-TAC), содержащий: (а) первый полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд; (b) второй полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом ТСR; и (c) третий полинуклеотид, кодирующий полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора; где последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит лидерную последовательность, и где компонент, кодируемый посредством (а), компонент, кодируемый посредством (b), и компонент, кодируемый посредством (с), слиты непосредственно друг с другом или соединены посредством по меньшей мере одного линкера. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд избирательно связывает антиген опухоли. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой сконструированный полипептид с анкириновым повтором (DARPin) или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд избирательно связывает антиген CD19, антиген HER2 или

антиген ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд, избирательно связывающий антиген HER-2, содержит антигенсвязывающий домен антитела, выбранного из трастузумаба, пертузумаба, лапатиниба, нератиниба, адо-трастузумаба эмтанзина, ганкотамаба, маргетуксимаба, тимигутузумаба и эртумаксомаба. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд, избирательно связывающий антиген ВСМА, содержит антигенсвязывающий домен антитела, выбранного из белантамаба мафодотина и GSK2857916. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом ТСR, выбран из UCHT1, UCHT1 (Y182T), huUCHT1, huUCHT1 (Y177T), OKT3, F6A или L2K. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом ТСR, имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, белок, ассоциированный с комплексом ТСР, представляет собой СОЗ. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора содержит цитозольный домен и трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления, цитозольный домен представляет собой цитозольный домен CD4, и трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен СD4, или при этом цитозольный домен представляет собой цитозольный домен CD8, и трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD8. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления, компонент, кодируемый посредством (а), и компонент, кодируемый посредством (b), непосредственно связаны и соединены с компонентом, кодируемым посредством (с), посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления, компонент, кодируемый посредством (b), и компонент, кодируемый посредством (c), непосредственно связаны и соединены с компонентом, кодируемым посредством (а), посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один линкер представляет собой гибкий линкер G4S (SEQ ID NO: 73), большой домен белка, структуру длинной спирали или структуру короткой спирали. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один линкер имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12 (гибкий линкер G4S ("G4S", описанный как SEQ ID NO: 73)), SEQ ID NO: 32 (большой домен белка), SEQ ID NO: 30 (структура длинной спирали) или SEQ ID NO: 28 (структура короткой спирали). В некоторых вариантах осуществления, CD3 происходит из комплекса ТСР на клетке, экспрессирующей второй полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, связывание СD3 индуцирует активацию клетки, экспрессирующей второй полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60 или SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует активирующий домен.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к полипептидам, кодируемым посредством последовательности нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем описании.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к векторным конструкциям, содержащим: (а) последовательность нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем описании; и (b) промотор, функциональный в клетке млекопитающего.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к Т-клеткам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем описании.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим Т-клетку, описанную в настоящем описании, и фармацевтически приемле-

мый наполнитель.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом индивидуума, включающим введение индивидууму фармацевтической композиции, описанной в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой солидную злокачественную опухоль или жидкую злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак легкого, рак молочной железы, множественную миелому, глиобластому, рак желудка, рак яичника, рак желудка, колоректальный рак, рак уротелия, рак эндометрия, или рак ободочной кишки. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль содержит экспрессирующую СD19 клетку злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой Вклеточное злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой В-клеточную лимфому, острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) или неходжкинскую лимфому. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль содержит экспрессирующую HER-2 клетку злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак яичника или рак желудка. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль содержит экспрессирующую ВСМА клетку злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой лейкоз, лимфому или множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическую композицию вводят индивидууму трансартериально, подкожно, внутрикожно, внутрь опухоли, внутрь узлов, интрамедуллярно, внутримышечно, внутривенно или внутрибрюшинно. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция находится в форме единичной дозы. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция содержит приблизительно 0,5-2×10⁹ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическую композицию вводят ежесуточно, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, раз в два месяца или ежегодно.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей СD19-трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (CD19-TAC), содержащий: (а) первый полинуклеотид, кодирующий лиганд, избирательно связывающий антиген CD19; (b) второй полинуклеотид, кодирующий гуманизированный вариант лиганда UCHT1 (huUCHT1), содержащий мутацию Y177T (huUCHT1 (Y177T)), связывающий CD3; и (c) третий полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий цитозольный домен CD4 и трансмембранный домен CD4; где лиганд, кодируемый посредством (а), лиганд, кодируемый посредством (b), и полипептид, кодируемый посредством (с), слиты непосредственно друг с другом, или соединены посредством по меньшей мере одного линкера. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует костимулирующий домен, активирующий домен или как костимулирующий домен, так и активирующий домен. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, избирательно связывающий антиген CD19, представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления, лиганд, избирательно связывающий антиген CD19, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, избирательно связывающий антиген CD19, содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCHT1 (Y177T) представляет собой одноцепочечное антитело. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCHT1 (Y177T) содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCHT1 (Y177T) содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один линкер представляет собой гибкий линкер G_4S , большой домен белка, структуру длинной спирали или структуру короткой спирали. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один линкер содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один линкер содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления, CD3 экспрессирован на клетке, экспрессирующей второй полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления вариантах осуществления мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления мере 90% или по меньшей мере 90% или по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления мере 90% или по меньшей ме

вления, CD19-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит последовательность из SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 64. В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к векторным конструкциям, содержащим: (а) последовательность нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем описании; и (b) промотор, функциональный в клетке млекопитающего. В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим вектор, описанный в настоящем описании, и наполнитель. В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к полипептидам, кодируемым посредством последовательности нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем описании.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к последовательностям нуклеиновой кислоты, кодирующим НЕR2-трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (HER2-TAC), содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68 или SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует активирующий домен.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к последовательностям нуклеиновой кислоты, кодирующим ВСМА-трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (ВСМА-ТАС), содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления, ВСМА-ТАС содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99 или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, или SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты не кодирует активирующий домен.

Краткое описание чертежей

Новые признаки изобретения конкретно указаны в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения можно получить со ссылкой на следующее подробное описание, в котором указаны иллюстративные варианты осуществления, в которых использованы принципы изобретения, и на сопутствующие чертежи, в которых:

- Фиг. 1А представляет собой схему природной активации Т-клетки.
- Фиг. 1В представляет собой схему основанной на CAR активации Т-клетки.
- Фиг. 1С представляет собой схему основанной на трифункциональном связывающем Т-клетку с антигеном агенте (три-TAC) активации Т-клетки.
 - Фиг. 1D представляет собой схему природной активации Т-клетки.
 - Фиг. 1E представляет собой схему основанной на CAR активации Т-клетки.
 - Фиг. 1F представляет собой схему основанной на три-ТАС активации Т-клетки.
- Фиг. 2A представляет собой схему конфигурации три-TAC с доменом UCHT1 в центре между трансмембранным доменом (TM) и антигенсвязывающим доменом.
- Фиг. 2В представляет собой схему конфигурации три-ТАС, в которой домен UCHT1 находится на N-конце, за ним следуют антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен.
- Фиг. 2C представляет собой схему молекулы три-TAC с типичным антигенсвязывающим доменом и доменом UCHT1.
 - Фиг. 3А представляет собой схему молекулы три-ТАС с типичным антигенсвязывающим доменом.
- Фиг. 3В представляет собой схему три-ТАС с антигенсвязывающим доменом DARPin против HER-2.
 - Фиг. 3C представляет собой схему три-TAC с антигенсвязывающим доменом scFv против CD19.
 - Фиг. 3D представляет собой схему три-TAC с антигенсвязывающим доменом scFv против BCMA.
- Фиг. 3E представляет собой схему молекулы три-TAC с антигенсвязывающим доменом DARPin против HER-2.
- Фиг. 3F представляет собой схему молекулы три-TAC с антигенсвязывающим доменом scFv против BCMA.
 - Фиг. 4A-4D иллюстрируют Т-клетки, модифицированные с использованием три-TAC или CAR на

основе CD28, нацеленных против HER-2 с использованием DARPin. Фиг. 4A иллюстрирует поверхностную экспрессию три-TAC и CAR, по сравнению с Т-клетками, не экспрессирующими химерного рецептора. Фиг. 4B иллюстрирует рост трех популяций клеток. Фиг. 4C, 4D иллюстрируют процент модифицированных клеток, положительных по различным маркерам активации Т-клетки, после стимуляции антигеном.

Фиг. 5 иллюстрирует модель структуры белка CD19-TAC.

Фиг. 6A-6J иллюстрируют поверхностную экспрессию рецептора и активацию различных контрольных DARPin против HER-2-три-TAC. Т-клетки были модифицированы с использованием варианта три-TAC, лишенного нацеливающего элемента (-DARPin), варианта три-TAC, лишенного UCHT1 (-UCHT1), или полноразмерного три-TAC. Фиг. 6A, 6D, 6G иллюстрируют трансдукцию Т-клетки и способность связывания Her2 (слева); фиг. 6B, 6E, 6H - дегрануляцию (в середине), и фиг. 6C, 6F, 6I - продукцию цитокинов (справа). Фиг. 6J иллюстрирует, что только полноразмерный DARPin против HER-2-три-TAC является способным вызывать цитотоксический ответ.

Фиг. 7А-7С иллюстрируют противоопухолевую активность, токсичность и продукцию цитокинов для Т-клеток, модифицированных с использованием либо DARPin против HER-2-три-ТАС, либо DARPin против HER-2-САR на основе CD28. Мышей, несущих развившиеся опухоли OVCAR-3, подвергали лечению с использованием Т-клеток, модифицированных с использованием DARPin против HER-2-три-ТАС или DARPin против HER-2-САR. Фиг. 7А иллюстрирует изменение роста опухоли, относительно суток инфузии Т-клеток (сутки 35). Фиг. 7В иллюстрирует изменение массы, показатель токсичности, у тех же самых мышей. Фиг. 7С иллюстрирует концентрации цитокинов в сыворотке мышей на сутки 7 после инфузии Т-клеток.

Фиг. 8А-8Н иллюстрируют три-ТАС, сконструированные с различными альтернативами домену привлечения UCHT1 scFv-CD3. Фиг. 8A обеспечивает схематическое представление конструкций рецептора TAC с использованием DARPin против HER-2, в паре либо с UCHT1, либо с OKT3 scFv против CD3. фиг. 8В иллюстрирует поверхностную экспрессию HER-2-TAC для CD8+ NGFR+ (слева) или CD4+ NGFR+ Т-клеток (справа). Фиг. 8C, 8C1 иллюстрируют продукцию цитокинов специфическими для HER-2 TAC-Т-клетками, стимулированными положительными по антигену клетками опухоли SK-OV-3. Фиг. 8D иллюстрирует уничтожение клеток опухоли SK-OV-3 посредством Т-клеток с HER-2-TAC и контрольным вектором (вектором, несущим только tNGFR). Т-клетки с контрольным вектором (круги) сравнивают со специфическими для HER-2 TAC-Т-клетками, несущими UCHT1 (квадраты) или ОКТ3 (треугольники). Фиг. 8Е обеспечивает схематическое представление конструкций рецептора ТАС с использованием scFv против CD19, в паре с huUCHT1, F6A, или L2K scFv против CD3. Фиг. 8F иллюстрирует поверхностную экспрессию CD19-TAC для CD8+ NGFR+ (слева) или CD4+ NGFR+ Т-клеток (справа). Фиг. 8G, 8G1 иллюстрируют продукцию цитокинов специфическими для CD19 TAC-Т-клетками, стимулированными положительными по антигену клетками опухоли Raji. Продуцирующие цитокины клетки сравнивают из числа ТАС-Т-клеток, несущих huUCHT1 (квадраты), F6A (треугольники), или L2K (ромбы). Фиг. 8Н иллюстрирует уничтожение клеток опухоли NALM-6 посредством Т-клеток с CD19-ТАС и контрольным вектором (вектором, несущим только tNGFR). Т-клетки с контрольным вектором (круги) сравнивают со специфическими для CD19 TAC-T-клетками, несущими huUCHT1 (квадраты), F6A (треугольники) или L2K (ромбы).

Фиг. 9А-9Н иллюстрирует эффект различных scFv против CD3 на поверхностную экспрессию TCR. Фиг. 9А, 9Е иллюстрируют поверхностную экспрессию TCR для Т-клеток, модифицированных с использованием контрольного вектора (tNGFR), UCHT1 или вариантов ОКТ3 TAC. Фиг. 9В, 9F показывают, что Т-клетки, модифицированные с использованием ОКТ3-TAC, имеют значимо уменьшенную поверхностную экспрессию TCR, по сравнению с UCHT1-TAC. Фиг. 9С, 9G иллюстрируют поверхностную экспрессию TCR для Т-клеток, модифицированных с использованием контрольного вектора (tNGFR), вариантов TAC huUCHT1, F6A или L2K. Фиг. 9D, 9H показывает, что Т-клетки, модифицированные с использованием L2K TAC, имеют значимо уменьшенную поверхностную экспрессию TCR, по сравнению с huUCHT1-TAC.

Фиг. 10A, 10B иллюстрируют варианты домена соединителя. Домен, соединяющий антигенсвязывающий домен с доменом привлечения TCR, называют доменом соединителя. На фиг. 10A представлена схема вариантов TAC с различными доменами соединителя: (i) гибкий соединитель, (ii) соединитель с большим доменом (сконструированный из доменов 3 и 4, происходящих из внеклеточного домена CD4), (iii) соединитель с длинной спиралью и (iv) соединитель с короткой спиралью. На фиг. 10B представлена иллюстративная аминокислотная последовательность доменов, представленных на фиг. 10A. (SEQ ID NO 69, 28, 30 и 32, соответственно, в порядке упоминания)

Фиг. 11А-11Е иллюстрируют иллюстративные параметры in vitro CD19-TAC, сконструированного с различными вариантами соединителя. Фиг. 11А иллюстрирует поверхностную экспрессию варианта ТАС в CD4 и CD8 клетках. Фиг. 11В иллюстрирует поверхностную экспрессию TAC, содержащего гибкие соединители, по сравнению с TAC, содержащим соединители со спиралью или с большим доменом. Фиг. 11С иллюстрирует общую трансдукцию TAC, содержащего альтернативные соединители, по сравнению с гибким соединителем. Фиг. 11D, 11Е иллюстрируют относительную реакционную способность клеток

по отношению к положительным по антигену клеткам Raji.

Фиг. 12A иллюстрирует цитотоксичность in vitro вариантов BCMA три-TAC, сконструированных с использованием различных соединителей. Фиг. 12B иллюстрирует контроль опухоли in vivo для вариантов BCMA-три-TAC, сконструированных с использованием гибкого соединителя, по сравнению с соединителем с короткой спиралью.

Фиг. 13A-13C иллюстрируют свойства CD8α-три-TAC-scFv против HER-2 и CD8α-три-TAC-DARPin против HER-2. Фиг. 13A, 13C иллюстрируют поверхностную экспрессию. Фиг. 13B иллюстрирует продукцию цитокинов.

На фиг. 14А-14D представлены схемы вариантов CD8-три-TAC. DARPin против HER-2 используют в качестве иллюстративного антигенсвязывающего домена, и домен привлечения UCHT1 CD3 используют в качестве иллюстративного домена привлечения. Фиг. 14А иллюстрирует три-TAC, содержащий трансмембранный и цитозольный домен CD4 (слева), и сравнимые области гетеродимера CD8α/CD8β (справа). Ключевые области для функциональности корецептора (богатый аргинином домен и мотив СХСР) выделены. Фиг. 14В представляет собой схему CD8α-три-TAC, содержащего мутацию цистеина до серина, для обеспечения распространения мономерного рецептора, и цитозольный домен CD8α. Фиг. 14С представляет собой схему CD8α+Rβ три-TAC, содержащего мутацию цистеина до серина, для обеспечения распространения мономерного рецептора, и химерный цитозольный домен CD8α, где богатая аргинином область CD8α заменена на богатую аргинином область CD8β. Фиг. 14D представляет собой схему CD8β+Lck-три-TAC, содержащего мутацию цистеина до серина, для обеспечения распространения мономерного рецептора, и химерный цитозольный домен CD8β, где домен CXCP CD8α, содержащий связывающий Lck мотив, добавлен к C-концу цитозольного домена CD8β.

Фиг. 15A-15E иллюстрируют характеризацию in vitro вариантов CD8-три-TAC, по сравнению с прототипическим три-TAC, содержащим области CD4. Фиг. 15A-15B иллюстрируют поверхностную экспрессию вариантов CD8-три-TAC, по сравнению с прототипическим три-TAC. Фиг. 15C иллюстрирует цитотоксичность in vitro вариантов CD8-три-TAC при совместном культивировании с LOX IMVI (отрицательными по HER-2), или A549, SKOV3, SKBR3 или MBA MB 231 (положительными по HER-2). Фиг. 15D иллюстрирует деление клеток для Т-клеток, модифицированных с использованием либо вариантов CD8-три-TAC, либо прототипического три-TAC. Фиг. 15E иллюстрирует поверхностную экспрессию TCR для модифицированных Т-клеток, содержащих варианты CD8-три-TAC или прототипический три-TAC.

Фиг. 16 иллюстрирует различные три-ТАС.

Фиг. 17 иллюстрирует вставку TAC-CD19 в лентивирусный вектор рССL. Фиг. 17 иллюстрирует различные домены TAC-CD19 (лидер CD8a, FMC63 scFv, метку Мус, мутант Y177T huUCHT1 и укороченный якорный домен корецептора CD4).

Фиг. 18 иллюстрирует эффективность in vivo TAC-CD19, полученного от различных доноров.

Фиг. 19А-19С иллюстрирует пример цитотоксичности in vitro TAC-CD19 против линий опухолей. Фиг. 19A NALM-6 (острый лимфобластный лейкоз), фиг. 19B Jeko-1 (лимфома из клеток мантийной зоны) и фиг. 19C Raji (лимфома Беркитта).

Фиг. 19D иллюстрирует схему 3 различных моделей in vivo на мышах NRG.

Фиг. 19Е-19G иллюстрируют эффективность in vivo CD19-TAC для NALM-6 (острый лимфобластный лейкоз) фиг 19Е, Jeko-1 (лимфома из клеток мантийной зоны) фиг. 19F и Raji (лимфома Беркитта) фиг. 19G.

Фиг. 20А иллюстрирует разработку эксперимента для подвергнутых лечению посредством ТАС-CD19 мышей с опухолью NALM-6. После успешного лечения мышей затем повторно заражали клетками опухолей либо NALM-6 (положительными по CD19), либо KMS11 (отрицательными по CD19).

Фиг. 20В иллюстрирует эффективность in vivo для мышей, подвергнутых лечению с использованием TAC-CD19.

Фиг. 21А иллюстрирует дизайн эксперимента для оценки режима дозирования и влияния дозирования на эффективность и размножение клеток.

Фиг. 21В иллюстрирует выживаемость in vivo несущих NALM-6 мышей, подвергнутых лечению с использованием либо однократной, либо дробной дозы TAC-CD19.

Фиг. 22A, 22B иллюстрируют разработку эксперимента и данные, применительно к размножению in vivo TAC-CD19 после введения дробной дозы. Фиг. 22A иллюстрирует способ отбора, используемый для идентификации Т-клеток в крови мыши. Фиг. 22B иллюстрирует результаты in vivo для размножения Т-клеток в крови.

Фиг. 23А-23С иллюстрируют длительные исследования in vivo TAC-CD19 у мышей. Фиг. 23А иллюстрирует способ эксперимента для несущих NALM-6 мышей, подвергнутых лечению с использованием различного контроля и TAC-CD19 на двух уровнях дозирования. Фиг. 23В иллюстрирует эффективность in vivo для контрольных групп, по сравнению с группами лечения TAC-CD19 на двух уровнях дозирования. Фиг. 23С иллюстрирует длительную выживаемость мышей, подвергнутых лечению низкой дозой TAC-CD19.

Фиг. 24 иллюстрирует результаты анализа клинической химии для мышей, подвергнутых лечению с использованием трансдуцированных TAC-CD19 или нетрансдуцированных T-клеток.

Фиг. 25 иллюстрирует высвобождение цитокинов в крови мышей после лечения с использованием TAC-CD19 или нетрансдуцированных Т-клеток.

Фиг. 26А-26С иллюстрирует эффективность BCMA-TAC в различных конфигурациях. Фиг. 26А иллюстрирует дизайн эксперимента. Фиг. 26В иллюстрирует различные контрольные и тестируемые вещества. Фиг. 26С иллюстрирует эффективность in vivo различных конструкций TAC. Фиг. 26А-26С описывают "G4S" как SEQ ID NO: 73.

Фиг. 27 иллюстрирует, что ТАС осуществляют пролиферацию, когда сталкиваются с антигеном на клетках, но не когда антиген представлен на искусственных бусинах; но CAR осуществляют пролиферацию, независимо от того, представлены ли антигены на бусинах или клетках.

Фиг. 28A, 28В иллюстрируют, что модифицированные посредством ТАС Т-клетки размножаются in vivo и обеспечивают длительную защиту, показывая персистенцию клеток в модели миеломы. Фиг. 28A-28В иллюстрируют, что ВСМА-ТАС-Т-клетки приводят к отторжению опухоли множественной миеломы в модели ксенотрансплантата КМS-11, сконструированной с использованием NanoLuc (КМS 11-NanoLuc) (ВСМА^{пол}). После приживления опухоли, мышей подвергали лечению с использованием ВСМА-ТАС-Т-клеток (несущих люциферазу светляка). ТАС-Т-клетки значительно размножались после введения. Это коррелирует с регрессией опухоли. Подвергнутые лечению мыши являлись устойчивыми к повторному заражению опухолью, что указывает на длительную персистенцию ТАС-Т-клеток.

Фиг. 29 иллюстрирует высвобождение цитокинов человека в крови мышей после лечения с использованием TAC-CD19 или нетрансдуцированных Т-клеток.

На фиг. 30 показаны иллюстративные гистограммы поверхностной экспрессии рецептора ТАС на CD4 и CD8 модифицированных Т-клетках. Клетки были модифицированы с использованием muIgG-HER2-TAC (промотор EF1 α), huIgG-HER2-TAC (промотор MSCV) и muIgG-HER2-TAC (промотор MSCV). После модификации, Т-клетки окрашивали с использованием специфического для ТАС реагента и измеряли с использованием проточной цитометрии. Для всех конструкций показаны сравнимые уровни поверхностной экспрессии, где управляемая EF1 α экспрессия являлась более высокой, по сравнению с конструкциями с MSCV.

Фиг. 31 иллюстрирует относительный процент Т-клеток, экспрессирующих $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ или IL-2, после совместного культивирования с клетками либо OVCAR3 (положительными по HER2 positive), либо LOX EMVI (отрицательными по HER2). Т-клетки были модифицированы с использованием muIgG-HER2-TAC (промотор $EF1\alpha$), конструкции TAC, лишенной связывающего HER2 домена (Δ связывающий домен TAC; промотор $EF1\alpha$), huIgG-HER2-TAC (промотор MSCV) или muIgG HER2 TAC (промотор MSCV). При совместном культивировании с LOX-IMVI (HER2 $^{\text{отр}}$), для контроля Δ связывающий домен TAC и клеток с HER2-TAC при совместном культивировании с OVCAR3(HER2 $^{\text{пол}}$) показана сходная способность к продукции цитокинов, в то время как для контрольных T-клеток, сконструированных с Δ связывающий домен TAC, не показано значительной продукции цитокинов.

Фиг. 32 иллюстрирует эффективность in vivo модифицированных посредством ТАС Т-клеток в модели солидной опухоли OVCAR3. Т-клетки были модифицированы с использованием Δ связывающий домен ТАС (промотор EF1 α), mulgG-HER2-TAC (промотор EF1 α), hulgG-HER2-TAC (промотор MSCV) или mulgG-HER2-TAC (промотор MSCV). Мышам инокулировали подкожно опухоли OVCAR3 (положительные по HER-2). Их выращивали до размера приблизительно 100 мм³. Затем мышей подвергали лечению с использованием дробной дозы всего 6 миллионов модифицированных с использованием HER2-TAC, или контрольных Т-клеток с Δ связывающий домен ТАС, с интервалом 48 ч, посредством инъекции в хвостовую вену. Прогрессирование опухоли отслеживали посредством измерений раз в две недели. Для Δ связывающий домен ТАС не показано контроля опухоли или регрессии опухоли. Для всех модифицированных с использованием HER2-TAC Т-клеток показано значительно уменьшенное прогрессирования опухоли, включая регрессию опухоли, по сравнению с контрольными мышами. Все модифицированные с использованием HER2-TAC Т-клетки имели сходную противоопухолевую активность.

Подробное описание

Злокачественная опухоль представляет собой основную проблему здравоохранения, с ожидаемой диагностикой более чем 150000 случаев злокачественных опухолей, только в Канаде. В то время как пациентов с заболеванием на ранних стадиях иногда эффективно лечат посредством общепринятых видов терапии (хирургии, радиации, химиотерапии), мало возможностей являются доступными для пациентов с заболеванием на поздних стадиях, и эти возможности, как правило, имеют паллиативный характер.

