

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292885** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.27

(22) Дата подачи заявки
2021.04.08

(51) Int. Cl. **A61P 35/00** (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ Notch С ШАРНИРНЫМ ДОМЕНОМ

(31) **63/007,807; 63/165,588**

(32) **2020.04.09; 2021.03.24**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/026430**

(87) **WO 2021/207526 2021.10.14**

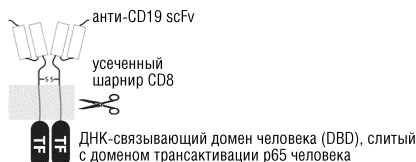
(71) Заявитель:
**ДЗЕ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ
(US)**

(72) Изобретатель:
Ройбол Коул Т., Лю Рэймонд (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение в целом относится, среди прочего, к новому классу химерных рецепторов Notch, содержащих полностью гуманизированный эффектор транскрипции, сконструированный для модулирования экспрессии генов и клеточной активности лигандзависимым образом. Новые химерные рецепторы Notch неожиданно сохраняют способность передавать сигналы в ответ на связывание лиганда, несмотря на то, что внеклеточная субъединица Notch (NEC), которая включает негативную регуляторную область (NRR), ранее считавшуюся важной для функционирования рецепторов Notch, полностью отсутствует. Кроме того, новые рецепторы, описанные в настоящем документе, включают внеклеточный домен олигомеризации, чтобы стимулировать образование олигомеров химерных рецепторов. Также предложены композиции и способы, которые могут использоваться для получения таких рецепторов, нуклеиновых кислот, кодирующих их, сконструированных клеток, генетически модифицированных нуклеиновыми кислотами, а также способы модуляции активности клетки и/или для лечения различных заболеваний, таких как рак.

Гуманизированный Hinge-Notch рецептор



A1

202292885

202292885

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576139EA/061

ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ NOTCH С ШАРНИРНЫМ ДОМЕНОМ

ЗАЯВЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО ФИНАНСИРУЕМЫХ ИЗ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТА ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТОК

[0001] Данное изобретение было создано при государственной поддержке в рамках гранта № OD025751, предоставленного Национальным институтом здравоохранения. Правительство имеет определенные права на изобретение.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0002] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США с серийным номером 63/007807, поданной 9 апреля 2020 г.; и по предварительной патентной заявке США с серийным номером 63/165588, поданной 24 марта 2021 г. Содержание вышеупомянутых заявок включено в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте, включая любые чертежи.

ВКЛЮЧЕНИЕ СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0003] Данная заявка содержит Список последовательностей, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Прилагаемый текстовый файл списка последовательностей под названием «Sequence Listing_048536-678001WO.txt» был создан 1 апреля 2021 г. и имеет размер 138 КБ. 138 KB.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Настоящее изобретение в целом относится к новым синтетическим клеточным рецепторам, которые связывают лиганды клеточной поверхности и обладают выбираемыми специфичностями и активностью. В описании также представлены композиции и способы, применимые для получения таких рецепторов, кодирующие их нуклеиновые кислоты, клетки-хозяева, генетически модифицированные нуклеиновыми кислотами, а также способы модуляции экспрессии генов, модуляции активности клетки и/или лечения различные состояния здоровья или заболевания, такие как рак.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Недавние достижения в области генной инженерии и синтетической биологии позволяют разрабатывать новые методы генной терапии и терапии с использованием сконструированных клеток для лечения многих заболеваний и нарушений здоровья. Например, ряд синтетических терапевтических систем первого поколения, включающих синтетические производные рецепторов Notch, которые часто называют «рецепторами SynNotch», в последние годы привлек значительное внимание в связи с их значительным потенциалом в лечении различных видов злокачественных новообразований. Эти рецепторы SynNotch первого поколения содержат структурные модификации рецепторов Notch дикого типа с определяемой пользователем специфичностью, заменяя внеклеточный лиганд-связывающий домен (который в Notch дикого типа содержит несколько EGF-подобных повторов) на производное антитела и заменяя цитоплазматического домена с выбранным активатором транскрипции, но при этом опираясь на функциональность

негативной регуляторной области Notch (NRR) (KT Roybal *et al.*, *Cell* 2016 Oct 6; 167(2):419-32), и L. Morsut *et al.*, *Cell* (2016) 164:780-91).

[0006] Тем не менее, внедрение терапии рецептором SynNotch первого поколения у людей продолжает создавать значительные проблемы для клинической разработки. Одним из основных потенциальных побочных эффектов терапии первого поколения сконструированных рецепторов SynNotch является способность продуктов сконструированных рецепторов SynNotch вызывать иммунные ответы хозяина. Факторы риска иммуногенности могут быть связаны с наличием нечеловеческих или частично человеческих последовательностей в сконструированных рецепторах SynNotch, а также с наличием остаточных вирусных белков или других белков нечеловеческого происхождения, используемых как часть производства первых поколения сконструированных рецепторов SynNotch. Эти типы иммунного ответа потенциально могут вызывать иммунное отторжение опосредованной SynNotch клеточной терапии, например, возможно, влияя на размножение и персистенцию искусственных клеток и, следовательно, на общую безопасность и клинически значимый ответ на лечение.

[0007] Кроме того, сконструированные рецепторы SynNotch первого поколения имеют большие размеры и приближаются к пределам упаковки традиционных лентивирусных схем доставки, что препятствует простоте доставки и добавления других полезных молекулярных компонентов. Например, Notch-отрицательные регуляторные области (NRR) охватывают примерно 160 аминокислот, что делает размер одного этого домена размером с некоторые зрелые белки, такие как инсулин или эпидермальный фактор роста (EGF). Считается, что это снижает эффективность экспрессии рецептора SynNotch первого поколения и из-за ограничений размера, связанных с емкостью вектора, исключает использование некоторых векторов клонирования и трансфекции.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] Настоящее изобретение в целом относится к новому классу химерных олигомеризуемых рецепторов Notch, содержащих гуманизированный эффектор транскрипции, сконструированный для модулирования экспрессии генов и клеточной активности лиганд-зависимым образом. Активность этих полностью гуманизированных рецепторов Notch можно контролировать за счет присутствия внеклеточного лиганда, что позволяет осуществлять пространственный и временной контроль экспрессии специфических генов в клетках млекопитающих, а также использовать их для модулирования клеточной активности или для лечения различных состояний здоровья или заболеваний. В частности, в настоящем документе предусмотрены полностью гуманизированные рецепторы Notch, которые неожиданно сохраняют способность передавать сигналы в ответ на связывание лиганда, несмотря на полное отсутствие внеклеточной субъединицы (NEC) Notch, включая негативную регуляторную область (NRR). Более конкретно, эти рецепторы включают внеклеточный домен олигомеризации, чтобы способствовать образованию олигомерной формы, например, димерной или тримерной формы химерных рецепторов. Не привязываясь к какой-либо конкретной

теории, этот дизайн способствует олигомеризации или кластеризации рецепторов, что улучшает активируемую лигандом модуляцию транскрипции. Кроме того, эти рецепторы обеспечивают диапазон чувствительности. Кроме того, полностью исключая нативный NRR Notch, полинуклеотиды, кодирующие рецепторы по настоящему изобретению, можно сделать меньше, чем полинуклеотиды, кодирующие SynNotch первого поколения, что позволяет использовать векторы с более ограниченной емкостью и облегчает включение дополнительных элементов, которые в противном случае будут исключены из-за ограничений размера, связанных с пропускной способностью вектора.

[0009] Соответственно, новые химерные синтетические рецепторы Notch, описанные в настоящем документе (названные «гуманизированными рецепторами HingeNotch»), имеют компактный размер и, поскольку они полностью гуманизированы, более подходят для клинических протоколов производства клеток и использования у людей.

[0010] В одном аспекте в настоящем документе предусмотрены химерные полинуклеотиды, включающие от N-конца к С-концу: (a) внеклеточный лиганд-связывающий домен (ECD), обладающий аффинностью связывания с выбранным лигандом; (b) шарнирный домен, способный стимулировать образование олигомера химерного полипептида посредством межмолекулярной дисульфидной связи; (c) трансмембранный домен (TMD), включающий один или несколько сайтов протеолитического расщепления, индуцируемых лигандом; и (d) внутриклеточный домен (ICD), включающий человеческий или гуманизированный эффектор транскрипции, где связывание выбранного лиганда с внеклеточным лиганд-связывающим доменом приводит к расщеплению в индуцируемом лигандом сайте протеолитического расщепления, расположенном между эффектором транскрипции и шарнирным доменом, и где химерный полипептид не включает повтор LIN-12-Notch (LNR) и/или домен гетеродимеризации (HD) рецептора Notch.