Активная иммунотерапия ориентирована на использование иммунной системы пациента для клиренса опухолей и предлагает возможность для пациентов, для которых общепринятые виды терапии оказались неудачными. Как правило, это лечение включает инфузию пациентам больших количеств специфических для опухоли Т-клеток. Доказано, что этот способ является успешным в ранней фазе клинических исследований для ряда заболеваний, включая меланому, миелому, лейкоз, лимфому и синовиаль-

ную саркому. В качестве конкретного примера, в нескольких клинических исследованиях показано, что иммунотерапия Т-клетками является излечивающей у пациентов с меланомой на поздних стадиях, подтверждая полезность этого способа. Кроме того, пациентов, страдающих хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL) и острым лимфобластным лейкозом (ALL), также эффективно лечили и излечивали с помощью иммунотерапии Т-клетками.

Ключевой проблемой, стоящей перед клиническим применением адоптивной Т-клеточной терапии является источник Т-клеток. Как правило, Т-клетки, выделенные от несущего опухоль пациента, выращивают до больших количеств ех vivo и вводят обратно пациенту для индукции надежного противоопухолевого иммунного ответа. Специфичности для опухоли достигают посредством любого из: (i) выделения природных специфических для опухоли Т-клеток от пациента; или (ii) модификации множества Т-клеток из периферической крови для экспрессии специфических для опухоли рецепторов. Природные специфические для опухоли Т-клетки являются редкими, и выделение таких клеток в терапевтических количествах от пациентов со злокачественными опухолями является трудоемким и дорогостоящим способом. В отличие от этого, становится более эффективной модификация легко доступных периферических Т-клеток с использованием специфических для опухоли рецепторов, посредством генетической манипуляции. Для этого процесса модификации разработаны способы, которые являются клинически осуществимыми, и в нескольких клинических исследованиях показана целесообразность и эффективность генетически модифицированных Т-клеток для лечения злокачественной опухоли.

До настоящего времени, большинство видов терапии модифицированными Т-клетками, включающие генетическую модификацию Т-клеток, приводили к: (i) усиленной экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR); или (ii) химерного рецептора антигена (CAR), специфического для антигенных мишеней на опухоли. До настоящего времени, химерные рецепторы антигенов, использованные для модификации Т-клеток, состояли из: (i) нацеливающего домена, обычно одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv); (ii) трансмембранного домена; и (iii) цитозольного домена, содержащего передающие сигналы элементы из Т-клеточного рецептора и ассоциированных белков. Такие химерные рецепторы антигенов также обозначены как "Т-тельце" или "химерный иммунный рецептор" (CIR), однако, в настоящее время, большинство исследователей используют термин "CAR". Одним преимуществом способа CAR является то, что он позволяет нацеливать любые иммуноциты пациента против любой желательной мишени независимым от главного комплекса гистосовместимости (МНС) образом. Это является привлекательным, поскольку представление МНС часто является дефектным в клетках опухолей.

САR рассматривают в модульных терминах, и ученые потратили значительное время на исследование влияния различных цитоплазматических передающих сигналы доменов на функцию CAR. Общепринятые CAR, как правило, разделяют два главных компонента: (i) цитоплазматический домен CD3-дзета, содержащий иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM), критические для активации Т-клетки; и (ii) компоненты костимулирующих рецепторов, запускающие важные пути выживания, такие как путь Akt.

В САR первого поколения используют один передающий сигналы домен либо из CD3 ζ , либо из FceRI γ . В САR второго поколения объединяют передающий сигналы домен из CD3 ζ , с цитоплазматическим доменом костимулирующих рецепторов из семейства рецепторов либо CD28, либо TNFR. В большинстве модифицированных посредством САR Т-клеток, тестируемых в настоящее время в клинике, используют САR второго поколения, в которых CD3 ζ , соединен с цитоплазматическим доменом либо из CD28, либо из CD137. Для этих САR второго поколения показана противоопухолевая активность для положительных по CD19 опухолей. В САR третьего поколения объединены множество костимулирующих доменов, но существует опасение, что САR третьего поколения могут терять специфичность для антигена.

В то время как показано, что модифицированные посредством CAR Т-клетки являются многообещающими в клиническом применении, они основаны на синтетическом способе замены природного сигнала активации, обеспечиваемого Т-клеточным рецептором (TCR). Поскольку этот синтетический рецептор не доставляет все передающие сигналы компоненты, ассоциированные с TCR (например, ITAM на CD3 γ , CD38, CD3 ϵ), остается неясным, оптимально ли Т-клетки активируются посредством CAR, или каким образом активация CAR влияет на дифференцировку Т-клетки (например, прогрессирование до клетки памяти). Кроме того, поскольку передающие сигналы домены CAR оторваны от своих природных регуляторных партнеров, по самому характеру структуры CAR, существует присущий им риск того, что CAR могут приводить к низкому уровню конститутивной активации, что может приводить к неспецифической токсичности. Таким образом, синтетический характер прототипического CAR может нарушать канонические механизмы, ограничивающие активацию TCR, и может лежать в основе тяжелой токсичности, часто ассоциированной с общепринятыми CAR-Т-клетками.

Принимая во внимание эти ограничения, является предпочтительным перенацеливать Т-клетки для атаки на опухоли посредством их природного TCR. С этой целью, создан класс рекомбинантных белков, названных "привлекающими Т-клетки биспецифическими активаторами" (ВiTE). Эти белки используют фрагменты биспецифических антител для перекрестного связывания Т-клеточных рецепторов TCR с ан-

тигенами-мишенями. Это приводит к эффективной активации Т-клеток, запускающей цитотоксичность. Подобным образом, получены биспецифические антитела, достигающие этой цели, и некоторые ученые просто связывали антитела против CD3 со специфическими для опухоли антителами с использованием химической связи. В то время как для этих биспецифических белков показана некоторая активность in vitro, получение в соответствии с GMP, короткие биологические периоды времени полужизни и ограниченная биодоступность представляют значительные проблемы для успешного использования этих молекул в лечении злокачественных опухолей. Кроме того, эти молекулы также не могут надлежащим образом воспроизводить передачу сигналов природного TCR, поскольку они не привлекают корецепторы TCR (CD8 и CD4).

В свете вышесказанного, остается необходимость в химерных рецепторах с увеличенной активностью и безопасностью.

Разработан альтернативный химерный рецептор, названный трифункциональным связывающим Т-клетку с антигеном (три-ТАС или ТАС) рецептором, который использует отличные биологические механизмы для нацеливания Т-клеток для атаки на опухоли. В то время как САК представляет собой полностью синтетический рецептор, сшивающий вместе компоненты передающего сигналы комплекса Т-клеточного рецептора (ТСК), рецептор ТАС перенацеливает ТСК на мишени опухолей и воспроизводит передающую сигналы структуру природного ТСК. Например, в некоторых вариантах осуществления, ТАС, описанные в настоящем описании, активируют природную передачу сигналов главного комплекса гистосовместимости (МНС) через Т-клеточный рецептор (ТСК), в то же время сохраняя нерестрицированное по МНС нацеливание. Кроме того, ТАС, описанные в настоящем описании, привлекают Т-клеточный рецептор (ТСК) в комбинации со стимуляцией корецептором. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления, для три-ТАС, описанных в настоящем описании, показана увеличенная активность и безопасность.

Конкретная терминология.

Термин "Т-клетка", в рамках изобретения, относится к типу лимфоцита, играющему центральную роль в опосредованном клетками. Т-клетки, также обозначенные как Т-лимфоциты, отличаются от других лимфоцитов, таких как В-клетки и клетки естественные киллеры, по присутствию Т-клеточного рецептора (TCR) на поверхности клетки. Существует несколько подгрупп Т-клеток с отличными функциями, включая, но без ограничения, Т-клетки-помощники, цитотоксические Т-клетки, Т-клетки памяти, регуляторные Т-клетки и Т-клетки естественные киллеры.

Термин "связывающий Т-клетку с антигеном агент" или ТАС использован взаимозаменяемо с "трифункциональным связывающим Т-клетку с антигеном агентом" или три-ТАС, и обозначает сконструированную конструкцию нуклеиновой кислоты или полипептида, которая, при экспрессии на Т-клетке, способствует облегчению нацеливания Т-клетки на конкретный антиген. В некоторых вариантах осуществления, ТАС содержит (а) специфический для мишени лиганд, (b) лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом Т-клеточного рецептора (ТСR), и (c) передающий сигналы домен Т-клеточного рецептора.

Термин "полинуклеотид" и/или "последовательность нуклеиновой кислоты", и/или "нуклеиновая кислота", в рамках изобретения, относится к последовательности мономеров нуклеозидов или нуклеотидов, состоящей из оснований, сахаров и межсахарных (каркасных) связей. Термин включает также модифицированные или замещенные последовательности, содержащие не встречающиеся в природе мономеры или их части. Последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут представлять собой последовательности дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или последовательности рибонуклеиновой кислоты (РНК), и могут включать природные основания, включая аденин, гуанин, цитозин, тимидин и урацил. Последовательности могут также содержать модифицированные основания. Примеры таких модифицированных оснований включают аза- и деазааденин, гуанин, цитозин, тимидин и урацил; и ксантин и гипоксантин. Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению можно выделять из биологических организмов, получать лабораторными способами генетической рекомбинации, или получать посредством химического синтеза или других известных способов получения нуклеиновых кислот.

Термин "выделенный полинуклеотид" или "выделенная последовательность нуклеиновой кислоты", в рамках изобретения, относится к нуклеиновой кислоте, в основном свободной от клеточного материала или культуральной среды при получении способами рекомбинантной ДНК, или химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе. Выделенная нуклеиновая кислота является также в основном свободной от последовательностей, которые в природе фланкируют нуклеиновую кислоту (т.е. последовательностей, локализованных на 5'- и 3'-концах нуклеиновой кислоты), из которой происходит эта нуклеиновая кислота. Термин "нуклеиновая кислота" предназначен для включения ДНК и РНК, и является либо двухцепочечной, либо одноцепочечной, и представляют собой смысловую или антисмысловую цепь. Кроме того, термин "нуклеиновая кислота" включает комплементарные последовательности нуклеиновой кислоты.

Термин "рекомбинантная нуклеиновая кислота" или "сконструированная нуклеиновая кислота", в рамках изобретения, относится к нуклеиновой кислоте или полинуклеотиду, не обнаруженному в биоло-

гическом организме. Например, рекомбинантные нуклеиновые кислоты можно получать лабораторными способами генетической рекомбинации (такими как молекулярное клонирование) для получения последовательностей, в ином случае не обнаруживаемых в природе. Рекомбинантные нуклеиновые кислоты можно также получать посредством химического синтеза или других известных способов получения нуклеиновых кислот.

Термин "полипептид" или "белок", в рамках изобретения, описывает цепь из аминокислот. Полипептид или белок по настоящему изобретению представляет собой пептид, который обычно описывает цепь из аминокислот. Термин белок, в рамках изобретения, описывает также большую молекулу, содержащую одну или несколько цепей из аминокислот и, в некоторых вариантах осуществления, представляет собой фрагмент или домен белка или полноразмерный белок. Кроме того, в рамках изобретения, термин белок относится либо к линейной цепи из аминокислот, либо к цепи из аминокислот, процессированной и свернутой в функциональный белок. Структуру белка разделяют на четыре различных уровня: (1) первичная структура - относящаяся к последовательности аминокислот в полипептидной цепи, (2) вторичная структура - относящаяся к регулярным локальным подструктурам цепи остова полипептида, таким как ф-спираль и В-листы, (3) третичная структура - относящаяся к трехмерной структуре мономерных и мультимерных молекул белка, и (4) четвертичная структура - относящаяся к трехмерной структуре, включающей агрегацию двух или более индивидуальных полипептидных цепей, действующих как одна функциональная единица. Белки, по настоящему изобретению, в некоторых вариантах осуществления, получают посредством выделения и очистки белков из клеток, в которых они продуцированы естественным образом, посредством ферментного (например, протеолитического) расщепления, и/или рекомбинантным способом посредством экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей белки или фрагменты по настоящему изобретению. Белки и/или фрагменты по настоящему изобретению, в некоторых вариантах осуществления, получают посредством химического синтеза или других известных способов получения белков и фрагментов.

Термин "выделенный полипептид" относится к полипептиду, в основном свободному от клеточного материала или культуральной среды при получении способами рекомбинантной ДНК, или химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе.

Термин "антитело", в рамках изобретения, предназначен для включения моноклональных антител, поликлональных антител, одноцепочечных антител, химерных антител и слитых с антителами белков. Антитело может происходить из рекомбинантных источников и/или быть продуцировано в трансгенных животных. Термин "фрагмент антитела", в рамках изобретения предназначен для включения, без ограничений, Fab, Fab', F(ab')2, scFv, dsFv, ds-scFv, димеров, миниантител, диател и их мультимеров, мультиспецифических фрагментов антител и доменных антител.

Термин "вектор", в рамках изобретения, относится к полинуклеотиду, используемому для доставки нуклеиновой кислоты во внутреннее пространство клетки. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой экспрессирующий вектор, содержащий последовательности для контроля экспрессии (например, промотор), функционально связанные с нуклеиновой кислотой, подлежащей экспрессии в клетке. Векторы, известные в данной области, включают, но без ограничения, плазмиды, фаги, космиды и вирусы.

Термин "антиген опухоли" или "опухолеассоциированный антиген", в рамках изобретения, относится к антигенному веществу, продуцируемому в клетках опухолей, которое запускает иммунный ответ у хозяина (например, когда оно представлено посредством комплексов МНС). В некоторых вариантах осуществления, антиген опухоли находится на поверхности клетки опухоли.

Термин "Т-клеточный рецептор" или ТСR, в рамках изобретения, относится к комплексу интегральных мембранных белков, который участвует в активации Т-клеток в ответ на связывание антигена. ТСR представляет собой связанный дисульфидными связями заякоренный в мембране гетеродимер, в норме состоящий из высоко вариабельных цепей альфа (α) и бета (β), экспрессированных как часть комплекса с инвариантными молекулами цепей CD3 (кластера дифференцировки 3). Т-клетки, экспрессирующие этот рецептор, обозначены как α : β (или α) Т-клетки, хотя незначительная часть Т-клеток экспрессируют альтернативный рецептор, сформированный вариабельными цепями гамма (γ) и дельта (δ), они обозначены как γ Т-клетки. CD3 представляет собой белковый комплекс, состоящий из четырех отдельных цепей. У млекопитающих, комплекс содержит цепь CD3 γ , цепь CD3 δ , две цепи CD3 ϵ и две цепи CD3 ϵ .

В рамках изобретения, термин "трансмембранный и цитозольный домен" относится к полипептиду, который содержит трансмембранный домен и цитозольный домен белка, ассоциированного с комплексом Т-клеточного рецептора (TCR). В некоторых вариантах осуществления, такой трансмембранный и цитозольный домен может включать, но без ограничения, домены белка, которые (а) ассоциированы с липидным рафтом и/или (b) связывают Lck.

"Корецептор ТСR" в рамках изобретения, относится к молекуле, которая помогает Т-клеточному рецептору (TCR) в коммуникации с антигенпредставляющей клеткой и которую можно рассматривать как часть первого сигнала, приводящего к активации TCR. Примеры корецепторов TCR включают, но

без ограничения, CD4, LAG3 и CD8.

"Костимулятор TCR" в рамках изобретения, относится к молекуле, которая усиливает ответ Т-клетки на антиген и которую можно рассматривать как второй сигнал, приводящий к активации TCR. Примеры костимуляторов TCR включают, но без ограничения, ICOS, CD27, CD28, 4-1BB (CD 137), OX40 (CD134), CD30, CD40, ассоциированный с функцией лимфоцитов антиген 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, специфически связывающий CD83.

"Коингибитор TCR" или "рецептор контрольной точки", в рамках изобретения, относится к молекуле, которая ингибирует ответ Т-клетки на антиген. Примеры коингибиторов TCR включают, но без ограничения, PD-1, TIM3, LAG-3, TIGIT, BTLA, CD160 и CD37.

Термины "реципиент", "индивидуум", "субъект", "хозяин" и "пациент" использованы в настоящем описании взаимозаменяемо, и в некоторых вариантах осуществления, относятся к любому субъектумлекопитающему, для которого диагностика, лечение или терапия являются желательными, в частности, к человеку. "Млекопитающее", для целей лечения, относится к любому животному, классифицированному как млекопитающее, включая человека, домашних и сельскохозяйственных животных, и лабораторных животных, животных в зоопарке, спортивных животных или животных-компаньонов, таких как собаки, лошади, кошки, коровы, овцы, козы, свиньи, мыши, крысы, кролики, морские свинки, обезьяны и т.д. В некоторых вариантах осуществления, млекопитающее представляет собой человека. Ни один из этих терминов не требует наблюдения медицинского персонала.

В рамках изобретения, термины "лечение", "обработка", и т.п., в некоторых вариантах осуществления, относятся к введению средства или осуществлению способа, с целью получения эффекта. Эффект может являться профилактическим в отношении полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома, и/или может являться терапевтическим в отношении вызова частичного или полного излечения заболевания и/или симптомов заболевания. "Лечение", в рамках изобретения, может включать лечение заболевания или нарушения (например, злокачественной опухоли) у млекопитающего, в частности, у человека, и включает: (а) предотвращение возникновения заболевания или симптома заболевания у субъекта, который может иметь предрасположенность к заболеванию, но еще не диагностирован как имеющий его (например, включая заболевания, которые могут быть ассоциированы с или вызваны первичным заболеванием; (b) ингибирование заболевания, т.е., арест его развития; и (c) облегчение заболевания, т.е. вызов регрессии заболевания. Лечение может относиться к любым показателям успеха лечения или облегчения, или предотвращения злокачественной опухоли, включая любой объективный или субъективный параметр, такой как ослабление; ремиссия; уменьшение симптомов; или доведение состояния заболевания до более переносимого для пациента; замедление скорости дегенерации или ухудшения; или доведение конечной точки дегенерации до менее истощающей. Лечение или облегчение симптомов основано на одном или нескольких объективных или субъективных параметрах; включая результаты обследования терапевтом. Соответственно, термин "лечение" включает введение соединений или средств по настоящему изобретению для предотвращения, задержки, облегчения, ареста или ингибирования развития симптомов или состояний, ассоциированных с заболеваниями (например, злокачественными опухолями). Термин "терапевтический эффект" относится к уменьшению, прекращению, или предотвращению заболевания, симптомов заболевания или побочных эффектов заболевания у субъекта.

В рамках изобретения, формы единственного числа включают объекты ссылки множественного числа, если контекст явно не требует иного. Таким образом, например, ссылка на "антитело" включает множество антител, и ссылка на "антитело", в некоторых вариантах осуществления, включает несколько антител и т.д.

В рамках изобретения, все числовые значения или числовые диапазоны включают целые числа внутри таких диапазонов или включающие такие диапазоны, и доли значений или целых чисел внутри диапазонов или включающие диапазоны, если контекст явно не требует иного. Таким образом, например, ссылка на диапазон 90-100% включает 91, 92, 93, 94, 95, 95, 96, 97% и т.д., так же как 91,1, 91,2, 91,3, 91,4, 91,5% и т.д., 92,1, 92,2, 92,3, 92,4, 92,5% и т.д. В другом примере, ссылка на диапазон 1-5000 раз включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 раз и т.д., так же как 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5 раза и т.д., 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5 раз и т.д., и т.п.

"Приблизительное" количество, в рамках изобретения, относится к диапазону, включающему количество и лежащему в диапазоне от на 10% ниже этого количества до на 10% выше этого количества. "Приблизительный" диапазон относится к 10% ниже нижнего предела диапазона, простираясь до 10% выше верхнего предела диапазона.

"Процент (%) идентичности" относится к степени, в которой две последовательности (нуклеотидов или аминокислот) имеют одинаковый остаток в тех же самых положениях при выравнивании. Например, "аминокислотная последовательность является на X% идентичной SEQ ID NO: Y" обозначает % идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: Y и уточняет, что X% остатков в аминокислотной последовательности являются идентичными остаткам из последовательности, описанной в SEQ ID NO: Y. Как правило, компьютерные программы используют для таких расчетов. Иллюстративные программы, сравнивающие и выравнивающие пары последовательностей, включают ALIGN (Myers and Miller, 1988), FASTA (Pearson and Lipman, 1988; Pearson, 1990) и gapped BLAST (Altschul et al., 1997),

BLASTP, BLASTN или GCG (Devereux et al., 1984).

В рамках изобретения, термин "избирательное связывание" относится к более высокой аффинности, с которой молекула (например, белок, такой как связывающий мишень лиганд ТАС) связывается со своей молекулой-мишенью (например, антигеном-мишенью, таким как HER-2, BCMA или CD19), по сравнению с другими молекулами.

Связывающий Т-клетку с антигеном агент (три-ТАС или ТАС).

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим трифункциональный связывающий Т-клетку с антигеном агент (три-TAC). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты, кодирующие три-TAC, содержат: (а) первый полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд; (b) второй полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий комплекс TCR; и (c) третий полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен и цитозольный домен. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты, кодирующие три-TAC, не кодируют костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты, кодирующие три-TAC, не кодируют коактивирующий домен.

Специфический для мишени лиганд.

Специфический для мишени лиганд, также обозначенный как антигенсвязывающий домен, относится к любому веществу или молекуле, связывающимся, напрямую или опосредованно, с клеткоймишенью. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд связывается с антигеном на клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой клетку, ассоциированную с состоянием заболевания, включая, но без ограничения, злокачественную опухоль, гематологическое злокачественное новообразование, крупноклеточную В-клеточную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности или крупноклеточную В-клеточную лимфому, возникающую из фолликулярной лимфомы. В некоторых вариантах осуществления, клеткамишень представляет собой клетку опухоли. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд связывается с антигеном опухоли или опухолеассоциированным антигеном на клетке опухоли. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген опухоли. В некоторых вариантах осуществления, антиген опухоли, когда является белковым, представляет собой последовательность из 8 или более аминокислот, вплоть до полноразмерного белка. В некоторых вариантах осуществления, антиген опухоли представляет собой любое количество аминокислот между 8 и полноразмерным белком, которое содержит по меньшей мере один антигенный фрагмент полноразмерного белка, представленный на главном комплексе гистосовместимости (МНС). Примеры антигенов опухолей включают, но без ограничения, CD19, HER-2 (erbB-2), антиген созревания В-клеток (BCMA), альфафетопротеин (AFP), карциноэмбриональный антиген (CEA), CA-125, MUC-1, эпителиальный антиген опухоли (ЕТА), тирозиназу, ассоциированный с меланомой антиген (МАGE), простатспецифический антиген (PSA), ассоциированный с глиомой антиген, В-субъединицу хорионического гонадотропина человека, тиреоглобулин, RAGE-1, MN-CA IX, обратную транскриптазу теломеразы человека, RU1, RU2 (AS), карбоксилэстеразу кишечника, mut hsp70-2, M-CSF, простазу, PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, простеин, PSMA, сурвивин и теломеразу, антиген-1 опухоли карциномы предстательной железы (РСТА-1), ELF2M, эластазу нейтрофилов, CD22, инсулиновый фактор роста (IGF)-I, IGF-II, рецептор IGF-I и мезотепин

В некоторых вариантах осуществления, специфические для мишени лиганды включают, но без ограничения, антитела и их фрагменты, например, одноцепочечные антитела, такие как одноцепочечные антитела (scFv), однодоменные антитела, пептиды, пептидомиметики, белки, гликопротеины или протеогликаны, которые связываются с клеткой и/или антигеном - мишенью. В некоторых вариантах осуществления, специфические для мишени лиганды включают, но без ограничения, сконструированные с анкириновым повтором белки (DARPin), лектины, ноттины, центририны, антикалины или природные лиганды для антигена опухоли, такие как факторы роста, субстраты ферментов, рецепторы или связывающие белки. В некоторых вариантах осуществления, специфические для мишени лиганды включают небелковые соединения, которые связываются с клетками и/или антигенами - мишенями, включая, но без ограничения, углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты или малые молекулы. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой сконструированный анкириновый повтор (DARPin), нацеленный на специфическую клетку и/или антиген. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (ScFv), нацеленный на специфическую клетку и/или антиген.

В некоторых вариантах осуществления, антиген опухоли представляет собой антиген HER-2. В некоторых вариантах осуществления, специфический для HER-2 лиганд содержит антигенсвязывающий домен антитела, выбранного из трастузумаба, пертузумаба, лапатиниба, нератиниба, адо-трастузумаба эмтанзина, ганкотамаба, маргетуксимаба, тимигутузумаба и эртумаксомаба. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой DARPin, избирательно связывающий антиген HER-2 (erbB-2). В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой DARPin, специфически связывающий антиген HER-2 (erbB-2). В некоторых

вариантах осуществления, DARPin, нацеленный на HER-2 (erb-2), содержит SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательность с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления, антиген опухоли представляет собой антиген ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, специфический для ВСМА лиганд содержит антигенсвязывающий домен антитела, выбранного из белантамаба мафодотина, и GSK2857916. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой scFv, избирательно связывающий ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой scFv, специфически связывающий ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, scFv, связывающий ВСМА, содержит SEO ID NO: 33 или SEO ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательность последовательность последовательность последовательнос

лиганд содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления, антиген опухоли представляет собой антиген CD19. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой scFv, избирательно связывающий CD19. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой scFv, специфически связывающий CD19. В некоторых вариантах осуществления, scFv, связывающий CD19, содержит SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 35.

В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 36.

Лиганд, связывающий комплекс TCR.