[0011] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления химерных полипептидов в соответствии с настоящим изобретением включают один или несколько из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен включает, кроме того, последовательность остановки-переноса. В некоторых вариантах осуществления изобретения внеклеточный домен включает антигенсвязывающий фрагмент, способный связываться с лигандом на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка является патогеном. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка человека является опухолевой клеткой. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка человека представляет собой терминально дифференцированную клетку.

[0012] В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, включают внеклеточный лиганд-связывающий домен, обладающий аффинностью связывания с выбранным лигандом, который включает белок или углевод. В некоторых вариантах осуществления изобретения

лиганд представляет собой маркер кластера дифференцировки (CD). В некоторых вариантах осуществления изобретения CD маркер выбран из группы, включающей CD1, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD7, CD8a, CD8b, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27, CD28, CD33, CD34, CD40, CD45, CD48, CD52, CD59, CD66, CD70, CD71, CD72, CD73, CD79A, CD79B, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD94, CD95, CD134, CD140 (PDGFR4), CD152, CD154, CD158, CD178, CD181 (CXCR1), CD182 (CXCR2), CD183 (CXCR3), CD210, CD246, CD252, CD253, CD261, CD262, CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD276 (B7H3), CD279, CD295, CD339 (JAG1), CD340 (HER2), EGFR, FGFR2, CEA, AFP, CA125, MUC-1, MAGE, щелочную фосфатазу плацентарного типа 2 (ALPPL2), антиген созревания В-клеток (BCMA), зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP) и сигнальный регуляторный белок α (SIRP α). В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд выбран из рецепторов клеточной поверхности, белков адгезии, интегринов, муцинов, лектинов, опухолеассоциированных антигенов и опухолеспецифических антигенов. В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд представляет собой опухолеассоциированный антиген или опухолеспецифический антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения внеклеточный лиганд-связывающий домен включает лиганд-связывающую часть рецептора.

[0013] В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, включающей антитело, нанотело, диатело, триатело, минитело, фрагмент F(ab')₂, фрагмент F(ab)_v, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), однодоменное антитело (sdAb) и его функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент включает scFv. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с опухолеассоциированным антигеном, выбранным из группы, включающей CD19, B7H3 (CD276), BCMA, CD123, CD171, CD179a, CD20, CD213A2, CD22, CD24, CD246, CD272, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD46, CD71, CD97, CEA, CLDN6, CLECL1, CS-1, EGFR, EGFRvIII, ELF2M, EphCAM, EphA2, эфрин B2, FAP, FLT3, GD2, GD3, GM3, GPRC5D, HER2 (ERBB2/neu), IGLL1, IL-11R α , KIT (CD117), MUC1, NCAM, PAP, PDGFR- β , PRSS21, PSCA, PSMA, ROR1, SSEA-4, TAG72, TEM1/CD248, TEM7R, TSHR, VEGFR2, BCMA (CD269), ALPI, цитруллинированный виментин, cMet, и Axl. В некоторых вариантах осуществления изобретения опухолеассоциированный антиген представляет собой CD19, BCMA, CEA, HER2, MUC1, CD20, ALPPL2, SIRP α или EGFR. В некоторых вариантах осуществления изобретения опухолеассоциированный антиген представляет собой CD19. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько сайтов протеолитического расщепления, индуцируемых лигандом, включает сайт расщепления γ -секретазой. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффектор транскрипции включает активатор транскрипции или репрессор транскрипции. В некоторых вариантах осуществления изобретения внутриклеточный домен включает последовательность

ядерной локализации. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффектор транскрипции включает: (i) ДНК-связывающий домен и (ii) эффекторный домен, через который эффектор транскрипции оказывает свое действие. В некоторых вариантах осуществления изобретения ДНК-связывающий домен связан с эффекторным доменом на N-конце. В некоторых вариантах осуществления изобретения ДНК-связывающий домен связан с эффекторным доменом на C-конце. В некоторых вариантах осуществления изобретения ДНК-связывающий домен получен из белка гомеобокса А ядерного фактора 1 гепатоцитов человека (HNF1 α), белка гомеобокса В ядерного фактора 1 гепатоцитов человека (HNF1 β), содержащего парный домен белка человека (Рах-6), содержащего парный домен белка человека (Рах-1) белок, содержащего парный домен белка человека (Рах-2), содержащего парный домен белка человека (Рах-3), содержащего парный домен белка человека (Рах-4) или содержащего парный домен белка человека (Рах-7). В некоторых вариантах осуществления изобретения ДНК-связывающий домен получен из белка гомеобокса А ядерного фактора 1 гепатоцитов человека (HNF1 α). В некоторых вариантах осуществления изобретения HNF1 α ДНК-связывающий домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 или ее функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления изобретения ДНК-связывающий домен получен из содержащего парный домен белка человека (Рах6). В некоторых вариантах осуществления изобретения Рах6 ДНК-связывающий домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или ее функциональный вариант.

[0014] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторный домен выбран из группы, включающей домен активации транскрипции, домен репрессора транскрипции, и эпигенетический эффекторный домен. В некоторых вариантах осуществления изобретения домен активации транскрипции получен из субъединицы ядерного фактора NF κ B p65 человека (p65). В некоторых вариантах осуществления изобретения домен активации транскрипции получен из субъединицы ядерного фактора NF κ B p65 человека (p65). В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторный домен p65 включает аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 54-55 или ее функционального варианта.

[0015] В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды, описанные в настоящем документе, включают дополнительный сайт протеолитического расщепления, сигнальную последовательность, детектируемую метку, опухолеспецифический сайт расщепления, специфический для заболевания сайт расщепления и их комбинации.

[0016] В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен химерных полипептидов, описанных в настоящем документе, происходит из шарнирного домена CD8 α , шарнирного домена CD28, шарнирного домена CD152, шарнирного домена PD-1, шарнирного домена CTLA4, шарнирного домена OX40, шарнирного домена IgG1, шарнирного домена IgG2, шарнирного домена IgG3 и шарнирного домена IgG4, или функционального варианта любого из них. В некоторых вариантах осуществления

изобретения шарнирный домен происходит из шарнирного домена CD8 α или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен получен из шарнирного домена CD28 или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен получен из шарнирного домена OX40 или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен получен из шарнирного домена IgG4 или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 15-19.

[0017] В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность остановки-переноса (STS) химерных полипептидов, описанных в настоящем документе, включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 31-51.

[0018] В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен химерных полипептидов, описанных в настоящем документе, включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 21-30.

[0019] В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды, описанные в настоящем документе, включают (а) шарнирный домен, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 15-19; (b) трансмембранный домен (TMD), включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21-30; и (c) STS домен, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 31-51.

[0020] В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный полипептид включает аминокислотную последовательность длиной менее чем 500, менее чем 600, менее чем 700, менее чем 800, или менее чем 900 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный полипептид включает аминокислотную последовательность длиной менее чем 600 аминокислотных остатков.

[0021] В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный полипептид включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 2, 4-12 и 65-66.

[0022] В некоторых вариантах осуществления изобретения следующие домены получены из полипептидов человека: (а) внеклеточный лиганд-связывающий домен, (b) шарнирный домен, (c) TMD и (d) ICD. В некоторых вариантах осуществления изобретения следующие домены являются по существу неиммуногенными у человека: (а) внеклеточный лиганд-связывающий домен, (b) шарнирный домен, (c) TMD и (d) ICD. В некоторых вариантах осуществления изобретения ICD является по существу неиммуногенным для человека.

[0023] В другом аспекте настоящем документе предложены рекомбинантные нуклеиновые кислоты, включающие нуклеотидную последовательность, которая кодирует химерный полипептид, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотидная последовательность включена в кассету экспрессии или вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор экспрессии представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор, аденовирусный вектор, аденоассоциированный вирусный вектор или ретровирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую представляющий интерес белок, функционально связанный с промотором, где экспрессия представляющего интерес белка модулируется эффектором транскрипции.

[0024] В другом аспекте настоящем документе предложены рекомбинантные клетки, включающие (а) химерный полипептид, как описано в настоящем документе, и/или (b) рекомбинантную нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем документе. Предложены также, в связанном с этим аспекте, клеточные культуры, включающие по меньшей мере одну рекомбинантную клетку, как описано в настоящем документе и культуральную среду. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная клетка представляет собой прокариотическую клетку, содержащую рекомбинантную нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой клонирующий вектор. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка млекопитающего представляет собой иммунную клетку, нейрон, эпителиальную клетку и эндотелиальную клетку или стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммунная клетка представляет собой В клетку, моноцит, естественную киллерную клетку, базофил, эозинофил, нейтрофил, дендритную клетку, макрофаг, регуляторную Т-клетку, хелперную Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку или другую Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная клетка включает первый химерный полипептид и второй химерный полипептид, как описано в настоящем документе; и/или b) первый нуклеиновая кислота и второй нуклеиновая кислота, как описано в настоящем документе; где первый химерный полипептид и второй химерный полипептид не имеют одинаковой последовательности, и/или первый нуклеиновая кислота или второй нуклеиновая кислота не имеют одинаковой последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый химерный полипептид модулирует экспрессию и/или активность второго химерного полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная клетка дополнительно включает экспрессионную кассету, кодирующую интересующий белок, функционально связанный с промотором, где экспрессия

представляющего интерес белка модулируется эффектором транскрипции. В некоторых вариантах осуществления изобретения белок гетерологичен клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор представляет собой промотор фосфоглицераткиназы (PGK) или промотор GAL4 дрожжей. В некоторых вариантах осуществления изобретения интересующий белок представляет собой цитокин, цитотоксин, хемокин, иммуномодулятор, проапоптотический фактор, антиапоптотический фактор, гормон, фактор дифференцировки, фактор дедифференцировки, иммунную клетку (например, TCR или CAR) или репортер. В некоторых вариантах осуществления изобретения кассета экспрессии включена во вторую молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которая является отдельной от молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный полипептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения кассета экспрессии включена в ту же молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которая химерный полипептид.

[0025] В другом аспекте настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие фармацевтически приемлемый носитель и одно или несколько из следующего: (а) рекомбинантную нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем документе, и (b) рекомбинантную клетку, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанная фармацевтическая композиция включает рекомбинантную нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота инкапсулирована в вирусный капсид или липидную наночастицу.

[0026] В другом аспекте настоящем документе предложены способы модулирования активности клетки-мишени у субъекта, включая введение субъекту эффективного количества рекомбинантных эукариотических клеток, как описано в настоящем документе, где рекомбинантные клетки модулируют активность клетки-мишени у субъекта.

[0027] Другой аспект относится к способам модулирования активности клетки, включая: (а) получение рекомбинантной клетки, как описано в настоящем документе; и (b) приведение рекомбинантной клетки в контакт с выбранным лигандом, где связывание выбранного лиганда с внеклеточным лиганд-связывающим доменом приводит к расщеплению индуцируемого лигандом сайта протеолитического расщепления и высвобождению эффектора транскрипции, причем высвобождение эффектора транскрипции приводит к модуляции активности рекомбинантной клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения стадию контакта рекомбинантной клетки с выбранным лигандом проводят *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления изобретения активность модулируемой клетки выбрана из группы, включающей: экспрессию выбранного гена, пролиферацию, апоптоз, неапоптотическую гибель, дифференцировку, дедифференцировку, миграцию, секрецию молекулы, клеточную адгезию и цитолитическую активность. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффектор транскрипции модулирует экспрессию гена. В некоторых вариантах

осуществления изобретения эффектор транскрипции модулирует экспрессию продукта гетерологичного гена. В некоторых вариантах осуществления изобретения генный продукт выбран из группы, включающей хемокин, хемокиновый рецептор, рецептор химерного антигена, цитокин, рецептор цитокина, фактор дифференцировки, фактор роста, рецептор фактора роста, гормон, метаболический фермент, белок патогенного происхождения, индуктор пролиферации, рецептор, РНК-управляемую нуклеазу, сайт-специфическую нуклеазу, Т-клеточный рецептор, токсин, белок, полученный из токсина, регулятор транскрипции, активатор транскрипции, репрессор транскрипции, регулятор трансляции, активатор трансляции, репрессор трансляции, активирующий иммунорецептор, антитело, ингибитор апоптоза, индуктор апоптоза, сконструированный Т-клеточный рецептор, иммуноактиватор, иммуоингибитор и ингибирующий иммунорецептор. В некоторых вариантах осуществления изобретения высвобожденный эффектор транскрипции модулирует дифференцировку клетки, и где клетка представляет собой иммунную клетку, стволовую клетку, прогениторную клетку или клетку-предшественник.

[0028] В другом аспекте настоящего документе предложены способы ингибирования активности клетки-мишени у субъекта, включая введение субъекту эффективного количества рекомбинантных клеток, как описано в настоящем документе, где рекомбинантные клетки ингибируют активность клетки-мишени у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-мишень представляет собой патогенную клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения патогенная клетка представляет собой раковую клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения раковая клетка-мишень представляет собой клетку острого лейкоза миеломы, клетку анапластической лимфомы, клетку астроцитомы, В-клеточную раковую клетку, клетку рака молочной железы, клетку рака толстой кишки, клетку эпендимомы, клетку глиобластомы, клетку глиомы, клетку лейомиосаркомы, клетку липосаркомы, клетку рака печени, клетку рака легкого, клетку лимфомы из мантийных клеток, клетку меланомы, клетку нейробластомы, клетку немелкоклеточного рака легкого, клетку олигодендроглиомы, клетку рака яичника, клетку рака поджелудочной железы, клетку периферической Т-клеточной лимфомы, клетку рака почки, клетку саркомы, клетку рака желудка, клетку карциномы, клетку мезотелиомы или клетку саркомы.

[0029] Другой аспект относится к способам лечения или помощи в лечении состояния здоровья (например, заболевания) у субъекта, включая введение субъекту эффективного количества рекомбинантных клеток по настоящему изобретению, где рекомбинантные клетки лечат состояние здоровья субъекта.

[0030] Другой аспект настоящего изобретения относится к способам получения рекомбинантной клетки по изобретению, включающему (а) получение клетки, способной к экспрессии белка и (b) приведение предоставленной клетки в контакт с рекомбинантной нуклеиновой кислотой по изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетку получают путем лейкофереза, проводимого на образце, полученном от субъекта, и клетку приводят в контакт *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления

изобретения рекомбинантная нуклеиновая кислота инкапсулирована в вирусный капсид или липидную наночастицу.

[0031] В другом аспекте некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к системам модулирования активности клетки, ингибирования раковой клетки-мишени или лечения или помощи в лечении состояния здоровья (например, заболевания) у субъекта, нуждающегося в этом, где системы включают одно или несколько из следующих: химерный полипептид по изобретению; нуклеиновую кислоту по изобретению; рекомбинантную клетку по изобретению; и/или фармацевтическую композицию по изобретению.

[0032] Еще одним аспектом настоящего изобретения является применение одного или нескольких из следующего: (i) химерный полипептид по изобретению; (ii) полинуклеотид по настоящему изобретению; (iii) рекомбинантную клетку по изобретению; и (iv) фармацевтическую композицию по настоящему изобретению; для лечения состояния здоровья. В некоторых вариантах осуществления изобретения состояние здоровья представляет собой заболевание, такое как рак.

[0033] Одним аспектом настоящего изобретения является применение одного или нескольких из следующего: (i) химерный полипептид по изобретению; (ii) полинуклеотид по настоящему изобретению; (iii) рекомбинантную клетку по изобретению; или (iv) фармацевтическую композицию по изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения состояния здоровья, например, болезни.

[0034] Вышеизложенное краткое изложение является только иллюстративным и никоим образом не предназначено для ограничения. В дополнение к иллюстративным вариантам осуществления и признакам, описанным в настоящем изобретении, дополнительные аспекты, варианты осуществления, объекты и признаки изобретения станут полностью очевидными из чертежей, подробного описания и формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[0035] На **ФИГ. 1А** изображена схема неограничивающего примера гуманизированного рецептора SynNotch следующего поколения. В этом примере представлен гуманизированный HingeNotch, где домен распознавания лиганда, анти-CD19 scFv, слит с шарнирным доменом CD8, за которым следует трансмембранный домен Notch и гуманизированный транскрипционный эффектор. Транскрипционный эффектор происходит из ДНК-связывающего домена (DBD) человеческого белка, слитого с трансактивационным доменом субъединицы p65 ядерного фактора NF-каппа-В человека (p65). Связывание лиганда запускает опосредованное γ -секретазой расщепление трансмембранного домена, что приводит к высвобождению транскрипционного эффектора и его транслокации в ядро. На **ФИГ. 1В** представлена диаграмма типичной конструкции репортера синего флуоресцентного белка (BFP), экспрессия которого находится под контролем элемента ответа (RE). Четыре копии последовательности ДНК, распознаваемой ДНК-связывающим доменом (DBD) в рецепторе, изображенном на **ФИГ. 1А**, помещают выше минимального промотора и репортера BFP. Высвобождение фактора транскрипции,

которое запускается связыванием лиганда с рецептором, приводит к транскрипции репортера BFP.