В некоторых вариантах осуществления, ТАС содержит лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом ТСК. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом ТСР, содержит вещество, связывающееся, напрямую или опосредованно, с белком из ТСР. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, содержит вещество, избирательно связывающееся с белком из TCR. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом ТСR, содержит вещество, специфически связывающееся с белком из ТСК. Белки, ассоциированные с ТСК, включают, но без ограничения, цепь альфа (α) ТСR, цепь бета (β) ТСR, цепь гамма (γ) ТСR, цепь дельта (δ) ТСR, цепь СD3у, цепь CD38 и цепи CD3є. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой антитело против цепи альфа (α) TCR, цепи бета (β) TCR, цепи гамма (γ) TCR, цепи дельта (δ) TCR, цепи CD3γ, цепи CD3δ и/или цепи CD3ε. В некоторых вариантах осуществления, белок, ассоциированный с комплексом ТСР, представляет собой СОЗ. В некоторых вариантах осуществления, белок, ассоциированный с комплексом ТСР, представляет собой СD3 г. Примеры антител против СD3, включают, но без ограничения. В некоторых вариантах осуществления, антитело, связывающее CD3, представляет собой одноцепочечное антитело, например, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий TCR, представляет собой антитело против СD3, или его фрагмент, такие как муромонаб, отелизизумаб, теплизумаб, висилизумаб, CD3-12, MEM-57, 4D10A6, CD3D или TR66.

В некоторых вариантах осуществления, CD3 происходит из комплекса TCR на клетке, экспрессирующей второй полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, связывание CD3 индуцирует активацию клетки, экспрессирующей второй полинуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, представляет собой UCHT1 или его вариант. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, представляет собой UCHT1 (SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или его гомологи). В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 избирательно связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 специфически связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 связывает CD3.

антах осуществления, лиганд UCHT1 избирательно связывает CD3ε. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 специфически связывает СD3є. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 кодирован посредством SEQ ID NO 13. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 содержит SEQ ID NO 14. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 является мутантным. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 содержит мутацию Y182T (также обозначенный как UCHT1 (Y182T)) (SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72). В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 (Y182T) связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 (Y182T) избирательно связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 (Y182T) специфически связывает СВЗ. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 (Y182T) связывает СВЗє. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 (У182Т) избирательно связывает СD3є. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 (Y182T) специфически связывает CD3 г. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 (Y182T) кодирован посредством SEQ ID NO 71. В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1 (Y182T) содержит SEQ ID NO 72. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, представляет собой гуманизированный UCHT1 (huUCHT1). В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс ТСR, представляет собой huUCHT1 (SEQ ID NO 43, SEQ ID NO: 44 или его гомологи). В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCHT1 связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCHT1 избирательно связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCHT1 специфически связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCHT1 связывает CD3є. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCHT1 избирательно связывает CD3є. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCHT1 специфически связывает CD3є. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCHT1 кодирован посредством SEQ ID NO 43. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCHT1 содержит SEQ ID NO 44. В некоторых вариантах осуществления, huUCHT1 имеет мутацию У177Т (также обозначенный как huUCHT1 (У177Т)) (SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46). В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCHT1 (Y177T) связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCHT1 (Y177T) избирательно связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCHT1 (Y177T) специфически связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCHT1 (Y177T) связывает CD3є. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCHT1 (Y177T) избирательно связывает CD3 є. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCHT1 (Y177T) специфически связывает CD3є. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCHT1 (Y177T) кодирован посредством SEQ ID NO 45. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCHT1 содержит SEQ ID NO 46.

В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 71. В неко-

торых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 71.

В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 72.

В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 43.

В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 44.

В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательность, имеющую последовательность последовательность

тид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 45.

В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 46.

В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий CD3, представляет собой ОКТ3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд ОКТ3 связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд ОКТ3 избирательно связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд ОКТ3 специфически связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд ОКТ3 связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд ОКТ3 избирательно связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд ОКТ3 специфически связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд ОКТ3 мыши кодирован посредством SEQ ID NO 21. В некоторых вариантах осуществления, лиганд ОКТ3 содержит SEQ ID NO 22.

В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность из SEO ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления, лиганд F6A связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд F6A связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд F6A связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд F6A специфически связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд F6A связывает CD3г. В некоторых вариантах осуществления, лиганд F6A избирательно связывает CD3г. В некоторых вариантах осуществления, лиганд F6A специфически связывает CD3г. В некоторых вариантах осуществления, лиганд F6A мыши кодирован посредством SEQ ID NO 23. В некоторых вариантах осуществления, лиганд F6A содержит SEQ ID NO 24.

В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последова-

тельность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах осуществления, лиганд L2K связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд L2K связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд L2K специфически связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд L2K специфически связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд L2K связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд L2K связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд L2K специфически связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления, лиганд L2K мыши кодирован посредством SEQ ID NO 25. В некоторых вариантах осуществления, лиганд L2K содержит SEQ ID NO 26.

В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий комплекс TCR, содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 26.

Трансмембранный домен и цитозольный домен.

В некоторых вариантах осуществления, связывающий Т-клетку с антигеном агент включает полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена ТСR содержит трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена ТСR содержит цитозольный домен. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена ТСR содержит трансмембранный домен и цитозольный домен. В некоторых вариантах осуществления, цитозольный домен и трансмембранные домены, необязательно, соединены посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора содержит домен корецептора ТСR. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена Тклеточного рецептора не содержит домен костимулятора ТСR. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена ТСR содержит трансмембранный домен и/или цитозольный домен корецептора ТСR. В некоторых вариантах осуществления, корецептор ТСR представляет собой СD4, CD8, LAG3 или его химерный вариант.

В некоторых вариантах осуществления, корецептор ТСR представляет собой CD4. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена ТСR содержит трансмембранный и цитозольный домены корецептора CD4, кодированные посредством SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена ТСR содержит трансмембранный и цитозольный домены корецептора CD4, содержащие SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления, корецептор ТСR представляет собой CD8. В некоторых вариантах осуществления, корецептор ТСR представляет собой CD8α. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена ТСR содержит трансмембранный и цитозольные домены корецептора CD8α, кодируемые посредством SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена ТСR содержит трансмембранный и цитозольный домены корецептора CD8α, содержащие SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления, третий

полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена ТСR содержит химеру последовательностей или доменов из корецепторов. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена ТСR содержит химеру СD8α и CD8β, где богатая аргинином область CD8α заменена на богатую аргинином область CD8β. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора содержит трансмембранный и цитозольный домены химеры корецептора CD8α+R(β), кодируемой посредством SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора содержит трансмембранный и цитозольный домены химеры корецептора CD8α+R(β), представленные SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена ТСR содержит химеру CD8α и CD8β, домен CXCP CD8α, содержащий связывающий Lck мотив, добавлен к Сконцу цитозольного домена CD8β. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора содержит трансмембранный и цитозольный домены химеры корецептора CD8β+Lck, кодируемые посредством SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора содержит трансмембранный и цитозольный домены химеры корецептора СD8β+Lck, представленные SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 40. В

некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления, третий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и цитозольный домен содержат аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора содержит домен костимулятора ТСR. В некоторых вариантах осуществления, костимулятор ТСR представляет собой СОS. В некоторых вариантах осуществления, костимулятор ТСR представляет собой СD28. В некоторых вариантах осуществления, костимулятор ТСR представляет собой 4-1BB (CD137). В некоторых вариантах осуществления, костимулятор ТСR представляет собой ОХ40 (CD134). В некоторых вариантах осуществления, костимулятор ТСR представляет собой CD30. В некоторых вариантах осуществления, костимулятор ТСR представляет собой CD40. В некоторых вариантах осуществления, костимулятор ТСR представляет собой CD40. В некоторых вариантах осуществления, костимулятор ТСR представляет собой CD2. В некоторых вариантах осуществления, костимулятор ТСR представляет собой CD7. В некоторых вариантах осуществления, костимулятор ТСR представляет собой NKG2C. В некоторых вариантах осуществления, костимулятор ТСR представляет собой NKG2C. В некоторых вариантах осуществления, костимулятор ТСR представляет собой NKG2C. В некоторых вариантах осуществления, костимулятор ТСR представляет собой B7-H3. В некоторых вариантах осуществления, костимулятор ТСR представляет собой лиганд, специфически связывающий CD83.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена TCR содержит трансмембранный домен и/или цитозольный домен коингибитора TCR. В некоторых вариантах осуществления, коингибитор TCR представляет собой PD-1. В некоторых вариантах осуществления, коингибитор TCR представляет собой TIM3. В некоторых вариантах осуществления, коингибитор TCR представляет собой LAG-3. В некоторых вариантах осуществления, коингибитор TCR представляет собой TIGIT. В некоторых вариантах осуществления, коингибитор TCR представляет собой BTLA. В некоторых вариантах осуществления, коингибитор TCR представляет собой CD160. В некоторых вариантах осуществления, коингибитор TCR представляет собой CD37.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена TCR включает как цитозольный домен, так и трансмембранный домен корецептора или костимулирующего белка TCR. В некоторых вариантах осуществления, цитозольный домен и трансмембранный домен происходят из одного и того же корецептора или костимулятора, или из различных корецепторов или костимуляторов. В некоторых вариантах осуществления, TAC дополнительно содержит другие полипептиды, которые напрямую или опосредованно действуют для нацеливания или активации Т-клетки.

Линкеры, соединители и конфигурации.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, описанная в настоящем описании, организована в следующем порядке (1) первый полинуклеотид, кодирующий специфический для мише-

ни лиганд; (2) второй полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий комплекс ТСК; (3) третий полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен и цитозольный домен. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, описанная в настоящем описании, организована в следующем порядке (1) первый полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд; (2) второй полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий комплекс ТСР; (3) третий полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен и цитозольный домен, где порядок приведен от 5'-конца до 3'-конца. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, описанная в настоящем описании, организована в следующем порядке (1) первый полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд; (2) второй полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий комплекс TCR; (3) третий полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен и цитозольный домен, где порядок приведен от 3'-конца до 5'-конца. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, описанная в настоящем описании, организована в следующем порядке (1) первый полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий комплекс ТСР; (2) второй полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд; (3) третий полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен и цитозольный домен. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, описанная в настоящем описании, организована в следующем порядке (1) первый полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий комплекс TCR; (2) второй полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд; (3) третий полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен и цитозольный домен, где порядок приведен от 5'-конца до 3'-конца. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, описанная в настоящем описании, организована в следующем порядке (1) первый полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий комплекс ТСК; (2) второй полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд; (3) третий полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен и цитозольный домен, где порядок приведен от 3'-конца до 5'-конца.

В некоторых вариантах осуществления, первая нуклеиновая кислота кодирует первый полипептид, вторая нуклеиновая кислота кодирует второй полипептид, и третья нуклеиновая кислота кодирует третий полипептид. В некоторых вариантах осуществления, первый полипептид, второй полипептид и третий полипептид слиты напрямую. Например, специфический для мишени лиганд и полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора оба слиты с лигандом, связывающим комплекс ТСR. В некоторых вариантах осуществления, первый полипептид, второй полипептид, и третий полипептид соединены посредством по меньшей мере одного линкера. В некоторых вариантах осуществления, первый полипептид и второй полипептид слиты напрямую, и соединены с третьим полипептидом посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления, второй полипептид и третий полипептид слиты напрямую, и соединены с первым полипептидом посредством линкера.

В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 1-40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 1-30 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 1-15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 1-16 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 1-6 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 30-40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 32-36 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 5-30 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 5-30 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит 30 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит линкер G4S3 (SEQ ID NO: 74). В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит SEQ ID NO: 11, 12, 15, 16, 19, 20, или их варианты или фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер, который соединяет специфический для мишени лиганд с лигандом, связывающим комплекс TCR, (например, UCHT1), известен как соединитель, чтобы отличать этот домен белка от других линкеров в три-TAC. Соединитель имеет любой размер. В некоторых вариантах осуществления, соединитель между лигандом, связывающим комплекс TCR, и специфическим для мишени лигандом представляет собой короткую спираль, содержащую SEQ ID NO ID: 28. В некоторых вариантах осуществления, соединитель между лигандом, связывающим комплекс TCR, и специфическим для мишени лигандом представляет собой короткую спираль, кодируемую посредством SEQ ID NO ID: 27. В некоторых вариантах осуществления, соединитель между лигандом, связывающим комплекс TCR, и специфическим для мишени лигандом представляет собой длинную спираль, содержащую SEQ ID NO ID: 30. В некоторых вариантах осуществления, соединитель между лигандом, связывающим комплекс TCR, и специфическим для мишени лигандом представляет собой длинную спираль, кодируемую посредством SEQ ID NO ID: 29. В некоторых вариантах осуществления, соединитель между лигандом, связывающим комплекс TCR, и специфическим для мишени лигандом представляет собой большой домен, содержащий SEQ ID NO ID: 32. В некоторых вариантах осуществления, соединитель между лигандом, связывающим комплекс TCR, и специфическим для мишени лигандом представляет собой большой домен, содержащий SEQ ID NO ID: 32. В некоторых вариантах осуществления, соединитель между лигандом, связывающим комплекс TCR, и специфическим для мишени лигандом представляет собой большой домен, содержащий SEQ ID NO ID: 32. В некоторых вариантах осуществления, соединитель между лигандом, связывающим комплекс TCR, и специфическим для мишени лигандом представляет собой большой домен, содержащий SEQ ID NO ID: 32. В некоторых вариантах осуществления, соединительных растемаций.

единитель между лигандом, связывающим комплекс TCR, и специфическим для мишени лигандом представляет собой большой домен, кодируемый посредством SEQ ID NO ID: 31.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, описанная в настоящем описании, содержит лидерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5, 47 или 49. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5, 47 или 49. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5, 47 или 49. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5, 47 или 49. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5, 47 или 49. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5, 47 или 49. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 5, 47 или 49.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, описанная в настоящем описании, содержит лидерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6, 48 или 50. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6, 48 или 50. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6, 48 или 50. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6, 48 или 50. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6, 48 или 50. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6, 48 или 50. В некоторых вариантах осуществления, лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 6, 48 или 50.

Предусматривают, что три-ТАС представлен в различных конфигурациях и комбинациях (a) специфического для мишени лиганда, (b) лиганда, связывающего комплекс TCR, и (c) передающего сигналы домена TCR, как описано в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для мишени лиганд, (b) одноцепочечное антитело (scFv), связывающее CD3є, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для мишени лиганд, (b) UCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для мишени лиганд, (b) UCHT1 (Y182T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для мишени лиганд, (b) huUCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для мишени лиганд, (b) huUCHT1 (Y177T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для мишени лиганд, (b) F6A, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для мишени лиганд, (b) F6A, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для мишени лиганд, (b) L2K, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4.

В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) DARPin, (b) UCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) DARPin, (b) UCHT1 (Y182T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) DARPin, (b) huUCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) DARPin, (b) huUCHT1 (Y177T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) DARPin, (b) OKT3, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) DARPin, (b) F6A, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) DARPin, (b) L2K, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) DARPin, (b) L2K, и (c) трансмембранный и цитозольный и цитозольный и цитозольный и цитозольный и цитозольный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) DARPin, (b) L2K, и (с) трансмембранный и цитозольный и цитоз

зольный домен корецептора CD4.

В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) scFv, (b) UCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) scFv, (b) UCHT1 (Y182T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) scFv, (b) huUCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) scFv, (b) huUCHT1 (Y177T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) scFv, (b) OKT3, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) scFv, (b) F6A, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) scFv, (b) L2K, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4.

В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для HER-2 DARPin, (b) UCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для HER-2 DARPin, (b) UCHT1 (Y182T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для HER-2 DARPin, (b) huUCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для НЕR-2 DARPin, (b) OKT3, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для HER-2 DARPin, (b) F6A, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для HER-2 DARPin, (b) F6A, и (с) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для HER-2 DARPin, (b) L2K, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4.

В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для ВСМА ScFv, (b) UCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для ВСМА ScFv, (b) UCHT1 (Y182T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для ВСМА ScFv, (b) huUCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для ВСМА ScFv, (b) huUCHT1 (Y177T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для ВСМА ScFv, (b) ОКТ3, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для ВСМА ScFv, (b) F6A, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для ВСМА ScFv, (b) L2K, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4.

В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для CD19 ScFv, (b) UCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для CD19 ScFv, (b) UCHT1 (Y182T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для CD19 ScFv, (b) huUCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для CD19 ScFv, (b) huUCHT1 (Y177T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для CD19 ScFv, (b) OKT3, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для CD19 ScFv, (b) F6A, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для CD19 ScFv, (b) L2K, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4.

В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для мишени лиганд, (b) одноцепочечное антитело (scFv), связывающее CD3є, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для мишени лиганд, (b) UCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для мишени лиганд, (b) UCHT1 (Y182T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для мишени лиганд, (b) huUCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для мишени лиганд, (b) OKT3, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для мишени лиганд, (b) F6A, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для мишени лиганд, (b) F6A, и (с) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для мишени лиганд, (b) F6A, и (с) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-

TAC содержит (a) специфический для мишени лиганд, (b) L2K, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8.

В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) DARPin, (b) UCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD4. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) DARPin, (b) UCHT1 (Y182T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) DARPin, (b) huUCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) DARPin, (b) huUCHT1 (Y177T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) DARPin, (b) OKT3, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) DARPin, (b) F6A, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) DARPin, (b) L2K, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8.

В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) scFv, (b) UCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) scFv, (b) UCHT1 (Y182T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) scFv, (b) huUCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) scFv, (b) huUCHT1 (Y177T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) scFv, (b) OKT3, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) scFv, (b) F6A, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) scFv, (b) L2K, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8.

В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для HER-2 DARPin, (b) UCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для HER-2 DARPin, (b) UCHT1 (Y182T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для HER-2 DARPin, (b) huUCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для мишени лиганд, (b) huUCHT1 (Y177T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для HER-2 DARPin, (b) ОКТ3, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для HER-2 DARPin, (b) F6A, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для HER-2 DARPin, (b) L2K, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8.

В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для ВСМА ScFv, (b) UCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для ВСМА ScFv, (b) UCHT1 (Y182T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для ВСМА ScFv, (b) huUCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для ВСМА ScFv, (b) huUCHT1 (Y177T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для ВСМА ScFv, (b) ОКТ3, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для ВСМА ScFv, (b) F6A, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для ВСМА ScFv, (b) L2K, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8.

В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для CD19 ScFv, (b) UCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для CD19 ScFv, (b) UCHT1 (Y182T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для CD19 ScFv, (b) huUCHT1, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для CD19 ScFv, (b) huUCHT1 (Y177T), и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для CD19 ScFv, (b) OKT3, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для CD19 ScFv, (b) F6A, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8. В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС содержит (а) специфический для CD19 ScFv, (b) L2K, и (c) трансмембранный и цитозольный домен корецептора CD8.

В некоторых вариантах осуществления, три-ТАС переносит СОЗ и ТСК в области липидных рафтов

мембраны, и располагает Lck поблизости от TCR, сходным образом с природным связыванием МНС.

В некоторых вариантах осуществления, ТАС, описанный в настоящем описании, представляет собой DARPin против HER-2-три-ТАС (также обозначенный как конфигурация 1; SEQ ID NO: 1 и 2), включает, в следующем порядке:

- і) лидерную последовательность против HER-2-три-ТАС (сигнал секреции) (SEQ ID NO: 5 и 6),
- іі) DARPin, специфический для антигена HER-2 (SEQ ID NO: 7 и 8),
- iii) метку Мус (SEQ ID NO: 9 и 10),
- iv) соединитель (SEQ ID NO: 11 и 12),
- v) UCHT1 (SEQ ID NO: 13 и 14),
- vi) линкер (SEQ ID NO: 15 и 16),
- vii) CD4 (SEQ ID NO: 17 и 18).

В некоторых вариантах осуществления, ТАС, описанный в настоящем описании, представляет собой НЕR2-TAC. В некоторых вариантах осуществления, НЕR2-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления, НЕR2-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления, НЕR2-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления, НЕR2-TAC содержит нуклеотидную последовательности с SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления, НЕR2-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления, НЕR2-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления, НЕR2-TAC содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления, НЕR2-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления, НЕR2-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления, НЕR2-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления, НЕR2-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления, НЕR2-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления, НЕR2-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления, НЕR2-TAC содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 66.

В некоторых вариантах осуществления, ТАС, описанный в настоящем описании, представляет собой HER2-TAC. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит нуклеотидную последовательности с SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит аминокислотную последовательности с SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 68.

В некоторых вариантах осуществления, ТАС, описанный в настоящем описании, представляет со-

бой HER2-TAC. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 75.

В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления, HER2-TAC содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления, ТАС, описанный в настоящем описании, представляет собой ВСМА-ТАС. В некоторых вариантах осуществления, ВСМА-ТАС содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 55, 57, 59 или 61. В некоторых вариантах осуществления, ВСМА-ТАС содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 55, 57, 59 или 61. В некоторых вариантах осуществления, ВСМА-ТАС содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 55, 57, 59 или 61. В некоторых вариантах осуществления, ВСМА-ТАС содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 55, 57, 59 или 61. В некоторых вариантах осуществления, ВСМА-ТАС содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 55, 57, 59 или 61. В некоторых вариантах осуществления, ВСМА-ТАС содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 55, 57, 59 или 61. В некоторых вариантах осуществления, ВСМА-ТАС содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 55, 57, 59 или 61. В некоторых вариантах осуществления, ВСМА-ТАС содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 55, 57, 59 или 61.

В некоторых вариантах осуществления, ВСМА-ТАС содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 56, 58, 60 или 62. В некоторых вариантах осуществления, ВСМА-ТАС содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 56, 58, 60 или 62. В некоторых вариантах осуществления, ВСМА-ТАС содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 56, 58, 60 или 62. В некоторых вариантах осуществления, ВСМА-ТАС содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 56, 58, 60 или 62. В некоторых вариантах осуществления, ВСМА-ТАС содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 56, 58, 60 или 62. В некоторых вариантах осуществления, ВСМА-ТАС содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 56, 58, 60 или 62. В некоторых вариантах осуществления, ВСМА-ТАС содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 56, 58, 60 или 62. В некоторых вариантах осуществления, ВСМА-ТАС содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 56, 58, 60 или 62.

В некоторых вариантах осуществления, ТАС, описанный в настоящем описании, представляет собой CD19-TAC. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит нуклеотидную последовательности с SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит нуклеотидную последовательности с SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит нуклеотидную

последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 63.

В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит аминокислотную последовательности с SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления, содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления, CD19-TAC содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 64.

Полипептиды и векторные конструкции.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к полипептидам, кодируемым посредством последовательности нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании. Настоящее изобретение относится также к векторам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, векторы дополнительно содержат промотор. В некоторых вариантах осуществления, промотор является функциональным в клетке млекопитающего. Промоторы, области ДНК, инициирующие транскрипцию конкретной последовательности нуклеиновой кислоты, хорошо известны в данной области. "Промотор, функциональный в клетке млекопитающего", относится к промотору, управляющему экспрессией ассоциированной последовательности нуклеиновой кислоты в клетке млекопитающего. Промотор, управляющий экспрессией последовательности нуклеиновой кислоты, обозначают как являющийся "функционально связанным" с последовательностью нуклеиновой кислоты.

Множество векторов для доставки и экспрессирующих векторов используют для введения нуклеиновых кислот, описанных в настоящем описании, в клетку.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, содержащимся в векторе, для получения векторной конструкции, также обозначенной в настоящем описании как вектор. В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание относится к вектору, содержащему:

- а) первый полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд;
- b) второй полинуклеотид, кодирующий лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR;
- с) третий полинуклеотид, кодирующий полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора; и
 - d) промотор, который является функциональным в клетке млекопитающего.
- В некоторых вариантах осуществления, мишенью специфического для мишени лиганда является НЕR-2, ВСМА или СD19. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой DARPin, избирательно связывающий антиген HER-2 (erbB-2). В некоторых вариантах осуществления, специфически связывающий антиген HER-2 (erbB-2). В некоторых вариантах осуществления, DARPin, нацеленный на HER-2 (erb-2), содержит SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой scFv, избирательно связывающий ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой scFv, специфически связывающий ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, scFv, связывающий ВСМА, содержит SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой scFv, избирательно связывающий CD19. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой scFv, специфический для мишени лиганд представляет собой scFv, специфический связывающий CD19. В некоторых вариантах осуществления, специфический для мишени лиганд представляет собой scFv, специфически связывающий CD19. В некоторых вариантах осуществления, scFv, связывающий CD19, содержит SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом ТСR, представляет собой UСНТ1, гуманизированный UСНТ1 (huUCHT1), ОКТ3, F6A или L2K. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом ТСR, представляет собой UСНТ1 или его вариант. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом ТСR, представляет собой UСНТ1 и кодирован посредством SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом ТСR, представляет собой UСНТ1 и содержит SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления, лиганд UCHT1, связывающий белок, ассоциированный с

комплексом TCR, имеет мутацию Y182T (UCHT1 (Y182T)) и кодирован посредством SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой UCHT1 (Y182T) и содержит SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой гуманизированный UCHT1 (huUCHT1), или его вариант. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой гуманизированный UCHT1 (huUCHT1) и кодирован посредством SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой huUCHT1 и содержит SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления, лиганд huUCHT1, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, имеет мутацию Y177T (huUCHT1 (Y177T)) и кодирован посредством SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой huUCHT1 (Y177T) и содержит SEQ ID NO: 46.