[0036] На **ФИГ. 2** схематично представлены результаты экспериментов, проведенных для оценки профиля активации первичных CD4⁺ Т-клеток человека, содержащих (4×)HNF1α-ответный элемент-репортер в отсутствие рецептора для активации его транскрипции. В этих экспериментах активация в течение 72-часового периода первичных Т-клеток CD4⁺ человека, содержащих (4×)HNF1α-ответный элемент-репортер. Приблизительно 1×10⁵ Т клеток культивировали по отдельности (верхняя кривая) с 1×10⁵ K562 клеток K562 (средняя кривая) или с 1×10⁵ CD19⁺ K562 клеток (нижняя кривая) в течение 24, 48 или 72 часов, и активацию транскрипции индуцибельного репортера BFP измеряли с использованием Fortessa X-50 (BD). Указан процент клеток, активированных CD19⁺ K562 (нижняя кривая, %).

[0037] На **ФИГ. 3А-3В** схематически суммированы результаты экспериментов, проведенных для оценки функциональности pRay239, который представляет собой пример гуманизированного рецептора «MiniNotch». На **ФИГ. 3А** схематически изображен рецептор pRay239, который представляет собой гуманизированный рецептор «MiniNotch», содержащий следующие признаки в направлении от N-конца к С-концу: antiCD19scFv-Notch1deltaNRR-Notch2STS-HNF1αDBD-p65(361-551). На **ФИГ. 3В** показан профиль активации рецептора pRay239. Приблизительно 1×10⁵ двойных положительных Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19-рецепторы и векторы ответа, культивировали по отдельности (верхняя кривая), с 1×10⁵ K562 клеток (средняя кривая), или с 1×10⁵ CD19⁺ K562 клеток (нижняя кривая) в течение 24, 48 или 72 часа. Транскрипционную активацию индуцибельного репортера BFP измеряли с использованием Fortessa X-50 (BD). Указан процент клеток, активированных CD19⁺ K562 (нижняя кривая, %).

[0038] На **ФИГ. 4А-4В** схематически суммированы результаты экспериментов, проведенных для оценки функциональности pRay240, который представляет собой типичный гуманизированный рецептор «HingeNotch» в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения. На **ФИГ. 4А** схематически изображен рецептор pRay240, который представляет собой гуманизированный рецептор «HingeNotch», содержащий следующие признаки в направлении от N-конца к С-концу: antiCD19scFv-CD8Hinge2-Notch1TMD-Notch2STS-HNF1αDBD-p65(361-551). На **ФИГ. 4В** изображен профиль активации рецептора, определенный с помощью той же процедуры, что и на **ФИГ. 3В**.

[0039] На **ФИГ. 5А-5В** схематически суммированы результаты экспериментов, проведенных для оценки функциональности pRay241, который представляет собой пример гуманизированного рецептора «RoboNotch». На **ФИГ. 5А** схематически изображен рецептор pRay241, который представляет собой гуманизированный рецептор «RoboNotch», содержащий следующие признаки в направлении от N-конца к С-концу: antiCD19scFv-RoboFn-Notch1TMD-HNF1αDBD-p65(361-551). На **ФИГ. 5В** изображен

профиль активации рецептора, определенный с помощью той же процедуры, что и на **ФИГ. 3В**.

[0040] На **ФИГ. 6А-6В** схематически суммированы результаты экспериментов, проведенных для оценки функциональности pRay242, примера гуманизированного рецептора «HingeNotch». На **ФИГ. 6А** схематически изображен рецептор pRay242 рецептор, который представляет собой гуманизированный вариант рецептора «HingeNotch» с перевернутыми DBD и TAD, содержащий следующие признаки в направлении от N-конца к С-концу: antiCD19scFv-CD8Hinge2-Notch1TMD-Notch2STS-p65(361-551)-HNF1αDBD. На **ФИГ. 6В** изображен профиль активации рецептора, определенный с помощью той же процедуры, что и на **ФИГ. 3В**.

[0041] На **ФИГ. 7А-7В** схематически суммированы результаты экспериментов, проведенных для оценки функциональности pRay243, другого примера гуманизированного рецептора «HingeNotch» в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения. На **ФИГ. 7А** схематически изображен рецептор pRay243 рецептор, который представляет собой другой гуманизированный вариант рецептора «HingeNotch» с расширением Notch1 (1878) и ДНК-связывающим доменом HNF1α, который содержит следующие признаки в направлении от N-конца к С-концу: antiCD19scFv-CD8Hinge2-Notch1(1758-1878)-HNF1αDBD-p65(361-551). На **ФИГ. 7В** изображен профиль активации рецептора, определенный с помощью той же процедуры, что и на **ФИГ. 3В**.

[0042] На **ФИГ. 8А-8В** схематически суммированы результаты экспериментов, проведенных для оценки функциональности pRay244, другого примера гуманизированного рецептора «HingeNotch» в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения. На **ФИГ. 8А** схематически изображен рецептор pRay244, который представляет собой гуманизированный вариант рецептора «HingeNotch» с удлинением Notch1 (1788) и ДНК-связывающим доменом HNF1α, который содержит следующие признаки в направлении от N-конца к С-концу: antiCD19scFv-CD8Hinge2-Notch1(1758-1788)-HNF1αDBD-p65(361-551). На **ФИГ. 8В** изображен профиль активации рецептора, определенный с помощью той же процедуры, что и на **ФИГ. 3В**.

[0043] На **ФИГ. 9А-9В** схематически суммированы результаты экспериментов, проведенных для оценки функциональности pRay250, другого примера гуманизированного рецептора «HingeNotch» в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения. На **ФИГ. 9А** схематически изображен рецептор pRay250 рецептор, который представляет собой гуманизированный вариант рецептора «HingeNotch» с удлинением Notch1 (1800) и ДНК-связывающим доменом HNF1α, который содержит следующие признаки в направлении от N-конца к С-концу: antiCD19scFv-CD8Hinge2-Notch1(1758-1800)-HNF1αDBD-p65(361-551). На **ФИГ. 9В** изображен профиль активации рецептора, определенный с помощью той же процедуры, что и на **ФИГ. 3В**.

[0044] На **ФИГ. 10А-10В** схематически суммированы результаты экспериментов, проведенных для оценки функциональности pRay251, другого примера гуманизированного рецептора «HingeNotch» в соответствии с некоторыми вариантами осуществления

изобретения. На **ФИГ. 10А** схематически изображен рецептор pRay251, который представляет собой гуманизированный вариант рецептора «HingeNotch» с удлинением Notch1 (1825) и ДНК-связывающим доменом HNF1 α , который содержит следующие признаки в направлении от N-конца к С-концу: antiCD19scFv-CD8Hinge2-Notch1(1758-1825)-HNF1 α DBD-p65(361-551). На **ФИГ. 10В** изображен профиль активации рецептора, определенный с помощью той же процедуры, что и на **ФИГ. 3В**.

[0045] На **ФИГ. 11А-11В** схематически суммированы результаты экспериментов, проведенных для оценки функциональности pRay252, другого примера гуманизированного рецептора «HingeNotch» в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения. На **ФИГ. 11А** схематически изображен рецептор pRay252, который представляет собой гуманизированный вариант рецептора «HingeNotch» с удлинением Notch1 (1850) и ДНК-связывающим доменом HNF1 α , который содержит следующие признаки в направлении от N-конца к С-концу: antiCD19scFv-CD8Hinge2-Notch1(1758-1850)-HNF1 α DBD-p65(361-551). На **ФИГ. 11В** изображен профиль активации рецептора, определенный с помощью той же процедуры, что и на **ФИГ. 3В**.

[0046] На **ФИГ. 12** схематично представлены результаты экспериментов, проведенных для оценки профиля активации первичных CD4⁺ Т-клеток человека, содержащих (4 $\times$)Рах6-ответный элемент-репортер, в отсутствие активирующего рецептора. В этих экспериментах активация в течение 72-часового периода первичных Т-клеток CD4⁺ человека, содержащих (4 $\times$)Рах6-ответный элемент-репортер. Приблизительно 1×10^5 Т-клеток культивировали по отдельности (верхняя кривая), с 1×10^5 клеток К562 (средняя кривая), или с 1×10^5 CD19⁺ клеток К562 (нижняя кривая) в течение 24, 48 или 72 часа, и активацию транскрипции индуцибельного репортера BFP измеряли с использованием Fortessa X-50 (BD). Указан процент клеток, активированных CD19⁺ К562 (нижняя кривая, %).

[0047] На **ФИГ. 13А-13В** схематически суммированы результаты экспериментов, проведенных для оценки функциональности pRay253, другого примера гуманизированного рецептора «HingeNotch» в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения. На **ФИГ. 13А** схематически изображен рецептор pRay253, который представляет собой гуманизированный вариант рецептора «HingeNotch» с удлинением Notch1 (1878) и ДНК-связывающим доменом Рах6, который содержит следующие признаки в направлении от N-конца к С-концу: antiCD19scFv-CD8Hinge2-Notch1(1758-1878)-Рах6DBD-p65(428-551). На **ФИГ. 13В** показан профиль активации рецептора pRay253. Приблизительно 1×10^5 двойных положительных Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы и векторы ответа, культивировали по отдельности (верхняя кривая) с 1×10^5 клеток К562 (средняя кривая) или с 1×10^5 CD19⁺ клеток К562 (нижняя кривая) в течение 24, 48 или 72 часа. Активацию транскрипции индуцибельного репортера BFP измеряли с использованием Fortessa X-50 (BD). Указан процент клеток, активированных CD19⁺ К562 (нижняя кривая, %).

[0048] На **ФИГ. 14А-14В** схематически суммированы результаты экспериментов, проведенных для оценки функциональности pRay254, другого примера гуманизированного рецептора «HingeNotch» в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения. На **ФИГ. 14А** схематически изображен рецептор pRay254 рецептор, который представляет собой гуманизированный вариант рецептора «HingeNotch» с удлинением Notch1 (1788) и ДНК-связывающим доменом Pax6, который содержит следующие признаки в направлении от N-конца к С-концу: antiCD19scFv-CD8Hinge2-Notch1(1758-1788)-Pax6DBD-p65(428-551). На **ФИГ. 14В** изображен профиль активации рецептора, определенный с помощью той же процедуры, что и на **ФИГ. 13В**.

[0049] На **ФИГ. 15А-15В** схематически суммированы результаты экспериментов, проведенных для оценки функциональности pRay255, еще другого примера гуманизированного рецептора «HingeNotch» в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения. На **ФИГ. 15А** схематически изображен рецептор pRay255 рецептор, который представляет собой гуманизированный вариант рецептора «HingeNotch» ДНК-связывающим доменом Pax6, который содержит следующие признаки в направлении от N-конца к С-концу: antiCD19scFv-CD8Hinge2-Notch1TMD-Notch2STS-Pax6DBD-p65(428-551). На **ФИГ. 15В** изображен профиль активации рецептора, определенный с помощью той же процедуры, что и на **ФИГ. 13В**.

[0050] **ФИГ. 16А** схематически обобщены результаты экспериментов, проведенных для иллюстрации того, что двойная векторная схема, состоящая из гуманизированного рецептора HingeNotch с использованием фактора транскрипции HNF1A (pRay240) и ответного элемента, управляющего полезной нагрузкой BCMA-CAR, может индуцировать экспрессию CAR (только в присутствии CD19) до уровней, совпадающих с уровнями конститутивно экспрессируемого CAR, управляемого промотором вируса, формирующего очаги селезенки, склонного к молчанию (SFFV). Эти эксперименты показывают уничтожение клеток-мишеней лентивирусными векторными конструкциями, содержащими гуманизированные рецепторы HingeNotch и индуцированные цепи BCMA-CAR. Первичные Т-клетки человека активировали анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали лентивирусными конструкциями, экспрессирующими полностью гуманизированный рецептор HingeNotch (HNF1A), и лентивирусным вектором с индуцируемой кассетой анти-BCMA-CAR, нижестоящими ответными элементами HNF1A и минимальным промотором. Клетки сортировали по экспрессии гуманизированного рецептора HingeNotch с помощью msc-tag на 5-й день после первоначальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации вместе с конститутивно экспрессируемым анти-BCMA CAR и негуманизированной схемой рецептора HingeNotch на основе Gal4 в качестве контроля. Для исследования 1×10^5 Т-клеток культивировали совместно с 1×10^5 CD19+ клеток K562 (левые панели) или 1×10^5 BCMA+ CD19+ клеток K562 (правые панели). Индукцию CAR оценивали путем окрашивания маркированного FLAG анти-BCMA CAR (левые панели). Гибель клеток-мишеней оценивали в течение 72 часов с помощью окрашивания DRAQ7 и проточной

цитометрии с помощью Fortessa X-50 (BD) (правая панель). Полностью гуманизированные схемы HingeNotch эффективно очищали клетки-мишени примерно так же эффективно, как схемы на основе CAR или Gal4VP64.

[0051] На **ФИГ. 16В** описан эксперимент *in vivo*, в котором полностью гуманизированная схема рецептора может эффективно и специфически очищать опухоли в модели с двумя антигенами, предлагая, таким образом, неиммуногенное решение для специфического нацеливания на опухоли. В этих экспериментах мышам NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) имплантировали 1×10^6 Опухолевых клеток K562-BCMA/CD19 подкожно в левый бок и 1×10^6 опухолевых клеток K562-BCMA в правый бок. Через четыре дня после имплантации опухоли 3×10^6 сконструированных первичных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток человека (всего 6×10^6 Т клеток) вводили внутривенно через инъекцию в хвостовую вену. Размер опухоли контролировали с помощью штангенциркуля 2-3 раза в неделю, и определяли, что мыши достигли конечной точки, когда размеры опухолей составляли ≥ 20 мм. Полностью гуманизированные циклы HingeNotch (триггер CD19 к схеме полезной нагрузки анти-BCMA CAR) эффективно удаляли опухоли с двойным положительным статусом, а не опухоли с одним положительным результатом.

[0052] На **ФИГ. 17** схематично представлены результаты экспериментов, проведенных для иллюстрации профиля активации одновекторных рецепторов. 1×10^5 двойных положительных Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы и векторы ответа анти-BCMA CAR культивировали с 1×10^5 BCMA⁺ клеток K562 (верхняя кривая), или с 1×10^5 BCMA⁺ CD19⁺ клеток K562 (нижняя кривая) в течение 72 часов. Транскрипционную активацию индуцибельного FLAG-меченого анти-BCMA CAR измеряли окрашиванием FLAG-PE на Fortessa X-50 (BD). Отображается процент клеток, активированных BCMA⁺ CD19⁺ K562 (нижняя кривая, %).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0053] Настоящее изобретение в целом относится, среди прочего, к новому классу химерных олигомеризуемых рецепторов Notch, содержащих гуманизированный эффектор транскрипции, сконструированный для модулирования регуляции транскрипции лиганд-зависимым образом. Активность этих полностью гуманизированных рецепторов Notch можно контролировать с помощью внеклеточного лиганда, что позволяет осуществлять пространственный и временной контроль экспрессии специфических генов в клетках млекопитающих, а также использовать их для модулирования клеточной активности или для лечения различных состояний здоровья, таких как болезни (например, рак). В частности, новые рецепторы (названные «гуманизированными HingeNotch»), хотя и происходят от Notch, не требуют субъединицы NEC Notch, в частности, NRR, который ранее считался важным для функционирования рецепторов. Этот новый класс рецепторов является синтетическим и рекомбинантным и не встречается в природе. Как описано ниже, химерные полипептиды Notch, описанные в настоящем документе, могут быть синтетическими полипептидами и могут быть сконструированы, сконструированы или модифицированы для обеспечения желаемых и/или улучшенных свойств, например,

модуляции транскрипции. Демонстрация того, что новые гуманизированные рецепторы HingeNotch, лишенные NRR, не только функциональны, но и демонстрируют повышенную биологическую активность, является неожиданной и противоречит положениям в данной области. Кроме того, новые химерные рецепторы, описанные в настоящем документе, включают внеклеточный домен олигомеризации для стимуляции образования олигомерных форм, например, димерных или тримерных форм химерных рецепторов. Считается, что такая конструкция способствует олигомеризации и/или кластеризации рецепторов и улучшает лиганд-зависимую активацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения рецепторы, описанные в настоящем документе, связываются с лигандом на поверхности клетки-мишени, который запускает протеолитическое расщепление химерного рецептора и высвобождение эффектора транскрипции, который модулирует специальную программу транскрипции в клетке. В изобретении предложены также композиции и способы, которые могут быть использованы для получения таких рецепторов, нуклеиновых кислот, кодирующих их, клеток, генетически модифицированных нуклеиновыми кислотами, а также способы модуляции активности клетки и/или для лечения различных заболеваний, таких как рак. Как описано в примерах 11-12 и показано на **ФИГ. 16А-16В** и **17** далее, ряд гуманизированных рецепторов HingeNotch по настоящему изобретению может нацеливаться на уничтожение клеток и индуцировать цепи BCMA-CAR. В частности, эксперименты *in vivo*, показанные на **ФИГ. 16В**, демонстрируют, что двухвекторная схема полностью гуманизированного рецептора, описанная в настоящем документе, может эффективно и специфически очищать опухоли в модели с двойным антигеном, предлагая, таким образом, неиммуногенное решение для специфического нацеливания на опухоли. Кроме того, эксперименты *in vitro*, показанные на **ФИГ. 17**, демонстрируют, что рецепторы на основе Рах6 по настоящему изобретению достаточно малы, чтобы вписаться в единственную конфигурацию лентивирусного вектора. Соответственно, не привязываясь к какой-либо конкретной теории, этот одновекторный дизайн/состав позволит такой схеме войти в текущие утвержденные производственные конвейеры для клинических применений, а также откроет возможность использования различных вариантов доставки, таких как целевая интеграция через CRISPR/Методы Cas9.