В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом ТСR, представляет собой ОКТ3, или его вариант. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом ТСR, представляет собой ОКТ3 и кодирован посредством SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом ТСR, представляет собой ОКТ3 и содержит SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой F6A или его вариант. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой F6A и кодирован посредством SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой F6A и содержит SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой L2K или его вариант. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой L2K и кодирован посредством SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, связывающий белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой L2K и содержит SEQ ID NO: 26.

В некоторых вариантах осуществления, белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой CD3. В некоторых вариантах осуществления, белок, ассоциированный с комплексом TCR, представляет собой CD3є.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид передающего сигналы домена TCR содержит трансмембранный домен и/или цитозольный домен корецептора TCR. В некоторых вариантах осуществления, корецептор TCR представляет собой CD4, CD8, LAG3 или его химерный вариант.

В некоторых вариантах осуществления, первый полинуклеотид и третий полинуклеотид слиты с вторым полинуклеотидом, и кодирующая последовательность является функционально связанной с промотором. В некоторых вариантах осуществления, второй полинуклеотид и третий полинуклеотид слиты с первым полинуклеотидом, и кодирующая последовательность является функционально связанной с промотором. В некоторых вариантах осуществления, вектор сконструирован для экспрессии в клетках млекопитающих, таких как Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор.

В некоторых вариантах осуществления, векторы, которые можно использовать, включают векторы, происходящие из лентивирусов, вирусов мышиных стволовых клеток (MSCV), поксвирусов, онкоретровирусов, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов. Другие векторы для доставки, которые можно использовать, включают векторы, происходящие из вирусов простого герпеса, транспозонов, вирусов осповакцины, вируса папилломы человека, вирусов имонудефицита обезьян, HTLV, пенистого вируса человека и их вариантов. Дополнительные векторы, которые можно использовать, включают векторы, происходящие из спумавирусов, ретровирусов млекопитающих типа В, ретровирусов млекопитающих типа С, ретровирусов птиц типа С, ретровирусов млекопитающих типа D и ретровирусов типа HTLV/BLV. Одним примером лентивирусного вектора, который можно использовать в описанных композициях и способах, является вектор рССL4.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота представляет собой рекомбинантную, или сконструированную, нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления, первый, второй и/или третий полинуклеотиды представляют собой рекомбинантные, или сконструированные, полинуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды, описанные в настоящем описании, подлежат модификации или мутагенезу для оптимизации функции кодированного полипептида и/или функции, активности и/или экспрессии связывающего Т-клетку с антигеном агента. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота кодирует полипептид.

В некоторых вариантах осуществления, модификации вносят в полинуклеотидные последовательности, включая векторные последовательности и полипептидные последовательности, описанные в настоящем описании. Модификации включают замены, вставку или делецию нуклеотидов или аминокислот, или изменение относительных положений или порядка нуклеотидов или аминокислот.

Экспрессия в Т-клетках.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к модифицированным Т-клеткам, содержащим последовательности нуклеиновой кислоты, описанные в настоящем описании, или векторы, описанные в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к Т-клеткам человека, модифицированным для экспрессии три-ТАС, описанного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетка экспрессирует три-ТАС, описанный в настоящем описании. Кроме того, настоящее изобретение относится к Т-клеткам, трансдуцированным или трансфицированным с использованием связывающего Т-клетку с антигеном агента или вектора, содержащего три-ТАС. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетка представляет собой выделенную Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления, для Т-клеток человека, модифицированных для экспрессии три-ТАС, показана функциональность, эквивалентная общепринятому CAR in vitro. В некоторых вариантах осуществления, для Т-клеток, модифицированных с использованием три-ТАС, показана функциональность, превосходящая общепринятый CAR in vitro. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к Т-клеткам человека, модифицированным с использованием три-ТАС, для которых показана улучшенная безопасность, по сравнению с традиционными CAR. В некоторых вариантах осуществления, для Т-клеток человека, модифицированных для экспрессии три-ТАС, показана улучшенная безопасность, по сравнению с традиционными CAR.

Т-клетки, в некоторых вариантах осуществления, получают из ряда источников, включая, но без ограничения, кровь (например, мононуклеарные клетки периферической крови), костный мозг, ткань тимуса, ткань лимфатического узла, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из участка инфекции, ткань селезенки или опухоли. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки представляют собой аутологичные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки получают из линии клеток из Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки получают от доноров (аллогенные Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки получают посредством дифференцировки эмбриональных стволовых клеток или стволовых клеток, или из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления, независимо от источника Т-клеток, Т-клетки модифицированы таким образом, чтобы в них отсутствовала экспрессия эндогенного ТСР и/или временно или постоянно отсутствовала экспрессия молекул МНС/НLA (универсальные донорные Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки являются аутологичными по отношению к субъекту. В некоторых вариантах осуществления, клетки являются аутологичными по отношению к субъекту.

В некоторых вариантах осуществления, после получения, Т-клетки, необязательно, обогащают in vitro. В некоторых вариантах осуществления, популяцию клеток обогащают посредством положительного или отрицательного отбора. Кроме того, Т-клетки, необязательно, замораживают или криоконсервируют и затем размораживают в более позднюю дату.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки активируют и/или размножают до или после введения три-ТАС в Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки размножают посредством контакта с поверхностью, к которой прикреплено средство, стимулирующее ассоциированный с CD3/комплексом TCR сигнал, и лиганд, стимулирующий костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки размножают посредством контакта с одним или несколькими растворимыми средствами, стимулирующими передачу сигналов CD3/комплекса TCR и передачу сигналов костимулирующей молекулы.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки трансдуцируют или трансфицируют с использованием последовательностей нуклеиновой кислоты. Трансдуцированные или трансфицированные Т-клетки экспрессируют белки, кодированные трансфицированными или трансдуцированными последовательностями нуклеиновой кислоты. Нуклеиновую кислоту можно вводить в клетку посредством физических, химических или биологических способов. Физические способы включают, но без ограничения, микроинъекцию, электропорацию, бомбардировку частицам, липофекцию и преципитацию фосфатом кальция. Биологические способы включают использование ДНК- и РНК-векторов.

Вирусные векторы, включая ретровирусные векторы, используют для введения и экспрессии нуклеиновой кислоты в Т-клетке. Вирусные векторы включают векторы, происходящие из лентивируса, вирусов мышиных стволовых клеток (MSCV), поксвирусов, вируса простого герпеса I, аденовируса и аденоассоциированных вирусов. Вектор, необязательно, включает промотор, управляющий экспрессией трансдуцированной молекулы нуклеиновой кислоты в Т-клетке (например, промотор CMV, промотор eF1a или промотор MSCV).

Любой подходящий анализ используют для подтверждения присутствия и/или экспрессии трансдуцированной последовательности нуклеиновой кислоты, и/или полипептида, кодируемого посредством нуклеиновой кислоты, в Т-клетке. Анализы включают, но без ограничения, Саузерн- и Нозерн-блоттинг, RT-ПЦР и ПНР, ELISA, Вестерн-блоттинг и проточную цитометрию.

Т-клетка, экспрессирующая ТАС, имеет увеличенную активацию Т-клетки в присутствии антигена, по сравнению с Т-клеткой, не экспрессирующей ТАС, и/или по сравнению с Т-клеткой, экспрессирую-

щей традиционный САR. Увеличенную активацию Т-клетки устанавливают многочисленными способами, включая, но без ограничения, увеличенное уничтожение линии клеток опухоли, увеличенную продукцию цитокинов, увеличенный цитолиз, увеличенную дегрануляцию и/или увеличенную экспрессию маркеров активации, таких как $CD107\alpha$, $IFN\gamma$, IL2 или $TNF\alpha$. В некоторых вариантах осуществления, увеличения измеряют в индивидуальной клетке или в популяции клеток.

Термины "увеличенный" или "увеличение", в рамках изобретения, относятся к увеличению по меньшей мере на 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 или 200% в Т-клетке или популяции Т-клеток, экспрессирующей ТАС, по сравнению с Т-клеткой или популяцией Т-клеток, не экспрессирующей ТАС, и/или по сравнению с Т-клеткой или популяцией Т-клеток, экспрессирующей традиционный САR.

Фармацевтические композиции.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим сконструированную Т-клетку, описанную в настоящем описании (трансдуцированную с использованием ТАС и/или экспрессирующую ТАС), и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носители включают, но без ограничения, буферы, такие как нейтральный забуференный солевой раствор, фосфатно-солевой буфер и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); или консерванты. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные Т-клетки составляют для внутривенного введения.

Фармацевтические композиции вводят способом, подходящим для заболевания, подлежащего лечению (или предотвращению). Количество и частоту введения определяют посредством таких факторов, как состояние пациента, и тип и тяжесть заболевания пациента, хотя подходящие дозы определяют посредством клинических исследований. Когда указано "иммунологически эффективное количество", "противоопухолевое эффективное количество", "ингибирующее опухоль эффективное количество" или "терапевтическое количество", точное количество композиций по настоящему изобретению, подлежащее введению, определяет терапевт, с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе, размере опухоли, степени инфекции или метастазирования и состоянии пациента (субъекта).

В некоторых вариантах осуществления, модифицированные Т-клетки и/или фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, вводят в дозе 10^1 - 10^{15} клеток на кг массы тела, 10^4 - 10^9 клеток на кг массы тела, необязательно, 10^5 - 10^8 клеток на кг массы тела, 10^6 - 10^7 клеток на кг массы тела или 10^5 - 10^6 клеток на кг массы тела, включая все целые значения в пределах этих диапазонов. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные Т-клетки и/или фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, вводят в дозе более, чем 10^1 клеток на кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные Т-клетки и/или фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, вводят в дозе менее чем 10^{15} клеток на кг массы тела.

В некоторых вариантах осуществления, модифицированные Т-клетки и/или фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, вводят в дозе 0.5×10^6 клеток, 2×10^6 клеток, 4×10^6 клеток, 5×10^6 клеток, 1.2×10^7 клеток, 2×10^7 клеток, 5×10^7 клеток, 2×10^8 клеток, 5×10^8 клеток, 2×10^9 клеток, 2×10^9

В некоторых вариантах осуществления, композиции Т-клеток вводят множество раз в этих дозах. В некоторых вариантах осуществления, дозу вводят один раз или множество раз, например, ежесуточно, еженедельно, раз в две недели или ежемесячно, один раз в час, или вводят при обострении, рецидиве или прогрессировании злокачественной опухоли, подвергаемой лечению. Клетки, в некоторых вариантах осуществления, вводят с использованием способов инфузии, общеизвестных в иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988).

Фармацевтическая композиция является в основном свободной от, например, не содержит поддающихся детекции уровней контаминанта, например, выбранного из группы, состоящей из эндотоксина, микоплазмы, компетентного по репликации лентивируса (RCL), p24, нуклеиновой кислоты VSV-G, gag HIV, остаточных покрытых антителами против CD3/против CD28 бусин, мышиных антител, пулированной человеческой сыворотки, бычьего сывороточного альбумина, бычьей сыворотки, компонентов культуральной среды, компонентов упаковывающей вектор клетки или плазмиды, бактерии, гриба, микоплазмы, IL-2 и IL-7.

В некоторых вариантах осуществления, модифицированные Т-клетки, описанные в настоящем описании, вводят субъекту, и затем отбирают кровь (или проводят аферез), Т-клетки оттуда активируют и повторно вводят посредством инфузии пациенту с модифицированными Т-клетками. Этот процесс, в некоторых вариантах осуществления, проводят множество раз каждые несколько недель. Т-клетки активируют из отборов крови от 10 до 400 см³. Т-клетки активируют из отборов крови 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 см³.

Модифицированные/сконструированные Т-клетки и/или фармацевтические композиции вводят способами, включающими, но без ограничения, аэрозольную ингаляцию, инъекцию, инфузию, прогла-

тывание, трансфузию, имплантацию или трансплантацию. Модифицированные Т-клетки и/или фармацевтические композиции вводят субъекту трансартериально, подкожно, внутрикожно, внутрь опухоли, внутрь узлов, интрамедуллярно, внутримышечно, посредством внутривенной (i.v.) инъекции, посредством внутривенной (i.v.) инфузии или внутрибрюшинно.

Модифицированные/сконструированные Т-клетки и/или их фармацевтические композиции вводят пациенту посредством внутрикожной или подкожной инъекции. Модифицированные/сконструированные Т-клетки и/или их фармацевтические композиции вводят посредством i.v. инъекции. Модифицированные/сконструированные Т-клетки и/или их фармацевтические композиции инъецируют непосредственно в опухоль, лимфатический узел или участок инфекции.

Модифицированные/сконструированные Т-клетки и/или фармацевтические композиции вводят в объеме приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 300, 400 или 500 мл.

Модифицированные/сконструированные Т-клетки и/или фармацевтические композиции вводят в объеме более чем максимум приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 300, 400 или 500 мл.

Модифицированные/сконструированные Т-клетки и/или фармацевтические композиции вводят в объеме по меньшей мере приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 300, 400 или 500 мл.

Фармацевтическую композицию получают известными по существу способами получения фармацевтически приемлемых композиций, которые вводят субъектам, таким образом, что эффективное количество Т-клеток объединяют в смеси с фармацевтически приемлемым носителем. Пригодные носители описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA, 2000). На этой основе композиции включают, но не исключительно, растворы веществ в ассоциации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, и содержащиеся в забуференных растворах с подходящим рН и изоосмотических с физиологическими жидкостями.

Пригодные фармацевтически приемлемые носители включают по существу химически инертные и нетоксичные композиции, которые не создают помех для эффективности биологической активности фармацевтической композиции. Примеры пригодных фармацевтических носителей включают, но без ограничения, воду, солевые растворы, растворы глицерина, хлорид N-(1(2,3-диолеилокси)пропил)N,N,N-триметиламмония (DOTMA), диолеилфосфатидилхолинэтаноламин (DOPE) и липосомы. В некоторых вариантах осуществления, такие композиции содержат терапевтически эффективное количество соединения, вместе с подходящим количеством носителя, таким образом, чтобы обеспечивать форму для прямого введения пациенту.

Фармацевтические композиции включают, без ограничения, лиофилизированные порошки или водные или неводные стерильные пригодные для инъекции растворы или суспензии, которые могут дополнительно содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатики и растворенные вещества, которые делают композиции по существу совместимыми с тканями или кровью намеченного реципиента. Другие компоненты, которые могут присутствовать в таких композициях, включают, например, воду, поверхностноактивные вещества (такие как Tween), спирты, полиолы, глицерин и растительные масла. Растворы и суспензии для немедленной инъекции можно получать из стерильных порошков, гранул, таблеток или концентрированных растворов или суспензий.

Фармацевтическую композицию, описанную в настоящем описании, составляют во множестве форм и вводят посредством ряда различных способов. Фармацевтический состав вводят перорально, ректально или парентерально, в составах, содержащих общепринятые носители, адъюванты и связующие, как желательно. Термин "парентерально", в рамках изобретения, включает способы подкожной, внутривенной, внутримышечной или интрастернальной инъекции и инфузии. Введение включает инъекцию или инфузию, включая внутриартериальное, интракардиальное, интрацеребровентрикулярное, внутрикожное, интрадуоденальное, интрамедуллярное, внутримышечное, внутрикостное, внутрибрюшинное, интратекальное, внутрисосудистое, внутривенное введение, введение в стекловидное тело, эпидуральное и подкожное введение), ингаляционное, чрескожное, трансмукозальное, подъязычное, буккальное и местное (включая накожное, кожное введение, введение посредством клизмы, глазных капель, ушных капель, интраназальное, вагинальное) введение. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, способ введения осуществляют посредством инъекции, такой как внутримышечная, внутривенная, подкожная или внутрибрюшинная инъекция.

Жидкие составы включают пероральный состав, внутривенный состав, интраназальный состав, глазной состав, ушной состав, аэрозоль и т.п. В конкретных вариантах осуществления, вводят комбинацию различных составов. В конкретных вариантах осуществления, композицию составляют для профиля замедленного высвобождения.

Способы лечения и использования.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам использования три-ТАС, описанных в настоящем описании, в лечении злокачественной опухоли у нуждающегося в

этом индивидуума. В некоторых вариантах осуществления, специфические для мишени лиганды из ТАС, описанных в настоящем описании, связываются с антигеном опухоли или опухолеассоциированным антигеном на клетке опухоли. В некоторых вариантах осуществления, специфические для мишени лиганды из ТАС, описанных в настоящем описании, избирательно связываются с антигеном опухоли или опухолеассоциированным антигеном на клетке опухоли. В некоторых вариантах осуществления, специфические для мишени лиганды из ТАС, описанных в настоящем описании, специфически связываются с антигеном опухоли или опухолеассоциированным антигеном на клетке опухоли. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой антиген опухоли. Примеры антигенов опухолей включают, но без ограничения, CD19, HER-2 (erbB-2), антиген созревания В-клеток (BCMA), альфафетопротеин (AFP), карциноэмбриональный антиген (CEA), CA-125, MUC-1, эпителиальный антиген опухоли (ЕТА), тирозиназу, ассоциированный с меланомой антиген (МАGE), простатспецифический антиген (PSA), ассоциированный с глиомой антиген, β-субъединицу хорионического гонадотропина человека, тиреоглобулин, RAGE-1, MN-CA IX, обратную транскриптазу теломеразы человека, RU1, RU2 (AS), карбоксилэстеразу кишечника, mut hsp70-2, M-CSF, простазу, PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, простеин, PSMA, сурвивин и теломеразу, антиген-1 опухоли карциномы предстательной железы (PCTA-1), ELF2M, эластазу нейтрофилов, CD22, инсулиновый фактор роста (IGF)-I, IGF-II, рецептор IGF-I и мезотелин.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли, экспрессирующей антиген-мишень, у нуждающегося в этом индивидуума, включающим введение индивидууму модифицированных Т-клеток, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой CD19. В некоторых вариантах осуществления, способ лечения злокачественной опухоли, экспрессирующей CD19, у нуждающегося в этом индивидуума включает введение индивидууму модифицированных Т-клеток, содержащих ТАС, содержащий нацеливающий на CD19 лиганд. В некоторых вариантах осуществления, примеры злокачественных опухолей, подвергаемых лечению посредством ТАС, содержащего нацеливающий на CD19 лиганд, включают, но без ограничения, В-клеточные злокачественные новообразования. В некоторых вариантах осуществления, примеры злокачественных опухолей, подвергаемых лечению посредством ТАС, содержащего нацеливающий на CD19 лиганд, включают, но без ограничения, В-клеточные лимфомы, острый лимфобластный лейкоз (ALL) и хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL). В некоторых вариантах осуществления, примеры злокачественных опухолей, подвергаемых лечению посредством ТАС, содержащего нацеливающий на CD19 лиганд, включают, но без ограничения, неходжскинскую лимфому (NHL).

В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой HER-2. В некоторых вариантах осуществления, способ лечения злокачественной опухоли, где клетка злокачественной опухоли экспрессирует HER-2, у нуждающегося в этом индивидуума включает введение индивидууму модифицированных Т-клеток, содержащих ТАС, содержащий нацеливающий на HER-2 лиганд. В некоторых вариантах осуществления, примеры злокачественных опухолей, подвергаемых лечению посредством ТАС, содержащего нацеливающий на HER-2 лиганд, включают, но без ограничения, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак яичника и рак желудка.

В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень представляет собой ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, способ лечения злокачественной опухоли, где клетка злокачественной опухоли экспрессирует ВСМА, у нуждающегося в этом индивидуума включает введение индивидууму модифицированных Т-клеток, содержащих ТАС, содержащий нацеливающий на ВСМА лиганд. В некоторых вариантах осуществления, примеры злокачественных опухолей, подвергаемых лечению посредством ТАС, содержащего нацеливающий на ВСМА лиганд, включают, но без ограничения, лейкоз, лимфомы и множественную миелому.

Кроме того, настоящее изобретение относится к использованию модифицированной Т-клетки, описанной в настоящем описании, в получении лекарственного средства для лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом индивидуума. Настоящее изобретение относится также к использованию смеси Т-клеток, содержащей модифицированные и немодифицированные клетки, или, содержащей различные популяции модифицированных клеток в присутствии или в отсутствие немодифицированных клеток. Специалисту в данной области понятно, что терапевтическое количество модифицированных Т-клеток не должно иметь гомогенный характер.

В некоторых вариантах осуществления, модифицированные Т-клетки, описанные в настоящем описании, являются частью комбинированной терапии. В некоторых вариантах осуществления, эффективность терапии, описанной в настоящем описании, оценивают множество раз. В некоторых вариантах осуществления, пациентов стратифицируют на основании ответа на лечение, описанное в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, эффективность лечения определяет вход в исследование.

В некоторых вариантах осуществления, злокачественные опухоли, подвергаемые лечению с использованием модифицированных Т-клеток, содержащих любой из ТАС, описанных в настоящем описании, включают любую форму неопластического заболевания. В некоторых вариантах осуществления, примеры злокачественных опухолей, подвергаемых лечению, включают, но без ограничения, рак молоч-

ной железы, рак легкого и лейкоз, например, лейкоз смешанного происхождения (MLL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) острый лимфобластный лейкоз (ALL). В некоторых вариантах осуществления, примеры злокачественных опухолей, подвергаемых лечению, включают, но без ограничения, крупноклеточную В-клеточную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности или крупноклеточную В-клеточную лимфому, возникающую из фолликулярной лимфомы. Другие злокачественные опухоли включают карциномы, бластомы, меланомы, саркомы, гематологические злокачественные опухоли, лимфоидные злокачественные новообразования, доброкачественные и злокачественные опухоли, и злокачественные новообразования. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль включает несолидные опухоли или солидные опухоли. В некоторых вариантах осуществления, злокачественные опухоли, подвергаемые лечению, включают опухоли, которые не являются васкуляризированными, или еще не являются значительно васкуляризированными, так же как васкуляризированные опухоли. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой солидную злокачественную опухоль или содержит солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой жидкую злокачественную опухоль или содержит жидкую опухоль. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак легкого, рак молочной железы, рак ободочной кишки, множественную миелому, глиобластому, злокачественную опухоль желудочно-кишечного тракта, рак яичника, рак желудка, колоректальный рак, рак уротелия, рак эндометрия или меланому. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак легкого. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак ободочной кишки. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой глиобластому. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль желудочно-кишечного тракта. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак яичника. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак желудка. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой колоректальный рак. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак уротелия. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой рак эндометрия. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой меланому.