[0054] В нижеследующем подробном описании делается ссылка на прилагаемые чертежи, которые составляют его часть. На чертежах аналогичные символы обычно обозначают аналогичные компоненты, если контекст не требует иного. Иллюстративные альтернативы, описанные в подробном описании, чертежах и формуле изобретения, не предназначены для ограничения. Могут быть использованы другие альтернативы и могут быть внесены другие изменения, не отступая от духа или объема предмета, представленного в настоящем документе. Будет легко понять, что аспекты, как в целом описано в настоящем документе здесь и проиллюстрировано на чертежах, могут быть расположены, заменены, объединены и спроектированы в большом количестве различных конфигураций, все из которых явно рассматриваются и составляют часть этой заявки.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0055] Форма единственного числа включает ссылки во множественном числе, если контекст явно не требует иного. Например, термин «клетка» включает одну или несколько клеток, включая их смеси. «А и/или В» используется в настоящем документе для включения всех следующих альтернатив: «А», «В», «А или В» и «А и В».

[0056] Термины «введение» и «назначение», как используется в настоящем документе, относятся к доставке композиции или состава, описанного в настоящем документе, путем введения, включая, но не ограничиваясь этим, внутривенный, внутриартериальный, внутричерепной, внутримышечный, внутрибрюшинно, подкожно, внутримышечно или их комбинации. Этот термин включает, но не ограничивается этим, введение медицинским работником и самостоятельное введение препарата.

[0057] «Рак» относится к наличию клеток, обладающих несколькими характеристиками, типичными для клеток, вызывающих рак, такими как неконтролируемая пролиферация, «бессмертие», метастатический потенциал, быстрый рост и скорость пролиферации, а также некоторые характерные морфологические признаки. Раковые клетки могут объединяться в массу, такую как опухоль, или могут существовать в организме субъекта поодиночке. Опухоль может быть солидной опухолью, опухолью мягких тканей или метастатическим поражением. Как используется в настоящем документе, термин «рак» также охватывает другие типы неопухолевого рака. Неограничивающие примеры включают рак крови или гематологический рак, такой как лейкомия. Рак может включать как предраковые, так и злокачественные виды рака.

[0058] Термин «человек» при использовании в отношении полинуклеотидной последовательности или полипептидной последовательности следует понимать как охватывающий полинуклеотидные последовательности или полипептидные последовательности, которые получены из человеческого источника, например, (i) такие, которые выделены от человека, (ii), модифицированные, сконструированные и/или синтезированные на основе полинуклеотидов или полипептидов человека и функционально и структурно родственные исходным человеческим белкам. Таким образом, термин «ген/белок, происходящий от человека», следует понимать как включающий не только исходный ген/белок, выделенный из клеток человека, но также ген/белок, полученный путем модификации человеческого гена/белка, ген/белок, сконструированный на основе исходного человеческого гена/белка, и ген/белок, синтезированный *in vitro* или *in vivo* на основе исходного человеческого гена/белка. Следует понимать, что человеческие нуклеотидные последовательности и белки, кодируемые ими, часто включают некоторую степень изменчивости по всему спектру аллельных последовательностей в глобальных популяциях. Соответственно, термин «человек» при использовании в отношении полинуклеотидной последовательности или полипептидной последовательности следует понимать как включающий полинуклеотидные последовательности или полипептидные последовательности на около 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или на около 100% идентичные

человеческим полинуклеотидным последовательностям или полипептидным последовательностям.

[0059] Термин «гуманизированный», как он используется в настоящем документе, когда он используется в отношении полинуклеотидной последовательности или полипептидной последовательности, будет пониматься как охватывающий нечеловеческие последовательности, например, полинуклеотидные последовательности или полипептидные последовательности на менее чем около 95% идентичные последовательности белка человека, которые были сконструированы или модифицированы таким образом, что они не являются иммуногенными или лишь минимально иммуногенными для среднего субъекта-человека.

[0060] Термины «клетка», «клеточная культура» и «клеточная линия» относятся не только к конкретной рассматриваемой клетке или клеточной линии, но также к потомству или потенциальному потомству такой клетки, клеточной культуры или клеточной линии, без учета количества пересевов или пассажей в культуре. Следует понимать, что не все потомство в точности идентично родительской клетке. Это связано с тем, что некоторые модификации могут возникать в последующих поколениях либо из-за мутаций (например, преднамеренных или непреднамеренных мутаций), либо из-за влияния окружающей среды (например, метилирования или других эпигенетических модификаций), так что потомство может фактически не быть идентичным родительской клетке, но все же включено в объем термина, используемого в настоящем документе, при условии, что потомство сохраняет ту же функциональность, что и исходная клетка, клеточная культура или клеточная линия.

[0061] Термин «модулирующий» в отношении экспрессии или активности полипептида относится к изменению экспрессии или активности полипептида. Модуляция включает как активацию (например, увеличение, индукция, стимуляция), так и репрессию или ингибирование (например, уменьшение, снижение, ингибирование) или иное воздействие на экспрессию или активность полипептида. Термин может также относиться к снижению, уменьшению, ингибированию, увеличению, индукции, активации или иному влиянию на активность гена, кодирующего полипептид, что может включать, но не ограничивается этим, модулирование транскрипционной активности.

[0062] Термин «функционально связанный», как используется в настоящем документе, обозначает физическую или функциональную связь между двумя или более элементами, например, полипептидными последовательностями или полинуклеотидными последовательностями, которая позволяет им действовать предполагаемым образом.

[0063] Термин «процент идентичности», как используется в настоящем документе в контексте двух или более нуклеиновых кислот или белков, относится к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент одинаковых нуклеотидов или аминокислот (например, около 60% идентичности последовательности, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или выше идентичности в указанной области при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или в обозначенной

области) при определении с использованием алгоритмов сравнения последовательностей BLAST или BLAST 2.0 с параметрами по умолчанию, описанными ниже, или путем ручного выравнивания и визуального осмотра. См., например, веб-сайт NCBI по адресу ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Такие последовательности затем называются «по существу идентичными». Это определение также относится или может быть применено к комплементу последовательности. Это определение также включает последовательности с делециями и/или добавлениями, а также последовательности с заменами. Идентичность последовательности может быть рассчитана для области, которая имеет длину по меньшей мере около 20 аминокислот или нуклеотидов, или для области, которая имеет длину 10-100 аминокислот или нуклеотидов, или для всей длины данной последовательности. Идентичность последовательности можно рассчитать с использованием опубликованных методов и широко доступных компьютерных программ, таких как пакет программ GCS (Devereux et al, *Nucleic Acids Res.* **12**:387, 1984), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul *et al.*, *J Mol Biol* **215**:403, 1990). Идентичность последовательности может быть определена с использованием программного обеспечения для анализа последовательности, такого как пакет программного обеспечения для анализа последовательности компьютерной группы Genetics в Центре биотехнологии Университета Висконсина (1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705) с его параметрами по умолчанию.