045368

Таблица последовательностей

| SEQ ID NO | Описание | Нуклеотиды/аминокисло | |
|---------------|---|-----------------------|--|
| | | ты | |
| SEQ ID NO: 1 | Три-ТАС, конфигурация 1 | Нуклеотиды | |
| SEQ ID NO: 2 | Три-ТАС, конфигурация 1 | Аминокислоты | |
| SEQ ID NO: 3 | Три-ТАС, конфигурация 2 | Нуклеотиды | |
| SEQ ID NO: 4 | Три-ТАС, конфигурация 2 | Аминокислоты | |
| SEQ ID NO: 5 | Лидер muIgG (сигнал секреции) | Нуклеотиды | |
| SEQ ID NO: 6 | Лидер muIgG (сигнал секреции) | Аминокислоты | |
| SEQ ID NO: 7 | DARPin, специфический для антигена Her2 | Нуклеотиды | |
| SEQ ID NO: 8 | DARPin, специфический для антигена Her2 | Аминокислоты | |
| SEQ ID NO: 9 | Метка Мус | Нуклеотиды | |
| SEQ ID NO: 10 | Метка Мус | Аминокислоты | |
| SEQ ID NO: 11 | Линкер 1 | Нуклеотиды | |
| SEQ ID NO: 12 | Линкер 1 | Аминокислоты | |
| SEQ ID NO: 13 | UCHT1 ¹ | Нуклеотиды | |
| SEQ ID NO: 14 | UCHT1 ² | Аминокислоты | |
| SEQ ID NO: 15 | Линкер 2 | Нуклеотиды | |
| SEQ ID NO: 16 | Линкер 2 | Аминокислоты | |
| SEQ ID NO: 17 | Домен CD4 ³ | Нуклеотиды | |
| SEQ ID NO: 18 | Домен CD4 ⁴ | Аминокислоты | |
| SEQ ID NO: 19 | Линкер на основе CD4 | Нуклеотиды | |
| SEQ ID NO: 20 | Линкер на основе CD4 | Аминокислоты | |
| SEQ ID NO: 21 | OKT3 | Нуклеотиды | |
| SEQ ID NO: 22 | OKT3 | Аминокислоты | |
| SEQ ID NO: 23 | F6A | Нуклеотиды | |
| SEQ ID NO: 24 | F6A | Аминокислоты | |
| SEQ ID NO: 25 | L2K | Нуклеотиды | |
| SEQ ID NO: 26 | L2K | Аминокислоты | |
| SEQ ID NO: 27 | Соединитель с короткой спиралью | Нуклеотиды | |

045368

| SEQ ID NO: 28 | Соединитель с короткой спиралью | Аминокислоты |
|---------------|---|--------------|
| SEQ ID NO: 29 | Соединитель с длинной спиралью | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 30 | Соединитель с длинной спиралью | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 31 | Соединитель с большим доменом | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 32 | Соединитель с большим доменом | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 33 | ScFv, специфический для антигена BCMA | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 34 | ScFv, специфический для антигена BCMA | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 35 | ScFv, специфический для антигена CD19 | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 36 | ScFv, специфический для антигена CD19 | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 37 | Домен CD8α | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 38 | Домен CD8a | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 39 | Домен CD8α+R(β) | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 40 | Домен CD8α+R(β) | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 41 | Домен CD8 α +Lck | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 42 | Домен CD8 α +Lck | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 43 | huUCHT1 | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 44 | huUCHT1 | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 45 | huUCHT1 (Y177T) | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 46 | huUCHT1 (Y177T) | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 47 | huIgG | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 48 | huIgG | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 49 | huCD8a | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 50 | huCD8a | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 51 | 3625 scFv BCMA Vh-Vl | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 52 | 3625 scFv BCMA Vh-Vl | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 53 | 3625 scFv BCMA Vl-Vh | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 54 | 3625 scFv BCMA VI-Vh | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 55 | 3625 TAC-спираль-Vh-Vl huUCHT1 | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 56 | 3625 TAC-спираль-Vh-Vl huUCHT1 | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 57 | 3625 TAC-спираль-VI-Vh huUCHT1 | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 58 | 3625 TAC-спираль-VI-Vh huUCHT1 | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 59 | 3625 TAC-G ₄ S-Vh-Vl huUCHT1 | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 60 | 3625 TAC-G ₄ S-Vh-Vl huUCHT1 | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 61 | 3625 TAC-G ₄ S-VL-VH huUCHT1 | Нуклеотиды |
| L | l . | |

| SEQ ID NO: 62 | 3625 TAC-G ₄ S-VL-VH huUCHT1 | Аминокислоты |
|---------------|---|--------------|
| SEQ ID NO: 63 | CD19-TAC | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 64 | CD19-TAC | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 65 | huIgG Her2-TAC huUCHT1 | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 66 | huIgG Her2-TAC huUCHT1 | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 67 | CD8a Her2-TAC huUCHT1 | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 68 | CD8a Her2-TAC huUCHT1 | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 69 | Гибкий соединитель | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 70 | Гибкий соединитель | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 71 | UCHT1 (Y182T) | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 72 | UCHT1 (Y182T) | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 73 | Гибкий линкер G4S | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 74 | Линкер G4S3 | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 75 | muIgG Her2-TAC huUCHT1 | Нуклеотиды |
| SEQ ID NO: 76 | muIgG Her2-TAC huUCHT1 | Аминокислоты |
| SEQ ID NO: 77 | Линкер G ₄ S3 | Нуклеотиды |
| | | |

¹ Легкая цепь, нуклеотиды 1-324; линкер, нуклеотиды 325-387; тяжелая цепь, нуклеотиды 388-750.

Примеры

Следующие примеры приведены с целью иллюстрации различных вариантов осуществления изобретения и не предназначены для ограничения настоящего изобретения никаким образом. Настоящие примеры, вместе со способами, описанными в настоящем описании, являются в настоящее время репрезентативными для предпочтительных вариантов осуществления, являются иллюстративными и не предназначены для ограничения объема изобретения. Их изменения и другие применения, включенные в содержание изобретения, как определено посредством объема формулы изобретения, могут прийти на ум специалисту в данной области.

Пример 1. Характеризация технологии три-ТАС.

Обзор технологии три-ТАС представлен на фиг. 1А-1С.

На фиг. 1А показан пример активации CD8 Т-клетки на основе совместной сборки различных рецепторов и ассоциированных с ними белковых партнеров. Сначала, главный комплекс гистосовместимости I представляет антиген (спираль). Это узнает комплекс Т-клеточного рецептора (TCR), способный связывать антиген. Комплекс TCR содержит несколько индивидуальных субъединиц. Домены α/β являются способными взаимодействовать непосредственно с антигеном, представленным на МНС-I. Затем домены α/β взаимодействуют с несколькими другими доменами (ε, γ, δ и ζ, все из которых участвуют в активации Т-клетки посредством различных внутриклеточных активирующих доменов. Комплекс TCR взаимодействует с МНС-I одновременно с корецептором CD8. Корецептор CD8 связывается с МНС-I независимым от антигена образом. CD8 взаимодействует непосредственно с Lck, протеинкиназой, важной для активации комплекса рецептора TCR. Взаимодействие CD8 и Lck также обеспечивает их ассоциацию с микродоменами липидных рафтов (частью мембраны), которые, согласно гипотезе, организуют и инкапсулируют другие соответствующие передающие сигналы группы (темные сферы). Затем более поздние стадии активации приводят к привлечению CD28. Если этот каскад взаимодействий возникает параллельно несколько раз, Т-клетки становятся активированными и способны проявлять свои цитотоксические эффекты.

На фиг. 1В представлен обзор химерных рецепторов антигенов (CAR). В CAR стараются воспроизводить комплексный механизм активации Т-клетки посредством объединения нескольких ключевых активирующих доменов, таких как CD3 ζ , и CD28, в одной синтетически сконструированной молекуле. Затем CAR взаимодействует непосредственно с выбранным антигеном с использованием специфических связывающих доменов. На этой фигуре изображен белок с анкириновым повтором (DARPin). Считают, что несколько таких взаимодействий, возникающих параллельно, приводят к активации Т-клетки.

² Легкая цепь, аминокислоты 1-108; линкер, аминокислоты 109-128; тяжелая цепь, аминокислоты 129-250.

³ Внеклеточный линкер, нуклеотиды 1-66; трансмембранный домен, нуклеотиды 67-132; цитозольный домен, нуклеотиды 133-254.

⁴ Внеклеточный линкер, аминокислоты 1-22; трансмембранный домен, аминокислоты 23-44; цитозольный домен, аминокислоты 45 84.

Фиг. 1С представляет собой обзор технологии три-ТАС, имитирующей природный процесс активации. Три-ТАС разработан для лучшего воспроизведения природной передачи сигналов посредством ТСР, в то же время сохраняя нерестрицированное по МНС нацеливание. Активация Т-клетки происходит после связывания МНС посредством ТСК и Т-клеточного корецептора (либо CD4, либо CD8), которые одновременно связываются с консервативными областями молекулы МНС. Корецепторы специфически локализованы внутри "липидных рафтов", микродоменов мембраны, которые являются особенно важными для формирования передающего сигналы комплекса ТСР. В дополнение к обеспечению правильной локализации микродоменов активирующего комплекса TCR, эти корецепторы также связываются непосредственно с Lck, протеинкиназой, которая является критической для активации Т-клеток. Ни один из традиционных химерных рецепторов или бифункциональных белков не привлекает молекулы корецептора или Lck. Получена молекула, в которой трансмембранные и внутриклеточные области корецептора CD4, которые локализованы в липидном рафте и связывают Lck, соответственно, были слиты с одноцепочечным антителом, связывающим CD3 (UCHT1; SEQ ID NO: 13, 14 и его гомологи). Эта конструкция сконструирована для переноса молекулы СD3 и ТСR в области липидных рафтов и расположения Lck поблизости от TCR, сходным образом с природным связыванием МНС. Для нацеливания на этот рецептор, сконструированный анкириновый повтор (DARPin) связывали с химерой CD4-UCHT1 для получения трифункционального связывающего Т-клетку с антигеном средства (три-ТАС). В этом примере, DARPin являлся специфическим для протоонкогена, HER-2 (erbB-2).

Возможно множество конфигураций три-ТАС (фиг. 2A и 2B). В конфигурации 1 (фиг. 2A), антигенсвязывающий домен локализован на N-конце, соединенный со связывающим лиганд CD3 доменом и затем доменом корецептора. В конфигурации 2 (фиг. 2B) связывающий лиганд CD3 домен локализован на N-конце, соединенный с антигенсвязывающим доменом, который, в свою очередь, соединен с доменом рецептора.

Множество классов связывающих лиганд доменов можно включать в молекулу три-TAC (фиг. 3A-3D). Примеры в настоящем описании иллюстрируют общую схему конфигурации 1 три-TAC (фиг. 3A), три-TAC, несущий специфический для HER-2 DARPin (фиг. 3B), три-TAC, несущий специфический для CD19 scFv (фиг. 3C), и три-TAC, несущий специфический для BCMA scFv (фиг. 3D).

Фиг. 4A-4D иллюстрируют функциональность три-TAC, несущего специфический для HER-2 DARPin. Т-клетки человека модифицировали для экспрессии либо три-TAC, как описано в настоящем описании, либо общепринятого CAR с таким же DARPin. Определили, что, во всех аспектах, для Т-клеток, сконструированных с использованием три-TAC, показана функциональность, по меньшей мере эквивалентная общепринятому CAR. Интересно, что, применительно к 2 параметрам (продукции TNF-α и мобилизации CD107a), наблюдали, что три-TAC являлся более активным, чем общепринятый CAR, в некоторых условиях.

На фиг. 4А показана поверхностная экспрессия DARPin против HER-2-три-TAC, по сравнению с DARPin против HER-2-CAR и контрольными Т-клетками. Химерные рецепторы детектировали посредством инкубации с рекомбинантным HER-2. DARPin против HER-2-три-TAC хорошо экспрессировался на поверхности модифицированных Т-клеток. На фиг. 4В показан рост культур модифицированных Т-клеток. Т-клетки активировали с использованием Dynabeads против CD3/против CD28 и модифицировали с использованием лентивирусов, кодирующих три-TAC, CAR или без рецептора (контроль). Через 2 недели, CAR- и контрольные культуры выращивали до сходных количеств в то время как три-TAC-культуры росли немного более медленно. На фиг. 4С и 4D показаны функциональные признаки модифицированных Т-клеток. Т-клетки, модифицированные для экспрессии три-TAC или CAR, несущего HER-2 DARPin, стимулировали с использованием связанного с планшетом антигена. Т-клетки, модифицированные для экспрессии три-TAC и CAR, могли осуществлять все измеренные функции (продукцию TNF-α, продукцию IFN-γ и мобилизацию CD107a, фиг. 3C и 3D). Для Т-клеток, модифицированных с использованием три-TAC, показаны увеличенные частоты положительных по CD107a клеток после стимуляции, по сравнению с Т-клетками, модифицированными с использованием CAR (фиг. 3D), что позволяет предполагать увеличенную цитотоксичность на основании отдельных клеток.

На фиг. 6A-6J представлены данные, подтверждающие важность как связывающего лиганд домена, так и связывающего UCHT1 CD3 домена для функциональности три-TAC. Т-клетки были модифицированы с использованием полноразмерного три-TAC, несущего HER-2 DARPin (фиг. 6G, 6H, 6I, нижний ряд), варианта три-TAC, лишенного DARPin (фиг. 6A, 6B, 6C, верхний ряд), или варианта три-TAC, лишенного UCHT1 (фиг. 6D, 6E, 6F, средний ряд). Все популяции модифицированных Т-клеток стимулировали с использованием положительных по HER-2 клеток опухолей. Т-клетки, модифицированные с использованием полноразмерного три-TAC, могли продуцировать IFN-g, TNF- и IL-2 после стимуляции, в то время как для вариантов не удалось продуцировать какой-либо цитокин после стимуляции. Три популяции Т-клеток также культивировали совместно с клетками D2F2/E2 (экспрессирующими HER-2) или клетками D2F2 (отрицательными по HER-2) в соотношении эффектор: мишень 4:1 (фиг. 6J). Для Т-клеток, модифицированных с использованием полноразмерного три-TAC, показано надежное уничтожение клеток D2F2/E2, но не уничтожение клеток D2F2. Для других вариантов три-TAC, лишенных либо

DARPin, либо UCHT1, не показано уничтожения.

На фиг. 7A-7C показаны результаты для мышей, подвергнутых лечению с использованием контрольного вектора (NGFR), DARPin против HER-2 CAR или DARPin против HER-2-три-ТАС. Использовали модель ксенотрансплантата на мышах. Клетки опухоли OVCAR-3 вводили мышам подкожно и позволяли расти, пока опухоли не достигали размера 100-200 мм³. На фиг. 7A показано относительное прогрессирование опухоли, нормализованное по размеру опухоли на сутки лечения. Модифицированные с использованием DARPin против HER-2-три-ТАС Т-клетки вызывали быстрое уменьшение объема опухоли, контроль не оказывал эффекта, и клетки с CAR замедляли рост опухоли, и для них показано отсроченное уменьшение размера опухоли. Фиг. 7В иллюстрирует относительные изменения массы тела после инфузии Т-клеток. Как для контрольных, так и для модифицированных с использованием DARPin против HER-2-три-ТАС клеток, не показано значимых изменений массы тела мышей после лечения. В отличие от этого, для мышей после лечения DARPin против HER-2 CAR показана значимая потеря массы тела, показательная для тяжелой токсичности. Фиг. 7С иллюстрирует концентрации цитокинов в сыворотке мышей на сутки 7 после инфузии Т-клеток. Уровни цитокинов были выше у мышей после лечения CAR, по сравнению с мышами после лечения три-ТАС.

Пример 2. Замены UCHT1 влияют на функцию три-TAC.

Фиг. 8А-8Н иллюстрируют функциональность три-ТАС, несущих альтернативные связывающие CD3 домены. Домены перечислены на фиг. 8А и 8Е. Для три-ТАС, содержащих UCHT1 (фиг. 8В), ОКТ3 (фиг. 8В) и huUCHT1 (фиг. 8F), показана высокая поверхностная экспрессия, в то время как для три-ТАС, содержащих F6A (фиг. 8F) и L2K (фиг. 8F), выявлена более низкая поверхностная экспрессия. Для клеток, экспрессирующих три-ТАС, содержащий ОКТ3, показана низкая продукция цитокинов (фиг. 8С, 8С1) и промежуточная цитотоксичность (фиг. 8D) после связывания три-ТАС. Для клеток, экспрессирующих три-ТАС, содержащий F6A, показана сильная продукция цитокинов (фиг. 8G, 8G1) и цитотоксичность (фиг. 8H) после связывания три-ТАС. Для клеток, экспрессирующих три-ТАС, содержащий L2K, показана низкая продукция цитокинов (фиг. 8G, 8G1) и промежуточная цитотоксичность (фиг. 8H).

Фиг. 9А-9Н иллюстрирует поверхностную экспрессию ТСР на Т-клетках, модифицированных с использованием различных вариантов три-ТАС, показанных на фиг. 8А и 8Е. Для Т-клеток, модифицированных с использованием вариантов три-ТАС, содержащих ОКТЗ (фиг. 9А, 9Е и 9В, 9F) или L2К (фиг. 9С, 9G и 9D, 9H), показана более низкая поверхностная экспрессия ТСР, по сравнению с Т-клетками, модифицированными с использованием три-TAC, содержащих UCHT1 или huUCHT1, соответственно. В отличие от этого, для Т-клеток, модифицированных с использованием варианта три-ТАС, содержащего F6A, не выявлена понижающая регуляция TCR, по сравнению с три-TAC, несущим huUCHT1 (фиг. 9C, 9G и 9D, 9H). Замена F6A уменьшала поверхностную экспрессию рецептора три-ТАС, в то же время сохраняя умеренную продукцию цитокинов и цитотоксичность. Замена L2K умеренно уменьшала поверхностную экспрессию и уменьшала продукцию цитокинов, но сохраняла промежуточную цитотоксичность. Замена ОКТЗ приводила к высокой поверхностной экспрессии три-ТАС, низкой продукции цитокинов и промежуточной цитотоксичности. Эти данные показывают, что поверхностной экспрессии три-ТАС и эффекторным функциям Т-клетки не свойственна пропорциональность, и что замены доменов три-ТАС, в некоторых случаях, изменяют эффекторные функции, независимо от уровней поверхностной экспрессии. Можно предположить, что вариант ТАС с уменьшенной цитотоксичностью и низкой поверхностной экспрессией может являться полезным в конкретных клинических применениях.

Во многих случаях, замены scFv уменьшают способность модифицированной Т-клетки вырабатывать IFN-γ, TNF-α и IL-2, где модифицированные Т-клетки еще сохраняют способность уничтожать клетки-мишени. Избыточная продукция цитокинов ассоциирована с неблагоприятными событиями в клинических условиях, ограничивая современные технологии CAR опасными заболеваниями. Возможность модификации молекул ТАС для уменьшения для них продукции цитокинов, в то же время с сохранением умеренной цитотоксичности, может позволять получение рецепторов три-ТАС с точным уровнем реакционной способности, необходимой для удовлетворения клинической эффективности и безопасности.

Способность варианта три-TAC, содержащего ОКТ3, супрессировать поверхностную экспрессию TCR и продукцию цитокинов, в то же время с сохранением цитотоксичности, может являться очень полезной в аллогенных ситуациях, когда супрессия TCR может супрессировать реакцию трансплантат против хозяина.

Эти данные показывают, что замены scFv UCHT1 влияют на функцию три-TAC. Дополнительные модификации могут приводить к получению три-TAC, которые можно использовать в различных применениях (например, для онкологии, аутоииммунитета, аллергии).

Пример 3. Введение различных линкеров, соединяющих лиганд, связывающий комплекс TCR, с доменом связывающего мишень лиганда

Фиг. 10A, 10B иллюстрируют несколько вариантов TAC с различными линкерами, соединяющими лиганд, связывающий комплекс TCR, и домен связывающего мишень лиганда. Гибкий соединитель позволяет движение между двумя доменами. Соединитель с большим доменом содержит два свернутых домена и является очень большим и жестким. Соединители с короткой и длинной спиралью также вводят

жесткость, но являются менее ограничивающими, по сравнению с линкером с большим доменом.

Фиг. 11А-11Е иллюстрируют влияние замены соединителя на поверхностную экспрессию три-TAC, эффективность трансдукции три-TAC, и продукцию цитокинов после связывания три-TAC. На фиг. 11А и 11В показано, что спиральные линкеры увеличивают поверхностную экспрессию и эффективность трансдукции, по сравнению с гибким линкером, в то время как соединитель с большим доменом улучшает эффективность трансдукции, но не поверхностную экспрессию. Фиг. 11D, фиг. 11Е иллюстрирует продукцию цитокинов для клеток, экспрессирующих три-TAC с соединителями с короткой спиралью, с длинной спиралью, или с большим доменом.

Фиг. 12A иллюстрирует увеличенную цитотоксичность in vitro T-клеток, экспрессирующих три-TAC с соединителем с короткой спиралью. Фиг. 12B иллюстрирует усиленный контроль опухоли in vivo для T-клеток, экспрессирующих три-TAC с соединителем с короткой спиралью. Соединитель с короткой спиралью был ассоциирован с высокой цитотоксичностью in vitro и эффективным контролем опухоли in vivo.

Пример 4. Введение цитозольного домена CD8α/β.

Фиг. 13A иллюстрирует поверхностную экспрессию CD8α-три-TAC в паре с scFv против HER-2, или фиг. 13C - с DARPin против HER-2. Фиг. 13B иллюстрирует продукцию цитокинов Т-клетками, экспрессирующими CD8α три-TAC, в паре с scFv против HER-2 или DARPin против HER-2.

Фиг. 14A иллюстрирует мономер CD4 три-TAC и гетеродимер CD8 α / β . Корецепторы TCR, как CD4, так и CD8, несут функциональные домены, важные для функциональности корецептора. Эти области включают богатые аргинином области, согласно гипотезе, важные для ассоциации с липидным рафтом, и мотив CXCP, необходимый для связывания Lck. В отличие от CD4, который представляет собой мономер, корецептор CD8 представляет собой гетеродимер, состоящий из субъединиц α и β (фиг. 14A). Обе субъединицы α и β CD8 содержат богатые аргинином области, но только субъединица а содержит мотив CXCP.

На фиг. 14В-14D представлены схемы вариантов три-ТАС, включающих элементы из корецептора CD8, показанные на фиг. 14А. Цистеин, ответственный за димеризацию CD8α и CD8β, заменен на аланин во всех вариантах CD8-три-ТАС. Фиг. 14В представляет собой схему CD8α три-ТАС, содержащего мутацию цистеина до серина, для обеспечения распространения мономерного рецептора, и цитозольный домен CD8α. Фиг. 14С представляет собой схему CD8α+Rβ три-ТАС, содержащего мутацию цистеина до серина, для обеспечения распространения мономерного рецептора, и химерный цитозольный домен CD8α, где богатая аргинином область CD8α заменена на богатую аргинином область CD8β. Фиг. 14D представляет собой схему CD8β+Lck-три-ТАС, содержащего мутацию цистеина до серина, для обеспечения распространения мономерного рецептора, и химерный цитозольный домен CD8β, где домен СХСР CD8α, содержащий связывающий Lck мотив, добавлен к С-концу цитозольного домена CD8β.

Фиг. 15А-15D иллюстрируют различные фенотипические и функциональные признаки вариантов три-ТАС на основе CD8, по сравнению с прототипическим три-ТАС. Фиг. 15A-15B иллюстрируют поверхностную экспрессию вариантов CD8-три-ТАС, по сравнению с прототипическим три-ТАС. Поверхностная экспрессия являлась сравнимой среди различных три-ТАС. Фиг. 15С иллюстрирует цитотоксичность in vitro вариантов CD8-три-TAC при совместном культивировании с LOX IMVI (отрицательными по HER-2) и A549, SKOV3, SKBR3 или MBA MB 231 (все являются положительными по HER-2). Для всех Т-клеток, модифицированных с использованием три-ТАС, показана цитотоксичность. Фиг. 15D иллюстрирует деление клеток для Т-клеток, модифицированных с использованием либо вариантов CD8три-ТАС, либо прототипического три-ТАС (фиг. 15D). Фиг. 15Е иллюстрирует поверхностную экспрессию TCR для модифицированных Т-клеток, содержащих варианты CD8-три-TAC или прототипический три-ТАС. Все варианты три-ТАС оказывали сходный эффект на экспрессию ТСЯ. В то время как для корецептора СD4 показана хорошая поверхностная экспрессия и функциональность, как с scFv, так и с DARPin против HER-2, для конструкции CD8α показана активность только в контексте антигенсвязывающего домена DARPin. При тестировании различных цитозольных доменов CD8α, все конфигурации имели ключевые атрибуты последовательности, ассоциированные с функциональностью корецептора, (богатую аргинином область и СХСР). Для всех конструкций CD8α/β показана сходная активность, при сравнении с прототипом СD4. Это подчеркивает, что сохранение специфических биохимических свойств, таких как аффинность для липидного рафта и связывание Lck, является более важным для определения активности три-ТАС, чем конкретная последовательность цитозольного полипептида.

Рост Т-клеток, модифицированных с использованием $CD8\alpha+R(\beta)$ - и $CD8\beta+Lck$ -три-TAC, являлся значимо ослабленным, по сравнению с ростом Т-клеток, модифицированных с использованием других вариантов. Несмотря на значительное влияние на рост, для всех этих три-TAC показана сравнимая способность к активации Т-клеток. Уменьшенный рост для $CD8\alpha+R(\beta)$ - и $CD8\beta+Lck$ -три-TAC может обеспечивать преимущества для конкретного применения, где максимальное размножение Т-клеток не является желательным.

Пример 5. Разработка конструкции CD19-TAC.

Фиг. 16 иллюстрирует ступенчатую разработку конструкции CD19-TAC. Получают несколько поколений лентивирусных векторов с различными изменениями в дизайне элементов для обеспечения специфичности для CD19, надлежащей экспрессии TAC и продукции лентивируса квалификации GMP. Каждая рамка представляет лентивирусный вектор и определяет 3 главных элемента дизайна: (A) антигенсвязывающий домен, (B) TCR/CD3-связывающий домен, и (C) домен корецептора. Затемненные области указывают домены, являвшиеся объектом модификации в ходе процесса разработки вектора.

TAC на первой стадии содержит специфический для HER-2 сконструированный с анкириновым повтором белок (DARPin), мышиный UCHT1, специфический для CD3 scFv, и гибкий трансмембранный и цитозольный полипептид CD4. TAC клонируют в лентивирусный вектор pCCL4.

Для получения специфического для CD19 три-TAC, специфический для HER-2 DARPin заменяли полипептидом, содержащим N-концевой лидерный пептид CD8α, слитый с scFv против CD19. Тяжелые и легкие цепи CD19 scFv были соединены посредством глицин-сериновой линкерной области.

Домен UCHT1 заменяли гуманизированным вариантом (huUCHT1) для уменьшения иммуногенности. Для этой конструкции TAC показаны уровни поверхностной экспрессии, превосходящие ее предшественника

Для дальнейшего улучшения экспрессии рецептора на клеточной поверхности Т-клеток без нарушения функциональности, две отдельные модификации оценивали параллельно. Для увеличения стабилизации одиночной цепи, линкер G4S (SEQ ID NO: 73), использованный в scFv против CD19, заменяли на более структурированный линкер Уитлоу. Отдельно, мутацию Y177T вводили в домен huUCHT1. Оба способа увеличивали экспрессию рецептора TAC, и рецептор получали с использованием как линкера Уитлоу, так и мутации Y177T.

Фиг. 17 иллюстрирует вставку CD19-TAC в лентивирусный вектор рССL. Вектор рССL характеризуется двунаправленной промоторной системой с ΔNGFR(hu) под контролем промотора mCMV и экспрессией TAC, управляемой промотором EF-1α. ΔNGFR(hu) представляет собой укороченный CD271 человека (член 16 суперсемейства рецептора фактора некроза опухоли), с трансмембранным доменом, но лишенный цитозольного передающего сигналы домена. Продукт экспрессии ΔNGFR(hu) используют для количественной оценки лентивирусной трансдукции. Открытая рамка считывания CD19-TAC#921 увеличена, чтобы показать ключевые элементы конструкции TAC: лидер CD8α, одиночную цепь FMC63 (scFv против CD19), метку с-Мус человека, huUCHT1 (Y177T) и домен ACD4. Мутация huUCHT1 (Y177T) была идентифицирована посредством проверки точечных мутаций, случайным образом введенных в остатки поверхности связывания мышиного UCHT1 - CD3-эпсилон. При скрининге успешно идентифицирована мутация (Y177T). Мутация (Y177T) приводит к лучшей поверхностной экспрессии три-TAC, в то же время сохраняя активацию Т-клетки. ACD4 лишен четырех внеклеточных подобных иммуноглобулину доменов CD4 и сохраняет внеклеточный линкер, трансмембранный и цитозольный домены.

Для получения лентивирусного вектора квалификации GMP, конструкцию CD19-три-TAC клонировали в новый лентивирусный вектор под контролем промотора MSCV. Конструкция CD19-три-TAC является такой, как описано на фиг. 17.

Пример 6. Возможность промышленного получения экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток из различного донорного материала.

Фиг. 18 иллюстрирует эффективность экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток, полученных от множества доноров. Экспрессирующие CD19-TAC Т-клетки получали с использованием Т-клеток от трех различных доноров, и тестировали в модели опухоли NALM-6. Мышей, несущих развившиеся опухоли NALM-6, подвергали лечению с использованием однократной дозы 4×10⁶ экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток. Для контрольных мышей показано быстрое разрастание опухоли, где все мыши достигли конечной точки к концу исследования. Продукты Т-клеток от доноров 1 и 2 приводили к полному контролю у всех мышей. Продукт Т-клеток от донора 3 приводил к надежному контролю опухоли у всех мышей и длительному контролю у 2/4 подвергнутых лечению мышей. Исследование подтверждает, что отторжения опухоли достигают посредством экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток, происходящих от множества здоровых доноров. Результаты для модели опухоли NALM-6 на фиг. 18 позволяют предполагать, что эффективный CD19-TAC получен из материалов из множества донорских источников.

Пример 7. Цитотоксичность in vitro и эффективность in vivo экспрессирующих CD19-TAC Тклеток

Для оценки способности CD19-TAC эффективно привлекать различные положительные по CD19 клетки, модифицированные с использованием три-TAC-Т-клетки культивировали совместно с NALM-6 (острый лимфобластный лейкоз), Raji (лимфома Беркитта) или Jeko-1 (лимфома из клеток мантийной зоны). Клетки NALM-6, Jeko-1 и Raji модифицировали с использованием усиленной люциферазы светляка, чтобы позволить отслеживание опухолевой нагрузки in vitro и в живом животном посредством биолюминесцентной визуализации.

Фиг. 19А-19С иллюстрирует уничтожение линий клеток опухолей посредством экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток. Эффекты являлись зависимыми от дозы и увеличивались с увеличением соотношений эффектора к мишени (E:T). В качестве отрицательного контроля, использовали клетки, модифициро-

ванные с использованием АТАС (лишенного антигенсвязывающего домена), или нетрансдуцированные Т-клетки.

Эти результаты показывают, что экспрессирующие CD19-TAC Т-клетки уничтожают положительные по CD19 клетки опухолей.

Фиг. 19D-19G иллюстрирует дизайн и исход исследования in vivo, оценивающего эффективность CD19-TAC у мышей с трансплантированными жидкими опухолями NALM-6 (острый лимфобластный лейкоз), Raji (лимфома Беркитта) или Jeko-1 (лимфома из клеток мантийной зоны). Для инициации развития опухолей NALM-6, Raji и Jeko-1, мышам инокулировали клетки NALM-6, Raji или Jeko-1, и содержали 4 или 7 суток, соответственно, чтобы обеспечить приживление опухолей. На сутки 4 или 7, экспрессирующие CD19-TAC Т-клетки вводили в форме внутривенной инъекции в хвостовую вену. Опухолевую нагрузку измеряли с еженедельными интервалами, и данные наносили на график как среднее излучение [ф/с/см^2/ср].

Фиг. 19Е-19G иллюстрирует, что модифицированные посредством CD19-TAC Т-клетки являются эффективными для индукции регрессии опухоли и длительного контроля опухоли для жидких опухолей NALM-6 (острый лимфобластный лейкоз), Raji (лимфома Беркитта) или Jeko-1 (лимфома из клеток мантийной зоны).

Результаты для моделей опухолей NAML-6, Raji или Jeko-1 на фиг. 19A-19G позволяют предполагать, что CD19-TAC является эффективным во множестве моделей положительных по CD19 опухолей.

Пример 8. Персистенция экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток и длительный иммунитет против опухоли.

Фиг. 20A, 20B иллюстрируют персистенцию иммунитета против опухоли и устойчивость к повторному заражению у мышей, которым вводили экспрессирующие CD19-TAC Т-клетки. Мышей, несущих развившиеся опухоли NALM-6, подвергали лечению с использованием экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток.

Фиг. 20А иллюстрирует разработку эксперимента для определения персистенции CD19-TAC у мышей. Мышей, которым сначала инокулировали клетки NALM-6, за чем следовал период приживления 4 суток, подвергали лечению с использованием CD19-TAC. Для всех мышей показана регрессия опухоли и полный контроль опухоли. Через 56 суток после начального лечения, мышей повторно заражали жидкими опухолями либо NALM-6 (положительной по CD19), либо KMS11 (отрицательной по CD19). Во всех случаях, наивных мышей подвергали совместной инъекции клеток опухолей и использовали в качестве отрицательного контроля. Опухолевую нагрузку отслеживали посредством сигнал люминесценции.

Фиг. 20В. Мышей, несущих развившиеся опухоли NALM-6, подвергали лечению с использованием экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток, введенных в форме дробной дозы, всего 4×10⁶ модифицированных клеток. В качестве контроля, использовали группу животных без лечения. После АСТ, у подвергнутых лечению мышей проявлялись длительные противоопухолевые ответы. В отличие от этого, для контрольных мышей показано экспоненциальное увеличение масс опухолей и достижение связанной с опухолевой нагрузкой конечной точки. На сутки 56 после АСТ, мышей повторно заражали либо клетками опухоли NALM-6 (положительными по CD19), либо клетками опухоли KMS11 (отрицательными по CD19). Подвергнутые лечению с использованием CD19-TAC мыши оставались защищенными от клеток опухоли NALM-6 (положительных по CD19), но не от клеток опухоли KMS11 (отрицательных по CD19) й

Результаты экспериментов повторного заражения на фиг. 20A и 20B позволяют предполагать, что CD19-TAC, в некоторых случаях, подвергаются дифференцировке в долгоживущие клетки памяти, сохраняющие противоопухолевые свойства.

Пример 9. Размножение in vivo и зависимость от дозы для экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток.

Фиг. 21 и 22 иллюстрируют зависимость от дозы, режим дозирования (дробный или однократный) и размножение экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток в модели злокачественной опухоли NALM-6. Фиг. 21A иллюстрирует дизайн эксперимента. Мышам вводили либо однократную дозу экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток на сутки четыре после инокуляции опухоли, либо дробную дозу, доставляемую с интервалом в семь суток. Тестировали множество доз экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток: 0.5×10^6 , 1×10^6 и 4×10^6 клеток. Фиг. 21В в контрольных группах мышей вводили 4×10^6 нетрансдуцированных клеток или среды для замораживания (контрольный носитель).

Фиг. 21В иллюстрируют выживаемость мышей после инъекции NALM-6 и инъекции CD19-TAC. Зависимую от дозы стимуляцию выживаемости наблюдали в группах как однократной дозы, так и дробной дозы, где введение наивысшей однократной дозы ограничивало рост опухоли и стимулировало выживаемость мышей.

Фиг 22А иллюстрирует способ отбора, использованный для оценки пролиферации Т-клеток. Клетки сначала отбирали на основании прямого и бокового рассеяния для отбора популяции лимфоцитов. Синглеты клеток идентифицировали посредством области прямого рассеяния, превышающей отбор по высоте. Живые клетки идентифицировали посредством отбора в ближнем ИК. Клетки человека идентифицировали посредством отбора по hCD45. Из полученной подгруппы клеток далее отделяли положительные

по CD3 клетки. Затем эти клетки отбирали посредством CD4/CD8 и белка L. Способ окрашивания также включал идентификацию мышиных клеток крови по muCD45_l. CD19 включали для окрашивания клеток NALM-6.

Фиг. 22В - размножение Т-клеток мышей после дробной дозы адаптивного переноса Т-клеток (АСТ). После АСТ, образцы крови отбирали регулярно и анализировали посредством проточной цитометрии. Значения нормализовали по количеству тотальных Т-клеток, присутствующих в крови после АСТ1. Значения также нормализовали по общему количеству CD45.1+ (мышиных) клеток для учета различий в отборах крови. Для Т-клеток у мышей, подвергнутых лечению с использованием модифицированных посредством CD19-TAC клеток, показано размножение у мышей-реципиентов в пределах приблизительно 1-2 недель после первой АСТ (фиг. 22В). Нетрансдуцированные клетки не размножались (фиг. 22В).

Результаты для различных доз, режимов дозирования (фиг. 21В) и количеств Т-клеток (фиг. 22В) позволяют предполагать, что эффективность CD19-TAC является зависимой от дозы, что модифицированные Т-клетки размножаются in vivo, и что это размножение является специфическим для модифицированных посредством CD19-TAC клеток у животных, несущих положительные по CD19 опухоли.

Пример 10. Эффективность in vivo, длительная эффективность и безопасность лечения посредством CD19-TAC

На фиг. 23-25 показана длительная безопасность и эффективность (фиг. 23) и отсутствие какойлибо острой ассоциированной с лечением токсичности (фиг. 24, 25).

Фиг. 23A иллюстрирует дизайн эксперимента. Мышам инъецировали 0.5×10^6 модифицированных с использованием усиленной люциферазы клеток NALM-6, которым позволяли приживаться в течение 4 суток. Затем мышей подвергали лечению с использованием двух уровней дозирования (4 и 12×10^6 модифицированных клеток) модифицированных посредством CD19-TAC Т-клеток, при введении в однократной дозе. Рост опухоли затем отслеживали посредством регулярных измерений люминесценции. Состояние здоровья мышей регулярно оценивали посредством проверки поведения мышей и физических характеристик (ухода за шерстью, подвижности, целостности меха)

Фиг. 23В иллюстрирует опухолевую нагрузку по люминесценции после лечения только носителем (средами для замораживания), немодифицированными контрольными клетками (дозой тотальных Т-клеток, равной дозе тотальных Т-клеток из группы лечения наивысшей дозой модифицированных клеток) и либо 4, либо 12×10^6 модифицированных посредством сконструированного CD19-TAC Т-клеток. Для обоих видов контроля показано быстрое разрастание опухоли и отсутствие противоопухолевой эффективности. Контрольная доза приводит к задержке разрастания опухоли, по сравнению только с носителем, предположительно, из-за конкуренции между высокой дозой Т-клеток и клетками опухолей за ниши для приживления. Для модифицированных Т-клеток показана регрессия опухоли, во всех случаях. Для группы лечения 4×10^6 показаны 3 мыши с полным контролем, одна с задержкой разрастания опухоли и одна с контролируемой, но высокой опухолевой нагрузкой.

Фиг. 23С иллюстрирует общую выживаемость для различных групп лечения. В обеих контрольных группах мышей, с носителем и без модификации, все мыши погибли из-за опухоли в пределах 23-35 суток, соответственно. В случае лечения высокой дозой CD19-TAC, у всех мышей развились симптомы GvHD, и они погибли от GvHD в пределах 61 суток. GvHD представляет собой последствие собственно модели на мышах, а не лечения с использованием модифицированных Т-клеток. Для мышей с низкой дозой показана выживаемость 3 мышей до окончания исследования на 90 сутки, одна мышь погибла из-за высокой опухолевой нагрузки, одна мышь погибла из-за GvHD.

Фиг. 24 и 25 иллюстрируют параметры клинической химии и уровни цитокинов для мышей, подвергнутых лечению контрольным носителем, не модифицированными клетками и CD19-TAC (4 и 12×10⁶ эффективных модифицированных посредством CD19-TAC клеток). Мышей отслеживали в течение 33 суток с использованием образцов крови, отобранных через 5, 12 и 33 суток после АСТ. Только мыши, подвергнутые лечению CD19-TAC, выживали в течение 33 суток. Мыши с контрольным носителем погибали от опухолевой нагрузки до того, как можно было отобрать 3^{-й} образец, мышей с немодифицированными клетками умерщвляли рано на сутки 26, непосредственно перед тем, как мыши достигали связанной с опухолевой нагрузкой конечной точки. Все образцы крови анализировали по нескольким параметрам клинической химии и уровням цитокинов.

Фиг. 24 иллюстрирует, что на сутки 5 и 12, для мышей, подвергнутых лечению CD19-TAC, не показано параметра, который является значимо более высоким, по сравнению с контрольными группами. На сутки 33, для всех подвергнутых лечению мышей показаны параметры клинической химии, сравнимые с ранними временными точками лечения, за исключением аланинаминотрансферазы (ALT) и аспартатаминотрансферазы (AST), где некоторые мыши испытывали высокие уровни, подобно мышам, подвергнутым лечению с использованием немодифицированными клеток, с образами, отобранными на сутки 26.

Фиг. 25 иллюстрирует ответ цитокинов на сутки 5, 12 и 33. На сутки 5 после АСТ, для CD19-TAC, но не для контрольных мышей, показано увеличение уровней всех тестированных цитокинов. Увеличе-

ние уровня цитокинов согласуется с воспалительным ответом модифицированных посредством CD19-TAC Т-клеток, узнающих и вступающих в реакцию с положительными по антигену клетками опухоли NALM-6. После их первоначальной реакции на сутки 12, уровни цитокинов падают, что коррелирует с индуцированной к этому времени регрессией опухоли и, как правило, низкой опухолевой нагрузкой. На сутки 12 уровни цитокинов для лечения CD19-TAC являются либо сходными, либо более низкими, чем для немодифицированных Т-клеток, за исключением IL10. На более поздней стадии, для всех мышей, подвергнутых лечению с использованием нетрансдуцированных или модифицированных посредством CD19-TAC Т-клеток, показано увеличение уровня цитокинов, предположительно, ассоциированное с началом GvHD. См. также фиг. 29, которая иллюстрирует ответ цитокинов на сутки 5, 12, 26 и 33.

Результаты длительного отслеживания мышей, подвергнутых лечению с использованием CD19-TAC, и их профилей клинической химии, показывают, что модифицированные Т-клетки являются безопасными и для них не показано никаких показателей токсичности, вызванной специфически модификацией CD19-TAC. Результаты исследования цитокинов показывают ранний воспалительный ответ, ассоциированный с противоопухолевой эффективностью, за которым следует падение уровней всех цитокинов, что позволяет предполагать контролируемый воспалительный ответ.

Пример 11. Эффективность in vivo нескольких вариантов BCMA-три-TAC.

Фиг. 26 иллюстрирует исследование эффективности in vivo различных конструкций ВСМА-три-ТАС. Фиг. 26А иллюстрирует общий дизайн эксперимента. 1 миллиону модифицированных посредством люциферазы клеток опухолей КМS11 (положительных по ВСМА) позволяли приживаться в течение 12 суток. Затем мышей подвергали лечению с использованием однократной эффективной дозы 4 миллиона конструкций для ВСМА и контроля (фиг. 26В). Опухолевую нагрузку регулярно оценивали посредством измерений люминесценции. Всех мышей, для которых показана регрессия опухоли и контроль опухоли, затем повторно заражали на сутки 25 после АСТ с использованием 1 миллиона клеток КМS11.

Фиг. 26С. После АСТ, для контрольных мышей показано быстрое разрастание клеток опухолей, достигающее ассоциированной с опухолью конечной точки в пределах 19-25 суток. В отличие от этого, для всех мышей, подвергнутых лечению с использованием BCMA-TAC, показана начальная регрессия опухоли. Контроль опухоли менялся среди конструкций, где для G4S (SEQ ID NO: 73) 3625VH-VL показан самый низкий уровень начального контроля опухоли, и для 3625 VL-VH с короткой спиралью показан самый высокий уровень начального контроля опухоли. После повторного заражения, большинство из всех конструкций, сохраняющих контроль опухоли до суток 25, оставались защитными после повторного заражения.

Результаты этого исследования in vivo показывают, что множество конструкций BCMA-три-TAC являются эффективными для контроля жидких опухолей KMS11 (положительных по BCMA). Но при этом, конкретные предпочтительные конфигурации обеспечивают превосходящую эффективность. Как правило, спиральная область соединителя обеспечивает относительное преимущество, по сравнению с гибким линкером внутри той же самой конфигурации scFv.

Пример 12. TAC-Her2 in vivo.

Мышам инокулируют в задний пах солидные опухоли OVCAR3. Опухолям позволяют развиться и расти до размера 100 мм³. Затем мышей подвергают лечению с использованием инъекции в хвостовую вену модифицированных посредством TAC-Her2 Т-клеток. Объем опухоли измеряют регулярно.

Пример 13. Клинические исследования.

Проводили клиническое исследование, в котором субъектов в возрасте по меньшей мере 18 лет с положительной по CD19 диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой, для которых были неудачными по меньшей мере две предшествующих линии терапии, включая ASCT, или которые являются неподходящими для ASCT, подвергали лечению с использованием экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток. Исследование представляет собой открытое двухстадийное исследование фазы 1/2, с одной группой, характеризующееся стадией повышения дозы для определения максимально переносимой дозы (МТD) или рекомендованной дозы для фазы II (RPh2D), с последующей расширением когорты для выбранной дозы.

После регистрации, субъектов подвергают лейкаферезу для получения Т-клеток для получения экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток. После успешного получения, субъектов переводят в фазу лечения. Эта фаза включает противолимфоцитарную химиотерапию флударабином и циклофосфамидом, с последующим внутривенным (IV) введением экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток. После лечения экспрессирующими CD19-TAC Т-клетками, субъектов переводят в отслеживание после лечения и отслеживают по безопасности, статусу заболевания и выживаемости в течение 2 лет после их последней дозы экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток. После завершения исследования, субъектов отслеживают по выживаемости, длительной токсичности и безопасности вирусного вектора по отдельному протоколу длительного отслеживания в течение вплоть до 15 лет после последней дозы экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток.

Во всех группах, безопасность оценивают на протяжения исследования. Размножение Т-клеток оценивают от времени первой дозы экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток до тех пор, пока клетки не перестанут дальше поддаваться детекции. Радиографическую оценку заболевания проводят посредством

сканирований позитронной эмиссионной томографии (РЕТ) и/или компьютерной томографии (СТ) до лечения и приблизительно через 3, 6, 9, 12, 18 и 24 месяцев после последней дозы экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток, или до прогрессирования заболевания, или до лечения с использованием дополнительной противораковой терапии.

Пример 14. Изготовление фармацевтических продуктов из экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток.

Способ изготовления фармацевтических продуктов из экспрессирующих CD19-TAC Т-клеток включает отбор CD4/CD8 Т-клеток из продукта лейкафереза, активацию положительных по CD4/CD8 клеток, трансдукцию клеток лентивирусным вектором, содержащим конструкцию CD19-TAC (как описано в примере 5), размножение трансдуцированных клеток до уровня, адекватного для предполагаемого расписания дозирования, и сбор и криоконсервацию конечного продукта.

Материал после лейкафереза от пациента с ассоциированным с ним уникальным идентификатором субъекта (UPN) получают в производственном участке и присваивают уникальный номер образца (ISN). Отобранные CD4/CD8 клетки криоконсервируют до начала стадий способа культивирования.

Криоконсервированные положительно отобранные по CD4/CD8 Т-клетки размораживают при 37° С, ресуспендируют в подходящей среде и рассевают в культуральные пакеты с активирующими реагентами, культуры инкубируют в течение ночи при 37° С/5% CO₂.

Клетки трансдуцируют с использованием лентивирусного вектора CD19-TAC с подходящей множественностью инфекции (MOI) и инкубируют в течение ночи при 37°C/5% CO₂. В последующие несколько суток, культуру дополняют полной средой для поддержания желательной концентрации клеток и в конечном счете пулируют в пакеты для переноса, осаждают, ресуспендируют и рассевают в большие культуральные пакеты при целевой плотности клеток.

Для состава фармацевтического продукта, собранную суспензию клеток ресуспендируют в наполнителе и криоконсервируют с использованием замораживателя с контролируемой скоростью, затем переносят в хранилище с LN2.

Продукт транспортируют до клинического центра в замороженном состоянии, размораживают на месте лечения пациента и вводят внутривенно.

Перед клиническими исследованиями, проводят мероприятия по технологической подготовке производства, включая все тестирования в ходе технологического процесса и при выпуске продукции, с использованием материала после лейкафереза от здорового донора. В дополнение к тестированию в ходе технологического процесса и при выпуске продукции, исследования, поддерживающие отчеты регулирующим органам, проводят для конечного фармацевтического продукта из этих мероприятий по технологической подготовке. Эти исследования включают стабильность после размораживания, инициацию длительной стабильности, тестирование на остаточное содержание, чтобы убедиться в клиренсе стимулирующих рост цитокинов, и раннюю оценку потенциальной функциональности/показывающие активность анализы.

Пример 15. Доклиническая разработка терапии специфическим для BCMA связывающим Т-клетку с антигеном агентом (TAC) для лечения положительных по BCMA злокачественных новообразований.

Фиг. 27 иллюстрирует, что ТАС осуществляют пролиферацию, когда сталкиваются с антигеном на клетках, но не когда антиген представлен на искусственных бусинах; но CAR осуществляют пролиферацию, независимо от того, представлены ли антигены на бусинах или клетках.

Фиг. 28A, 28В иллюстрируют, что модифицированные посредством ТАС Т-клетки размножаются in vivo и обеспечивают длительную защиту, показывая персистенцию клеток в модели миеломы. Фиг. 28A, 28В иллюстрируют, что ВСМА-ТАС-Т-клетки приводят к отторжению опухоли множественной миеломы в модели ксенотрансплантата КМS-11, сконструированной с использованием NanoLuc (КМS 11-NanoLuc) (ВСМА^{пол}). После приживления опухоли, мышей подвергали лечению с использованием ВСМА-ТАС-Т-клеток (несущих люциферазу светляка). ТАС-Т-клетки значительно размножались после введения. Это коррелирует с регрессией опухоли. Подвергнутые лечению мыши являлись устойчивыми к повторному заражению опухолью, что указывает на длительную персистенцию ТАС-Т-клеток.

Эти данные иллюстрируют, что TAC-Т-клетки разрушают клетки опухолей, вероятно, посредством механизма, имитирующего природный процесс активации Т-клетки. Технология TAC иллюстрирует 1) сильную эффективность в жидкости, 2) пролиферацию in vivo, 3) персистенцию Т-клеток, защищающих мышей от повторного заражения, и 4) размножение клеток после введения Т-клеток.

Пример 16. Активность in vivo и in vitro hu- или $muIg\kappa$ -HER2-TAC c промотором MSCV или $EF1\alpha$.

СD4 и CD8 Т-клетки были модифицированы с использованием множества экспрессирующих TAC вирусов. Одна группа клеток была модифицирована с использованием лентивируса, в котором использован промотор MSCV для экспрессии TAC, специфического для HER-2, в котором использован сигнальный пептид мышиного IgG [mulgG-TAC (MSCV)]. Другая группа клеток была модифицирована с использованием лентивируса, в котором использован промотор MSCV для экспрессии TAC, специфического для HER-2, в котором использован сигнальный пептид человеческого IgG [hulgG-TAC (MSCV)]. Третья группа клеток была модифицирована с использованием лентивируса, в котором использован промотор EF1 α для экспрессии TAC, специфического для HER-2, в котором использован сигнальный пептид

мышиного IgG [muIgG-TAC (EF1α)]. В качестве отрицательного контроля, использовали конструкцию TAC, лишенную связывающего HER2 домена (Δ связывающий домен TAC). Затем модифицированные клетки характеризовали in vitro по измененной поверхностной экспрессии и специфической активности, и in vivo по активности в модели положительной по HER2 солидной опухоли OVCAR3.

Фиг. 30 иллюстрирует поверхностную экспрессию на Т-клетке рецепторов HER2-TAC с лидером из человеческого или мышиного IgG, под контролем промотора MCSV или EF1α. Поверхностная экспрессия является ключевым требованием для биологической активности, и это иллюстрирует, что на экспрессию рецепторов HER2-TAC не влияет вид - источник сигнального пептида IgG.