[0064] Как используется в настоящем документе и если не указано иное, «терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективное число» агента представляет собой количество или число, достаточное для обеспечения терапевтического эффекта при лечении или контроле состояния здоровья, таким как заболевание (например, рак) или для задержки или сведения к минимуму одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием. Терапевтически эффективное количество или число соединения означает количество или число терапевтического агента, отдельно или в комбинации с другими терапевтическими агентами, которое обеспечивает терапевтический эффект при лечении или контроле заболевания. Термин «терапевтически эффективное количество» может охватывать количество или число, которое улучшает общую терапию заболевания, уменьшает или устраняет симптомы или причины заболевания или повышает терапевтическую эффективность другого терапевтического средства. Примером «эффективного количества» является количество, достаточное для лечения, предотвращения или уменьшения симптома или симптомов заболевания, которое также можно назвать «терапевтически эффективным количеством». «Уменьшение» симптома означает уменьшение тяжести или частоты симптома(ов) или устранение симптома(ов). Точное количество композиции, включая «терапевтически эффективное количество», будет зависеть от цели лечения и может быть установлено специалистом в данной области с использованием известных методов (см., например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 2010); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (2016); Pickar, *Dosage Calculations* (2012); и

Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, 2012, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

[0065] Как используется в настоящем документе, термин «субъект» или «индивидуум» включает животных, таких как человек (например, субъект-человек) и животных, отличных от человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения «субъектом» или «индивидуумом» является пациент, находящийся под наблюдением врача. Таким образом, субъект может быть пациентом-человеком или субъектом, у которого имеется, он находится в группе риска или подозревается в наличии интересующего заболевания (например, рака) и/или одного или нескольких симптомов заболевания. Субъект также может быть субъектом, у которого диагностирован риск интересующего состояния во время постановки диагноза или позднее. Термин «животные, отличные от человека», включает всех позвоночных, например, млекопитающих, например, грызунов, например, мышей, приматов, отличных от человека, и других млекопитающих, таких как, например, овец, собак, коров, кур и немлекопитающих, например, амфибии, рептилии и т. д.

[0066] Там, где указан диапазон значений, подразумевается, что изобретением охватывается каждое промежуточное значение с точностью до десятой доли единицы нижнего предела, если из контекста явно не следует иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим указанным или промежуточное значение в указанном диапазоне. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут независимо включаться в меньшие диапазоны, а также охватываются описанием с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. В тех случаях, когда указанный диапазон включает один или оба предела, в раскрытие также включаются диапазоны, исключающие один или оба указанных предела.

[0067] Все диапазоны, описанным в настоящем документе, также охватывают любые и все возможные поддиапазоны и комбинации их поддиапазонов. Любой из перечисленных диапазонов может быть признан в достаточной степени описывающим и позволяющим разбить один и тот же диапазон, по меньшей мере, на равные половины, трети, четверти, пятые, десятые доли и т. д. В качестве неограничивающего примера каждый обсуждаемый в настоящем документе диапазон может быть легко разбит на нижнюю треть, среднюю треть и верхнюю треть и так далее. Как также будет понятно специалисту в данной области техники, все формулировки, такие как «до», «по меньшей мере», «больше чем», «меньше чем» и тому подобное, включают указанное число и относятся к диапазонам, которые могут быть впоследствии разбиты на поддиапазоны, как описано выше. Наконец, как будет понятно специалисту в данной области, диапазон включает каждый отдельный член. Так, например, группа, содержащая 1-3 статьи, относится к группам, имеющим 1, 2 или 3 статьи. Точно так же группа, содержащая 1-5 статей, относится к группам, имеющим 1, 2, 3, 4 или 5 статей и так далее.

[0068] Понятно, что некоторые признаки изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть предоставлены в

комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть предоставлены по отдельности или в любой подходящей комбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящихся к изобретению, конкретно охватываются настоящим изобретением и описаны в настоящем документе точно так же, как если бы каждая комбинация была описана отдельно и явно. Кроме того, все подкомбинации различных вариантов осуществления и их элементы также специально охватываются настоящим изобретением и описываются в настоящем документе точно так же, как если бы каждая такая подкомбинация была описана в настоящем документе по отдельности и в явном виде.

РЕЦЕПТОРЫ NOTCH

[0069] Рецепторы Notch представляют собой трансмембранные белки, которые опосредуют передачу сигналов межклеточного контакта и играют центральную роль в развитии и других аспектах межклеточной коммуникации. Рецепторы Notch имеют модульную организацию доменов. Внеклеточная субъединица Notch (NEC) рецепторов Notch дикого типа состоит из серии повторов, подобных N-концевому эпидермальному фактору роста (EGF), которые ответственны за связывание лиганда. О-связанное гликозилирование этих повторов EGF, включая модификацию гликозилтрансферазами О-фукозы, Fringe и Rumi, также модулирует активность рецепторов Notch в ответ на различные подтипы лигандов у мух и млекопитающих. За повторами EGF следуют три модуля LIN-12/Notch Repeat (LNR), которые уникальны для рецепторов Notch и, как широко известно, участвуют в предотвращении преждевременной активации рецепторов. О-связанное гликозилирование этих повторов EGF, включая модификацию гликозилтрансферазами О-фукозы, Fringe и Rumi, также модулирует активность рецепторов Notch в ответ на различные подтипы лигандов у мух и млекопитающих. За повторами EGF следуют три модуля LIN-12/Notch Repeat (LNR), которые уникальны для рецепторов Notch и, как широко известно, участвуют в предотвращении преждевременной активации рецепторов. Домен гетеродимеризации (HD) Notch1 делится фуриновым расщеплением во время экспрессии, так что его N-концевая часть заканчивается внеклеточной субъединицей Notch (NEC), а его С-концевая половина составляет начало трансмембранной субъединицы Notch (NTM). N-концевая и С-концевая части домена HD связываются друг с другом и удерживают рецептор вместе за счет нековалентных взаимодействий. За внеклеточной HD-С областью NEC следует трансмембранный сегмент и внутриклеточная область (ICN), включающая активатор транскрипции.

[0070] Рецепторы Notch опосредуют передачу сигналов межклеточного контакта и играют центральную роль в развитии и других аспектах межклеточной коммуникации, например коммуникации между двумя контактирующими клетками, в которой одна контактирующая клетка является клеткой-«получателем», а другая контактирующая ячейка является ячейкой-отправителем. Notch-рецепторы, экспрессируемые в реципиентной клетке, распознают свои лиганды (например, семейство белков дельта/серрейт/лаг или

«DSL»), экспрессируемые в посылающей клетке. Взаимодействие notch и delta с этими контактирующими клетками приводит к двухступенчатому протеолизу рецептора notch, который в конечном итоге вызывает высвобождение внутриклеточной части рецептора из мембраны в цитоплазму. Notch имеет сайт расщепления металлопротеазой (обозначенный «S2»), который в норме защищен от расщепления Notch-негативной регуляторной областью (NRR), доменом, состоящим из трех модулей LNR и HD NEC. Считается, что этот двухстадийный протеолиз регулируется силой, прилагаемой клеткой-отправителем: лиганд DSL тянет за рецептор Notch и изменяет конформацию негативной регуляторной области, обнажая сайт металлопротеазы. Затем этот сайт расщепляется конститутивно активной протеазой, высвобождая внеклеточную связывающую часть и негативную регуляторную область (NRR) рецептора. Высвобождение внеклеточной связывающей части рецептора, в свою очередь, обнажает другой сайт(ы) внутримембранного расщепления (обозначенный как «S3»), который расщепляется/расщепляется γ -секретазой внутри клеточной мембраны с высвобождением внутриклеточного домена ядерного самонаведения из клеточной мембраны. W.R. Gordon *et al.*, *Dev Cell* (2015) **33**:729-36. Этот высвобожденный домен изменяет поведение клетки-приемника, действуя как эффектор транскрипции.

[0071] Рецепторы Notch участвуют и необходимы для множества клеточных функций во время развития и важны для функционирования огромного числа типов клеток у разных видов. Эволюционная дивергенция позвоночных и беспозвоночных сопровождалась по крайней мере двумя раундами дубликации генов с участием рецепторов Notch: у мух имеется один ген Notch, у червей два (GLP-1 и LIN-12), а у млекопитающих четыре (NOTCH1-4). Трансдукция сигналов Notch зависит от трех ключевых событий: (i) узнавание лиганда, (ii) конформационная экспозиция лиганд-зависимого сайта расщепления и (iii) сборка ядерных комплексов активации транскрипции.

[0072] Канонические сигналы Notch передаются в процессе, называемом регулируемым внутримембранным протеолизом. Рецепторы Notch обычно поддерживаются в покое, протеолитически устойчивой конформации на клеточной поверхности, но связывание лиганда инициирует протеолитический каскад, который высвобождает внутриклеточную часть рецептора (также известную как внутриклеточный Notch (ICN) или внутриклеточный домен Notch (NICD)) из мембраны. Критический регулируемая стадия расщепления осуществляется металлопротеазами ADAM и происходит в месте, называемом S2, непосредственно снаружи плазматической мембраны. Этот укороченный рецептор, получивший название NEXT (от внеклеточного усечения Notch), остается связанным с мембраной до тех пор, пока он не подвергнется обработке в сайте S3 с помощью γ -секретазы, мультипротеинового ферментного комплекса.