На фиг. 31 показано, что Т-клетки, модифицированные с использованием конструкций HER2-TAC с лидером либо из человеческого, либо из мышиного IgG, под контролем промотора MCSV или EF1α, индуцируют продукцию цитокинов, при совместном культивировании с положительными по HER2 клетками-мишенями (OVCAR3), но не с отрицательными по HER2 клетками (LOX IMVI). Это показывает, что модифицированные с использованием рецептора HER2-TAC Т-клетки являются способными к специфическому привлечению экспрессирующих HER2 клеток-мишеней, но не являются реакционноспособными против отрицательных по антигену клеток.

На фиг. 32 показана эффективность in vivo конструкций HER2-TAC с лидером из человеческого или мышиного IgG, под контролем промотора MCSV или EF1 α . После введения дробной дозы модифицированных Т-клеток, для модифицированных с использованием HER2-TAC клеток показано значительное влияние на рост опухоли, включая регрессию опухоли, по сравнению с отрицательным контролем Δ связывающий домен TAC. Этот эксперимент in vivo показывает, что для всех модифицированных с использованием HER2-TAC клеток показана значительная активность против солидной опухоли в модели in vivo.

В то время как предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения показаны и описаны в настоящем описании, специалисту в данной области очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Многочисленные варианты, изменения и замены в настоящее время очевидны специалисту в данной области без отклонения от изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы вариантам осуществления изобретения, описанным в настоящем описании, можно использовать в практическом осуществлении изобретения. Подразумевают, что следующие ниже пункты формулы изобретения определяют объем изобретения, и что способы и структуры в пределах объема этих пунктов формулы изобретения и их эквивалентов охвачены таким образом.

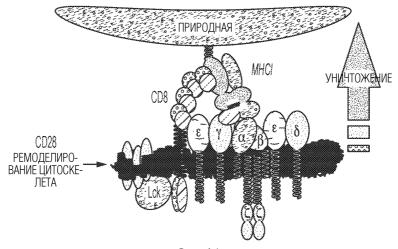
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 1. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CD19 связывающий Т-клетку с антигеном агент (CD19-TAC), содержащая:
 - (а) первый полинуклеотид, кодирующий лиганд, избирательно связывающий антиген CD19;
- (b) второй полинуклеотид, кодирующий лиганд UCHT1, связывающий CD3, где лиганд UCHT1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 46, и имеет мутацию Y177T, как определено в SEQ ID NO: 46; и
- (c) третий полинуклеотид, кодирующий полипептид передающего сигналы домена TCR, содержащий цитозольный домен и трансмембранный домен;

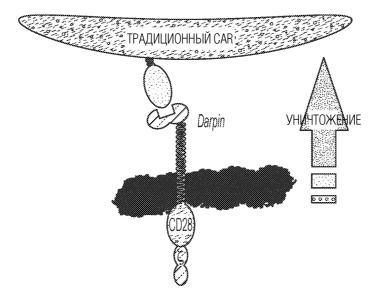
где компоненты, кодируемые (а), компоненты, кодируемые (b), и компоненты, кодируемые (c), слиты непосредственно друг с другом, или соединены посредством по меньшей мере одного линкера.

- 2. Последовательность нуклеиновой кислоты по п.1, где лиганд, избирательно связывающий антиген CD19, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 36.
- 3. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп.1, 2, где цитозольный домен представляет собой цитозольный домен CD4, и трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD4.
- 4. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-3, где третий полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18.
- 5. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-4, где последовательность нуклеиновой кислоты включает последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63.
- 6. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-5, где CD19-TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEO ID NO: 64.
- 7. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-6, не кодирующая костимулирующий домен.
- 8. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-7, не кодирующая активирующий домен.

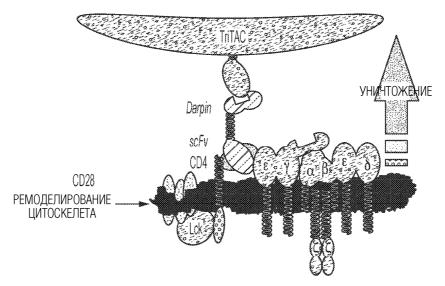
- 9. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая связывающий Т-клетку с антигеном агент (TAC), содержащая:
- (а) первый полинуклеотид, кодирующий специфический для мишени лиганд, где специфический для мишени лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 54;
- (b) второй полинуклеотид, кодирующий лиганд UCHT1, где лиганд UCHT1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 46, и имеет мутацию Y177T, как определено в SEQ ID NO: 46; и
- (c) третий полинуклеотид, кодирующий полипептид передающего сигналы домена Т-клеточного рецептора; где последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит лидерную последовательность, и где компонент, кодируемый посредством (a), компонент, кодируемый посредством (b), и компонент, кодируемый посредством (c), слиты непосредственно друг с другом или соединены посредством по меньшей мере одного линкера.
- 10. Последовательность нуклеиновой кислоты по п.9, где последовательность нуклеиновой кислоты включает последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 61.
- 11. Последовательность нуклеиновой кислоты по пп.9, 10, где TAC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60 или SEQ ID NO: 62.
- 12. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп.9-11, не кодирующая костимулирующий домен.
- 13. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп.9-12, не кодирующая активирующий домен.
- 14. Полипептид, кодируемый посредством последовательности нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-13.
 - 15. Векторная конструкция, содержащая:
 - (а) последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-13; и
 - (b) промотор, функциональный в клетке млекопитающего.
 - 16. Т-клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-13.
- 17. Фармацевтическая композиция, содержащая Т-клетку по п.16 и фармацевтически приемлемый наполнитель.
- 18. Способ лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом индивидуума, включающий введение индивидууму фармацевтической композиции по п.17.
- 19. Способ по п.18, где злокачественная опухоль содержит экспрессирующую СD19 клетку злокачественной опухоли.
- 20. Способ по любому из пп.18, 19, где злокачественная опухоль представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование.
- 21. Способ по любому из пп.18-20, где злокачественная опухоль представляет собой В-клеточную лимфому, острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) или неходжкинскую лимфому.
- 22. Способ по п.18, где злокачественная опухоль содержит экспрессирующую HER-2 клетку злокачественной опухоли.
- 23. Способ по любому из пп.18 или 22, где злокачественная опухоль представляет собой рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак яичника или рак желудка.
- 24. Способ по п.18, где злокачественная опухоль содержит экспрессирующую ВСМА клетку злокачественной опухоли.
- 25. Способ по любому из пп.18 или 24, где злокачественная опухоль представляет собой лейкоз, лимфому или множественную миелому.



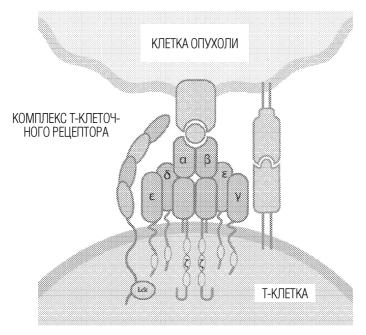
Фиг. 1А



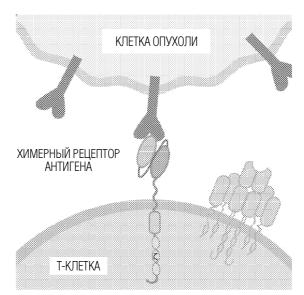
Фиг. 1В



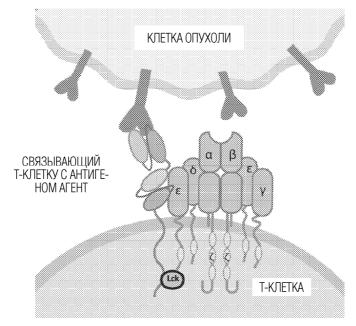
Фиг. 1С



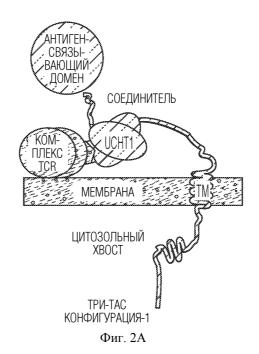
Фиг. 1D

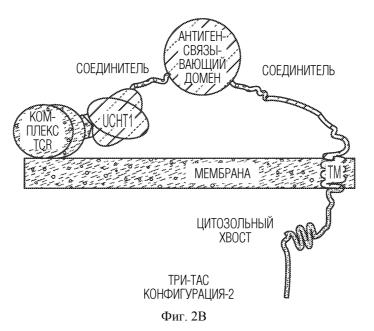


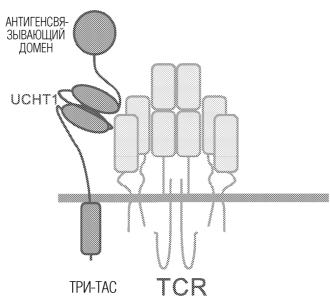
Фиг. 1Е



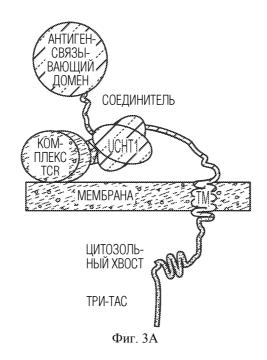
Фиг. 1F

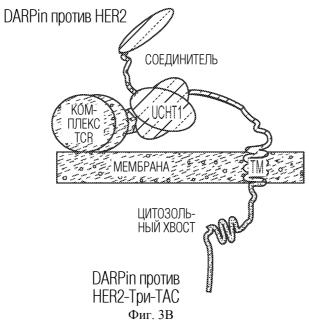


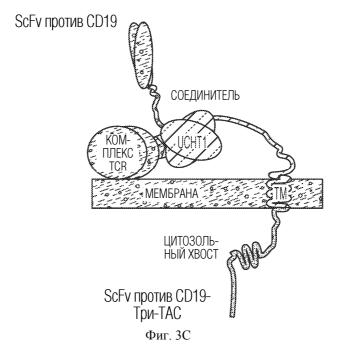


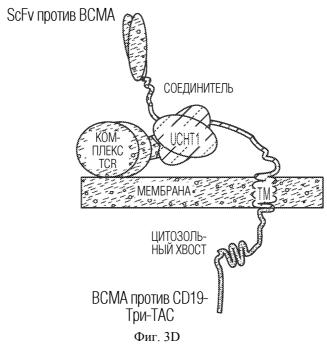


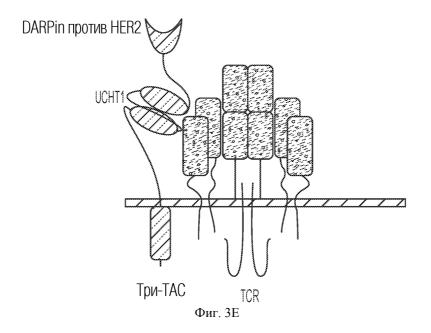
Фиг. 2С

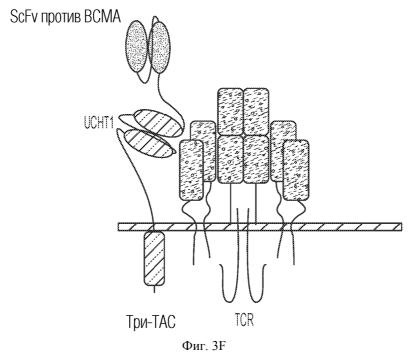


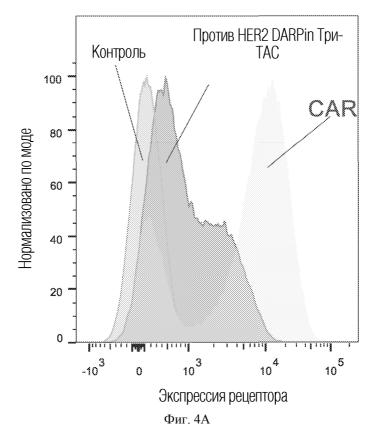


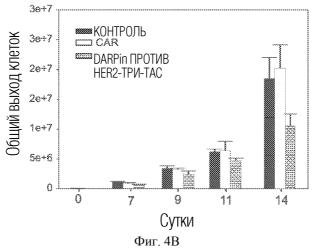


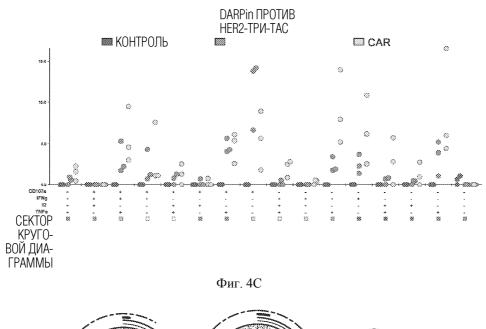


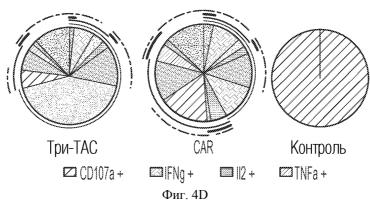


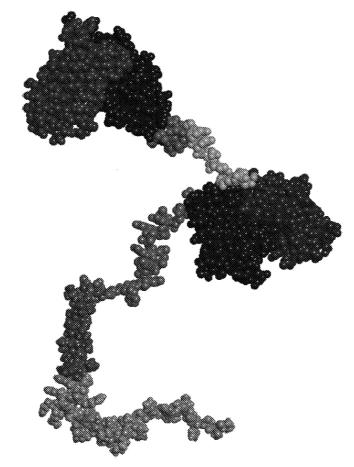




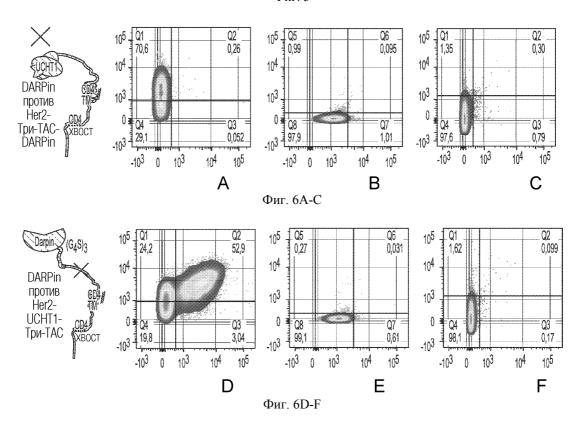


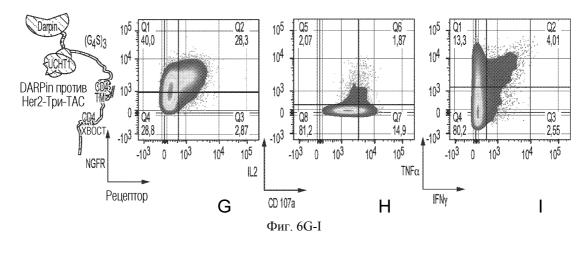


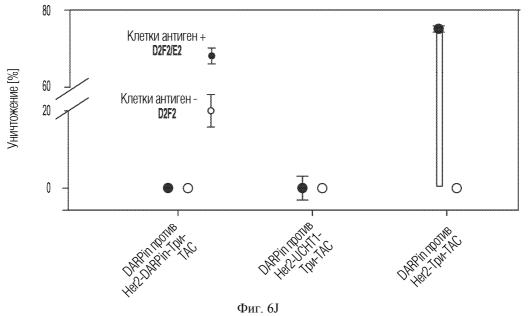


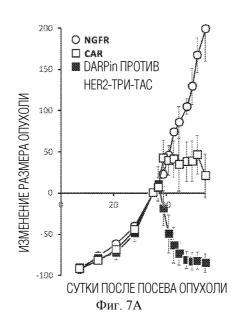


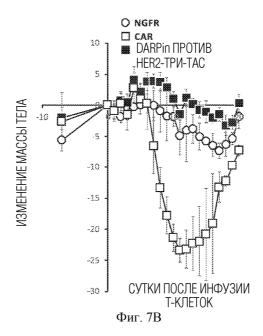
Фиг. 5

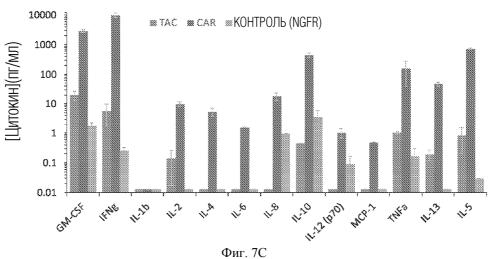


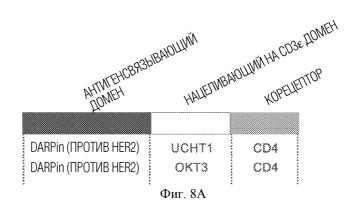


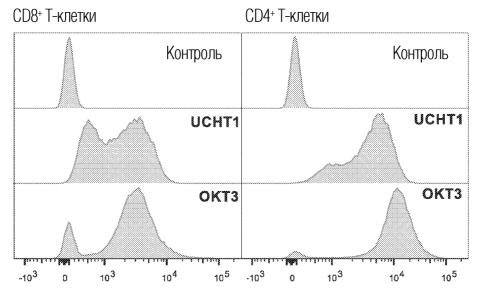




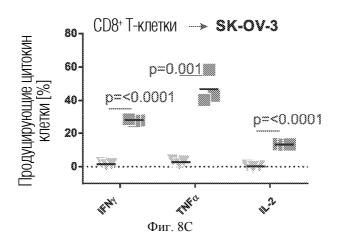


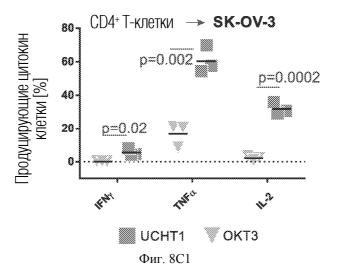


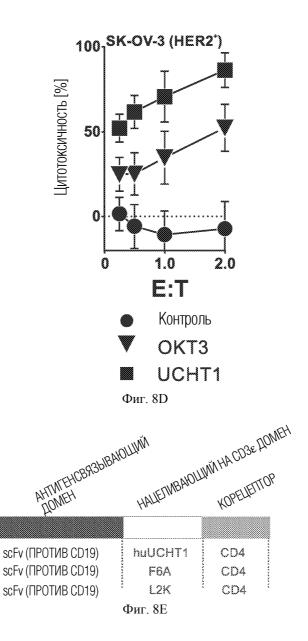


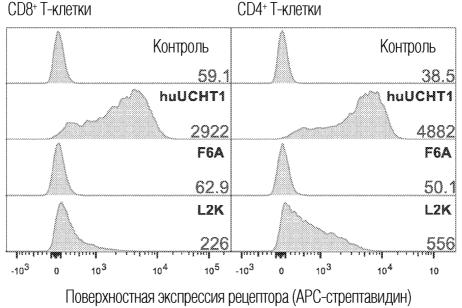


Поверхностная экспрессия рецептора (PE-hulgG) Φ_{MF} . 8B

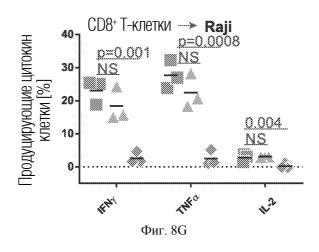


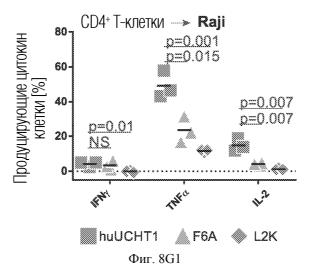


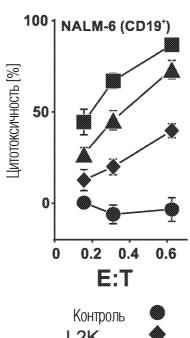




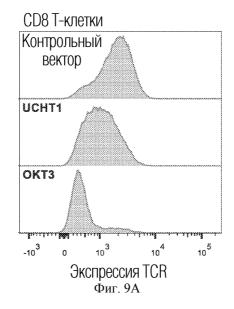
Фиг. 8F

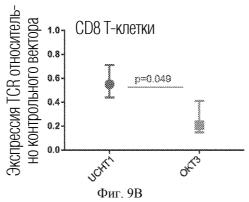


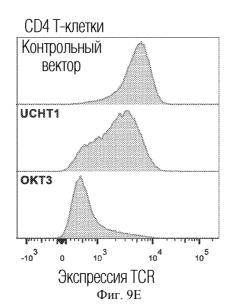


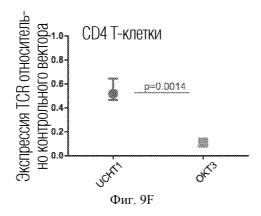


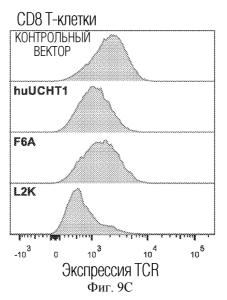
Фиг. 8Н

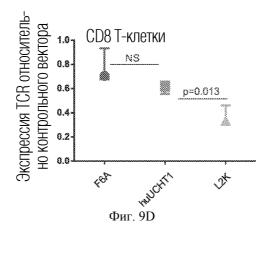


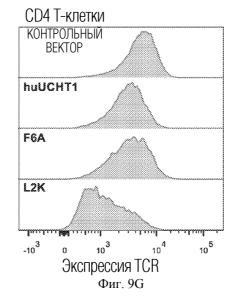


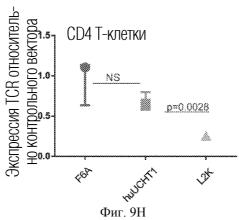


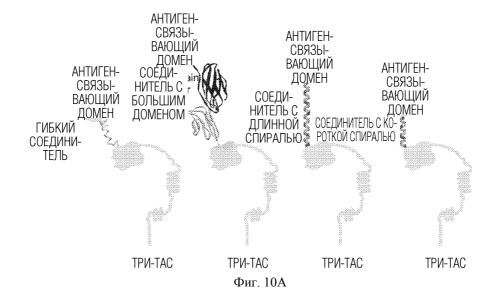












ГИБКИЙ СОЕДИНИТЕЛЬ

GGGGGGGGGGGGGG

СОЕДИНИТЕЛЬ С КОРОТКОЙ СПИРАЛЬЮ

AEAAAKEAAAKEAAAKA

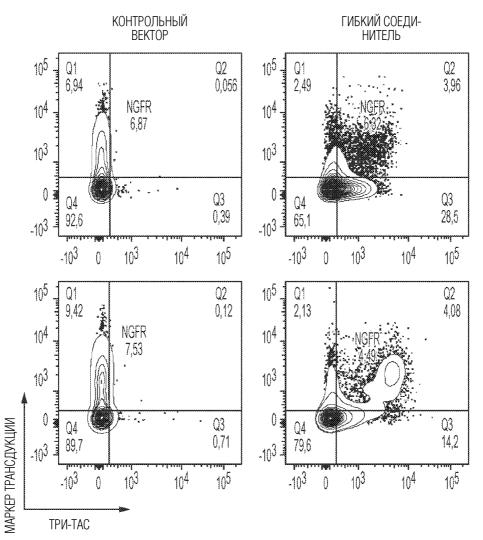
СОЕДИНИТЕЛЬ С ДЛИННОЙ СПИРАЛЬЮ

AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA

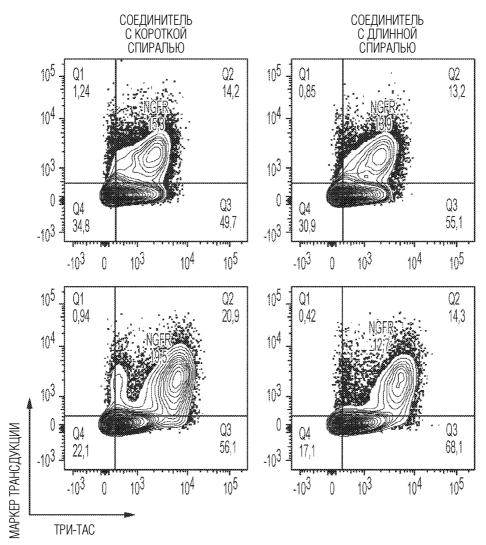
СОЕДИНИТЕЛЬ С БОЛЬШИМ ДОМЕНОМ

IVVLAFOKASSIVYKKEGEOVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWWQAERASSSKSWITFDLKNKE VSVKRVTODPKLQMGKKLPLHLTLPQALPQYAGSGNLTLALEAKTGKLHQEVNLVVMRATQ LQKNLTCEVWGPTSPKLMLSLKLENKEAKVSKREKAVWVLNPEAGMWQCLLSDSGQVLLE SNIKVLPAA

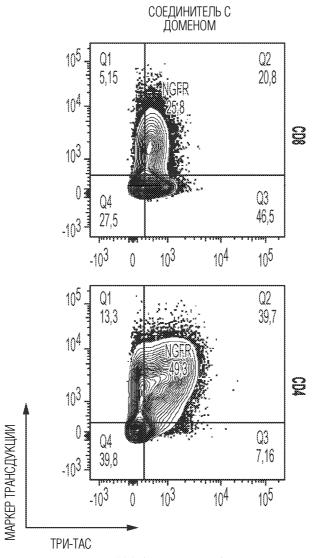
Фиг. 10В

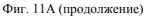


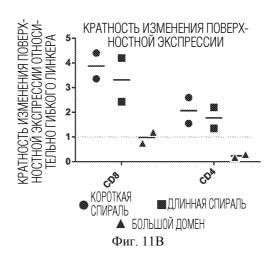
Фиг. 11А



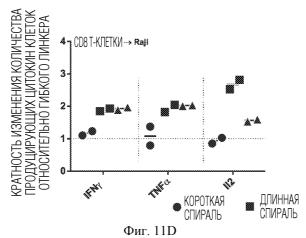
Фиг. 11А (продолжение)

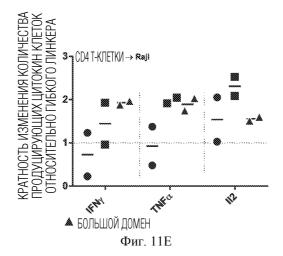




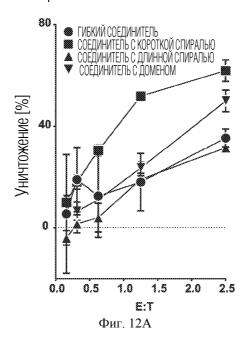




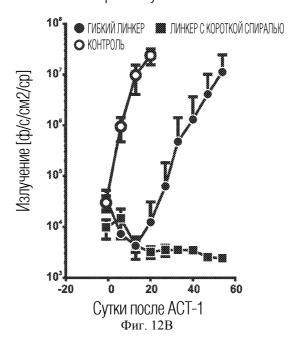


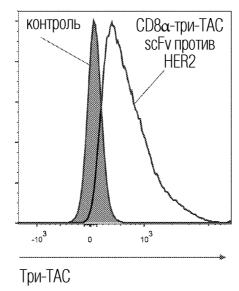


Цитотоксичность in vitro

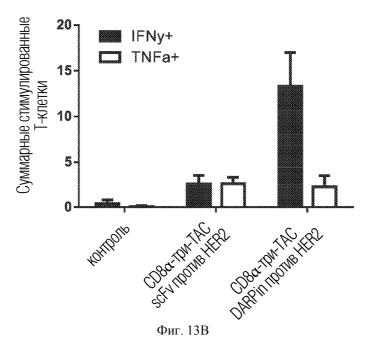


Контроль опухоли in vivo



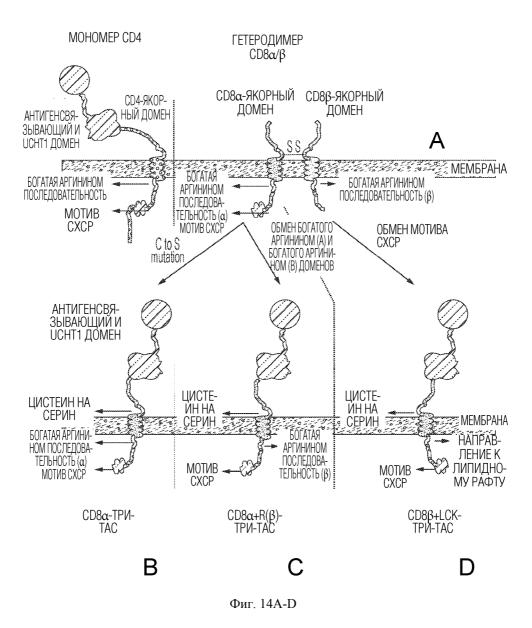


Фиг. 13А

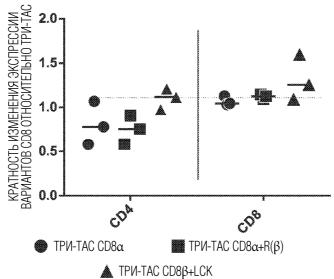


КОН-ТРОЛЬ DARP IN ПРОТИВ HER2

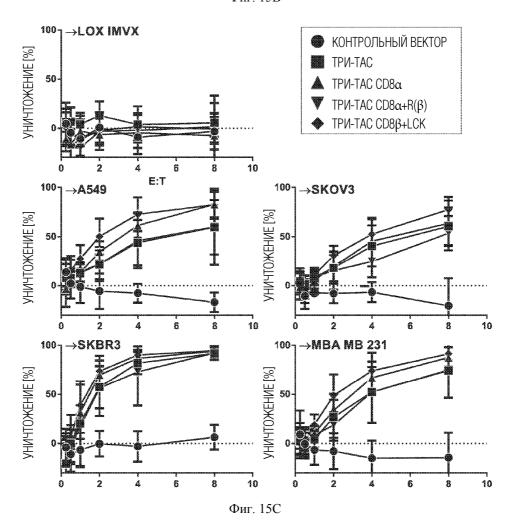
Фиг. 13С

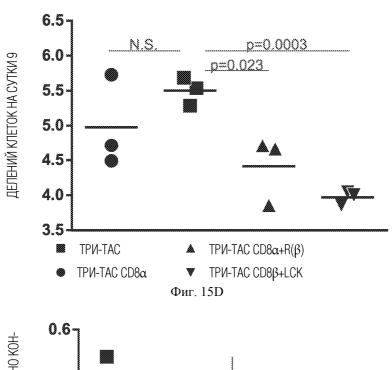


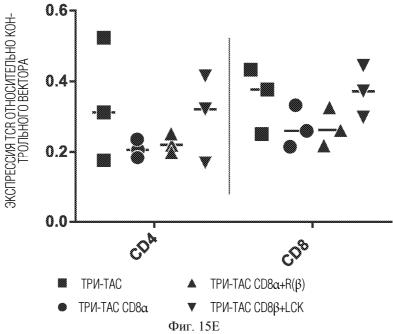
CD4 КЛЕТКИ CD8 КЛЕТКИ КОНТРОЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬНЫЙ **BEKTOP BEKTOP** ТРИ-ТАС ТРИ-ТАС 5713 3016 ΤΡИ-TAC CD8α ТРИ-TAC CD8α 6146 3406 ТРИ-ТАС CD8 α +R(β) ТРИ-ТАС CD8 α +R(β) 5147 3299 ТРИ-ТАС CD8β+LCK ТРИ-TAC CD8β+LCK 7018 3785 10⁵ -10³ 103 10⁵ 104 104 -103 103 ЭКСПРЕССИЯ ТРИ-ТАС ЭКСПРЕССИЯ ТРИ-ТАС Фиг. 15А

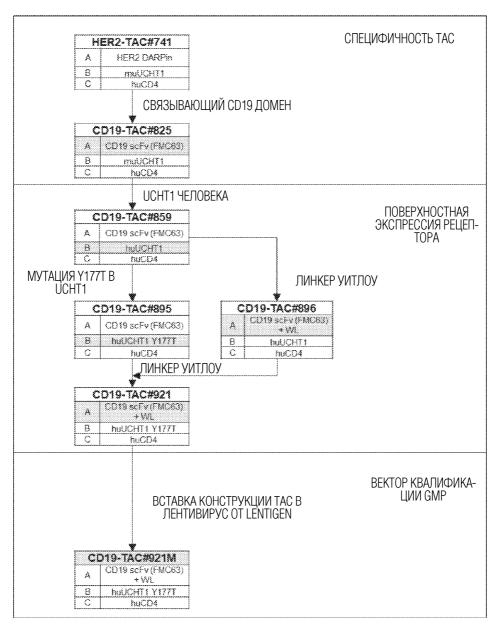


▲ TPИ-TAC CD8β+LCk Φиг. 15B

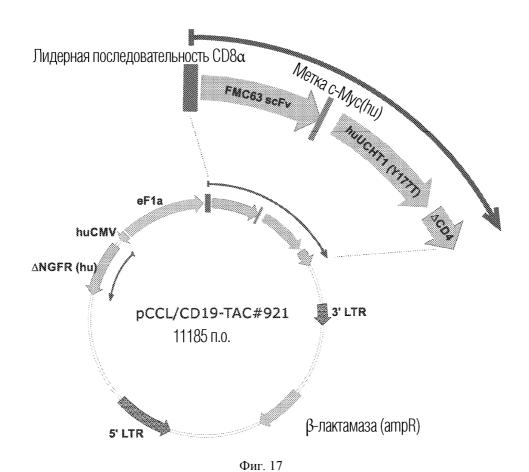


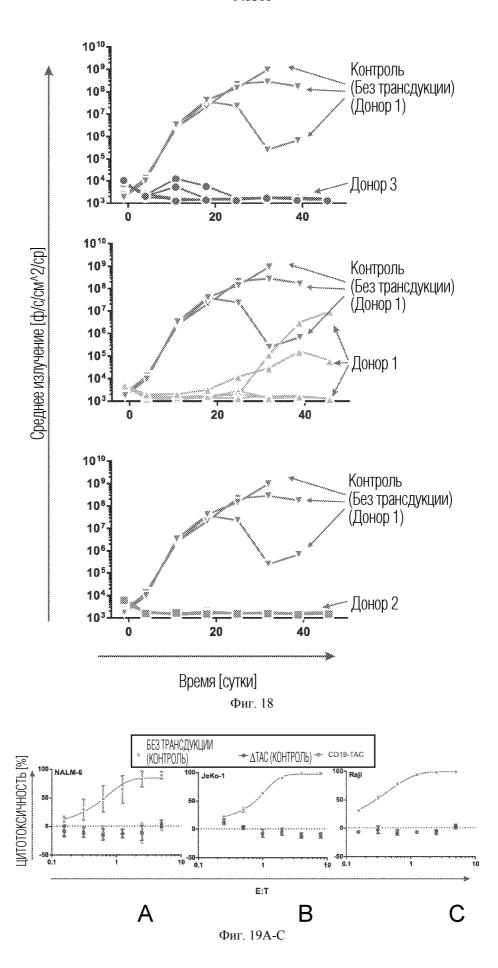


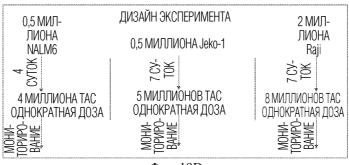




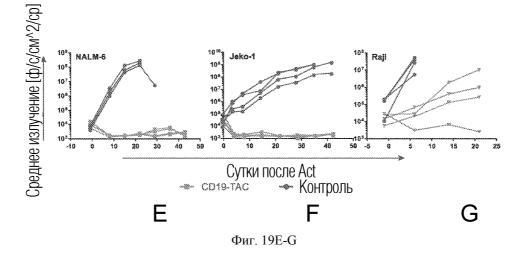
Фиг. 16

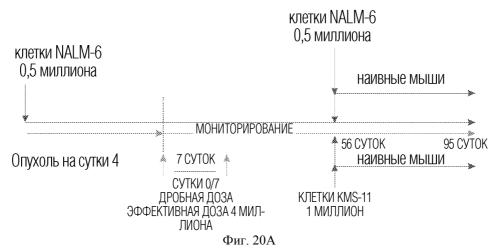


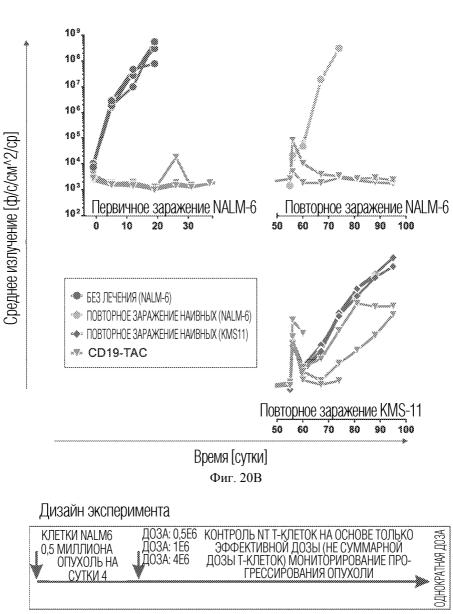




Фиг. 19D



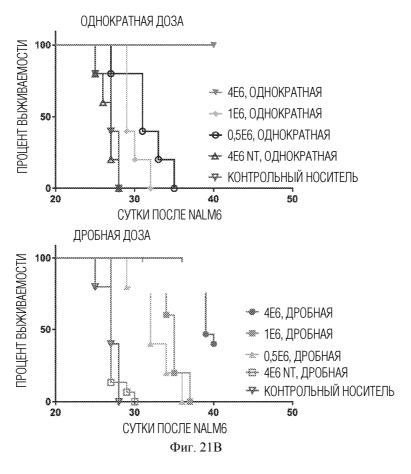


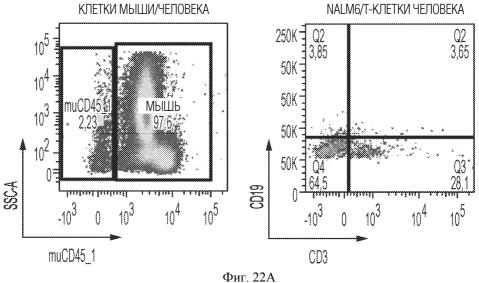


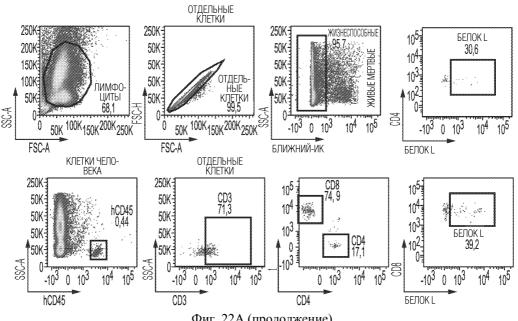
КЛЕТКИ NALM6 ДОЗА: 0,5E6 КОНТРОЛЬ NT Т-КЛЕТОК НА ОСНОВЕ ТОЛЬКО
0,5 МИЛЛИОНА ДОЗА: 1E6 ЭФФЕКТИВНОЙ ДОЗЫ (НЕ СУММАРНОЙ
ОПУХОЛЬ НА ДОЗА: 4E6 ДОЗЫ Т-КЛЕТОК) МОНИТОРИРОВАНИЕ ПРОСУТКИ 4 ЧЕРЕЗ 7 ГРЕССИРОВАНИЯ ОПУХОЛИ

ОБРАЗЦЫ ОТОБРАНЫ ДЛЯ:
ОПРЕДЕЛЕНИЕ Т-КЛЕТОК И КЛЕТОК NALM-6 В КРОВИ ПОСРЕДСТВОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ
ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ
ТЕСТ DПЦР

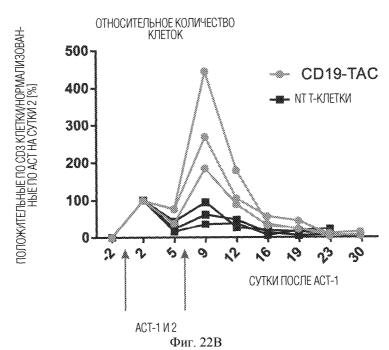
Фиг. 21А





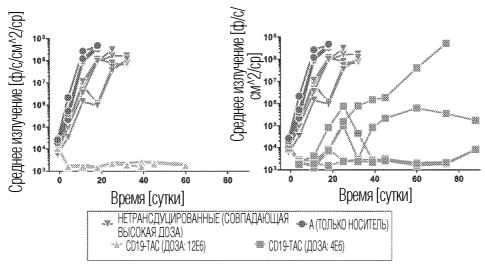


Фиг. 22А (продолжение)

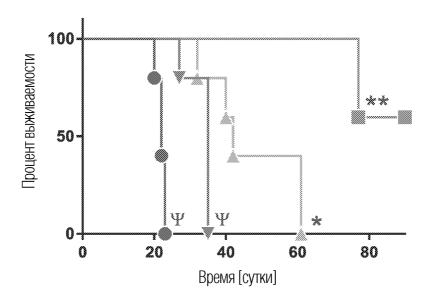




Фиг. 23А



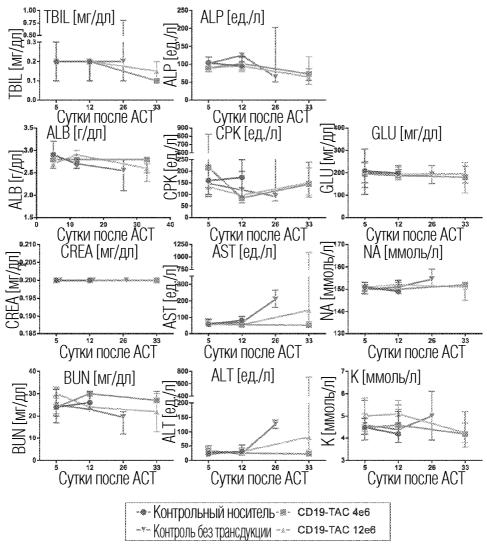
Фиг. 23В



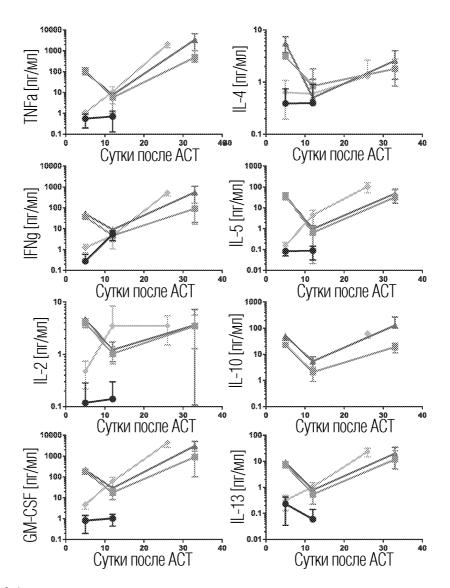
:КОНЕЧНАЯ ТОЧКА НАГРУЗКИ ОПУХОЛИ

:KOHEЧНАЯ ТОЧКА GVHD :1 КОНЕЧНАЯ ТОЧКА GVHD И 1 КОНЕЧ-НАЯ ТОЧКА ОПУХОЛИ

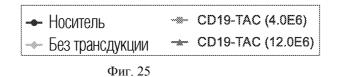
Фиг. 23С

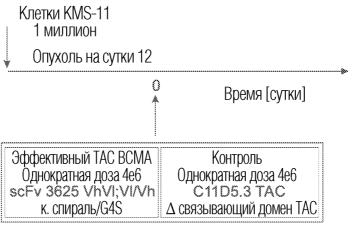


Фиг. 24



IL-6 был ниже уровня детекции во всех временных точках

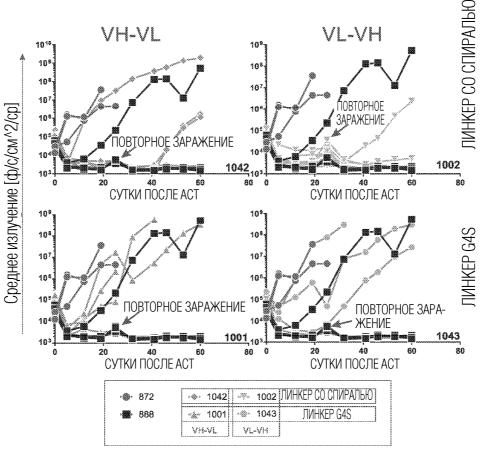




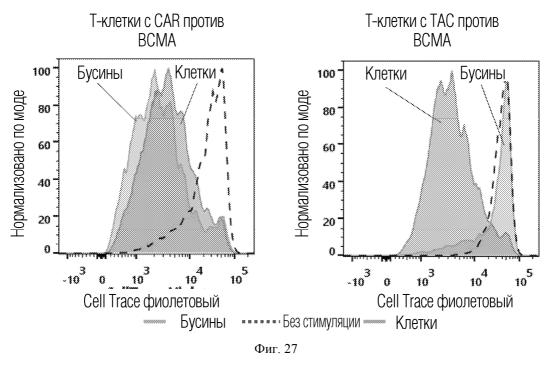
Фиг. 26А

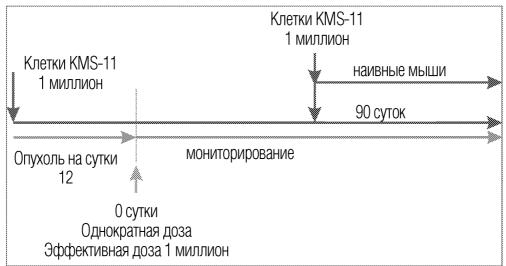
| 10 | Линкер | Одиночная цепь |
|------|------------------|----------------|
| 872 | G4S | |
| 888 | G4S | C11D5.3 |
| 1001 | G4S | 3625 H-L |
| 1002 | Короткая спираль | 3625 L-H |
| 1042 | Короткая спираль | 3625 H-L |
| 1043 | G4S | 3625 L-H |

Фиг. 26В

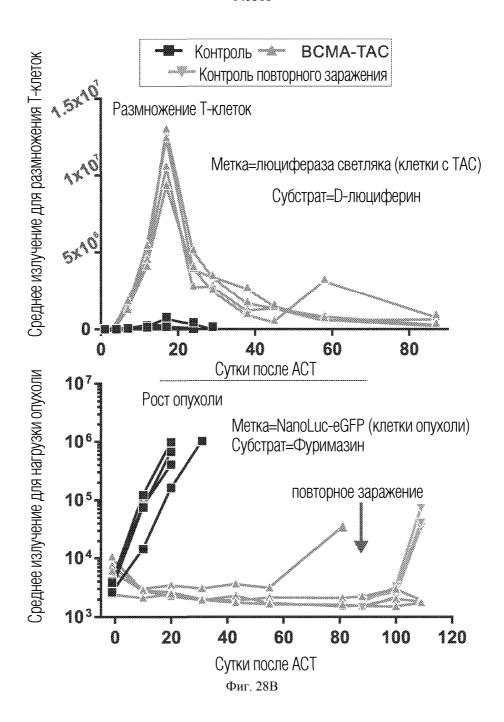


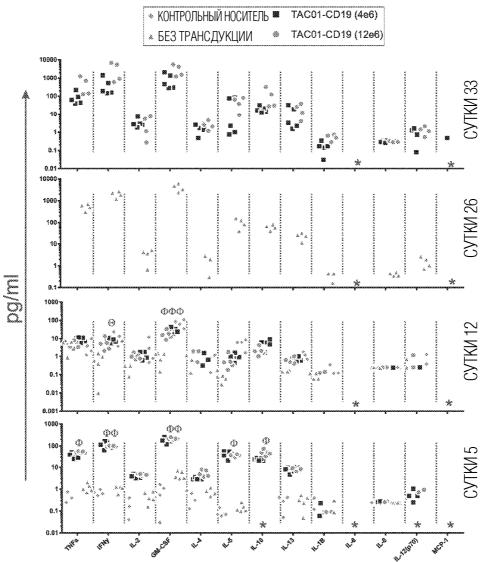
Фиг. 26С





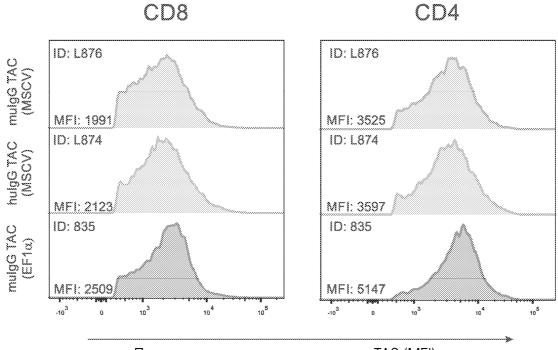
Фиг. 28А



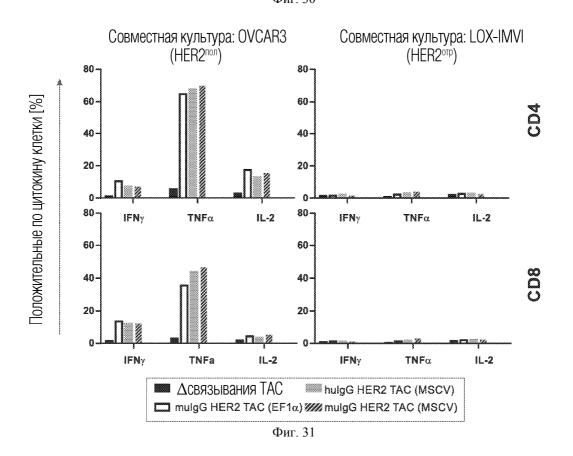


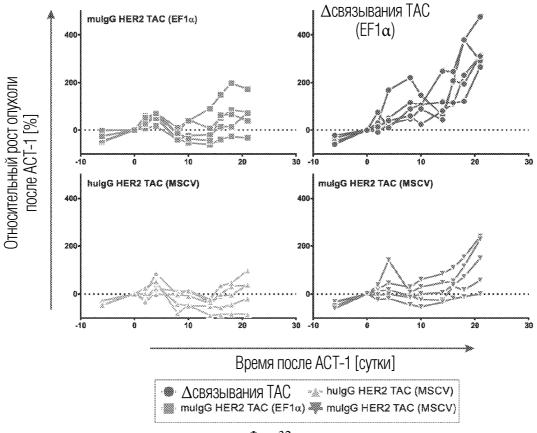
^{*}Значения ниже предела детекции не показаны

- Φ Подвергнутые лечению мыши, значимо отличающиеся от контроля
- ФФ Подвергнутые лечению мыши, значимо отличающиеся от контроля и между собой
- $\Phi\Phi\Phi$ Все группы значимо отличаются друг от друга
- Θ Только носитель, значимо отличающийся от нетрансдуцированных мышей $\Phi_{\mathrm{ИГ}}$. 29



Поверхностная экспрессия рецептора ТАС (MFI) $\Phi_{\mathrm{MF.}}$ 30





Фиг. 32