[0073] После расщепления, опосредованного γ -секретазой, ICN в конечном итоге попадает в ядро, где собирает комплекс активации транскрипции, который содержит ДНК-связывающий фактор транскрипции, называемый CSL (C-промотор-связывающий фактор у млекопитающих; также известный как RBP-J)/супрессор безволосости у *Drosophila melanogaster* или Lag1 у *Caenorhabditis elegans*) и транскрипционный коактиватор

семейства Mastermind/Lag-3. Затем этот комплекс задействует дополнительные белки-коактиваторы, такие как p300, для рекрутирования основного аппарата транскрипции и активации экспрессии нижестоящих генов-мишеней.

[0074] Дополнительную информацию относительно Notch-рецепторов и Notch-опосредованной клеточной сигнализации можно найти, например, в работах W.R. Gordon *et al.*, *Dev Cell* (2015) **33**:729-36 и W.R. Gordon *et al.*, *J. Cell Sci.* (2008) **121**:3109-19, которые обе настоящим включены в качестве ссылки.

КОМПОЗИЦИИ ПО ИЗОБРЕТЕНИЮ

[0075] Как более подробно описано далее, один аспект настоящего изобретения относится к новому классу химерных рецепторов Notch, которые включают гуманизированный эффектор транскрипции и сконструированы для модулирования регуляции транскрипции лиганд-зависимым образом с различными преимуществами по сравнению с существующими рецепторами SynNotch первого поколения. Например, поскольку естественные рецепторы Notch имеют большие размеры, а субъединица NEC содержит несколько десятков tandemных EGF-подобных повторов, путем исключения Notch-негативных регуляторных областей или даже всей субъединицы NEC полинуклеотиды, кодирующие рецепторы по настоящему изобретению, могут быть сделаны меньше, чем естественные рецепторы Notch и существующие полинуклеотиды, кодирующие SynNotch, что позволяет использовать векторы с более ограниченной емкостью или включать дополнительные элементы, которые в противном случае были бы исключены из-за ограничений размера, связанных с емкостью вектора.

[0076] Кроме того, новые рецепторы включают внеклеточный домен олигомеризации для стимуляции образования олигомерных форм, например, димерных или тримерных форм химерных рецепторов. Не привязываясь к какой-либо конкретной теории, эта конструкция способствует олигомеризации или кластеризации рецепторов для активации или усиления лиганд-зависимой модуляции ответного элемента. Комбинация полностью гуманизированного эффектора транскрипции и внеклеточного домена олигомеризации образует уникальные терапевтические системы рецепторов Notch, которые являются искусственными, масштабируемыми и регулируемые для экспрессии желаемых генов и ответных элементов, не обладают иммуногенностью или обладают минимальной иммуногенностью и, следовательно, имеют пониженный риск вызвать иммунологическое отторжение терапии. Это особенно важно, потому что клеточная терапия сложна и дорога в производстве, и важно, чтобы сконструированные клетки обладали длительной устойчивой активностью у пациента. Если клеточная терапия будет (или может быть) быстро устранена из-за иммунного ответа на нечеловеческие компоненты рецепторов, дальнейшее развитие таких методов лечения может быть прекращено из-за неприемлемого риска. Описанный в настоящем документе новый класс гуманизированных рецепторов предназначен для снижения этого риска.

[0077] Как описано в примерах, некоторые химерные полипептидные рецепторы были протестированы и подтверждены на первичных Т-клетках человека. Ожидается, что

эти новые рецепторы продемонстрируют аналогичную эффективность в моделях на мышах, а также в моделях на других подходящих животных или в системах *in vitro*. Рецепторы, описанные в настоящем документе, могут быть сконструированы в различные типы иммунных клеток для улучшенного различения и устранения опухолей или в сконструированные клетки для контроля аутоиммунитета и регенерации тканей. Соответственно, сконструированные клетки, такие как иммунные клетки, сконструированные для экспрессии одного или нескольких химерных рецепторов, описанных в настоящем документе, также входят в объем настоящего изобретения.

Химерные полипептиды

[0078] Как указано выше, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к новым, не встречающимся в природе химерным полипептидам, сконструированным для модулирования регуляции транскрипции лиганд-зависимым образом. В частности, новые химерные рецепторы, даже если они происходят от Notch, не нуждаются в Notch-негативных регуляторных областях (NRR), которые ранее считались существенными для функционирования рецепторов. Кроме того, новые сконструированные рецепторы, описанные в настоящем документе, включают внеклеточный домен олигомеризации (например, шарнирный домен), чтобы стимулировать олигомеризацию с образованием олигомерных, например, димерных или тримерных форм более высокого порядка химерных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает полипептидные мотивы, способные способствовать образованию олигомера химерного полипептида посредством межмолекулярной дисульфидной связи. Внеклеточный домен олигомеризации может заменять часть или весь внеклеточный домен Notch. В некоторых вариантах осуществления изобретения рецепторы, описанные в настоящем документе, связываются с лигандом на поверхности клетки-мишени, который запускает протеолитическое расщепление рецепторов и высвобождение эффектора транскрипции, который модулирует специальную программу транскрипции в клетке.

[0079] В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем документе предложен химерный полипептид, включающий от N-конца к С-концу: (a) ECD, обладающий аффинностью связывания с выбранным лигандом; (b) шарнирный домен, способный способствовать образованию олигомера химерного полипептида посредством межмолекулярной дисульфидной связи; (c) TMD, включающий один или несколько индуцируемых лигандом сайтов протеолитического расщепления; и (d) ICD, включающая эффектор транскрипции человека или гуманизированный, где связывание выбранного лиганда с ECD индуцирует расщепление в индуцируемом лигандом сайте(ах) протеолитического расщепления между эффектором транскрипции и шарнирным доменом, и где химерный полипептид не включает повтор LIN-12-Notch (LNR) и/или домен гетеродимеризации (HD) рецептора Notch.

Внеклеточные домены (ECD)

[0080] Как указано выше, ECD химерных полипептидных рецепторов (например, гуманизированных рецепторов HingeNotch) в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения обладает аффинностью связывания с одним или несколькими лигандами-мишенями. Лиганд-мишень экспрессируется на клеточной поверхности или иным образом закрепляется, иммобилизуется или ограничивается, так что он может оказывать механическое воздействие на химерный рецептор. Таким образом, без привязки к какой-либо конкретной теории, связывание ECD химерного рецептора, предусмотренного в настоящем документе, с лигандом клеточной поверхности не обязательно приводит к удалению целевого лиганда с поверхности клетки-мишени, но оказывает механическое тянущее усилие на химерный рецептор. Например, растворимый в других отношениях лиганд может быть мишенью, если он связан с поверхностью или с молекулой во внеклеточном матриксе. В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд-мишень представляет собой лиганд клеточной поверхности. Неограничивающие примеры подходящих типов лигандов включают рецепторы клеточной поверхности; белки адгезии; углеводы, липиды, гликолипиды, липопротеины и липополисахариды, которые связаны с поверхностью; интегрины; муцины и лектины. В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд представляет собой белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд представляет собой углевод.

[0081] В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд представляет собой маркер кластера дифференцировки (CD). В некоторых вариантах осуществления изобретения CD маркер выбран из группы, включающей CD1, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD7, CD8a, CD8b, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27, CD28, CD33, CD34, CD40, CD45, CD48, CD52, CD59, CD66, CD70, CD71, CD72, CD73, CD79A, CD79B, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD94, CD95, CD134, CD140 (PDGFR4), CD152, CD154, CD158, CD178, CD181 (CXCR1), CD182 (CXCR2), CD183 (CXCR3), CD210, CD246, CD252, CD253, CD261, CD262, CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD276 (B7H3), CD279, CD295 CD339 (JAG1), CD340 (HER2), EGFR, FGFR2, CEA, AFP, CA125, MUC-1 и MAGE.

[0082] В некоторых вариантах осуществления изобретения внеклеточный домен включает лиганд-связывающую часть рецептора. В некоторых вариантах осуществления изобретения внеклеточный домен включает антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с одним или несколькими антигенами-мишенями. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент включает одну или несколько антигенсвязывающих детерминант антитела или его функционального антигенсвязывающего фрагмента. Специалист в данной области легко поймет, что термин «его функциональный фрагмент» или «его функциональный вариант» относится к молекуле, обладающей количественной и/или качественной биологической активностью, общей с молекулой дикого типа, из которой был получен фрагмент или вариант. Например, функциональный фрагмент или функциональный вариант антитела представляет собой фрагмент, который сохраняет по существу такую же способность связываться с тем же

эпитопом, что и антитело, из которого был получен функциональный фрагмент или функциональный вариант. Например, антитело, способное связываться с эпитопом рецептора клеточной поверхности, может быть укорочено на N-конце и/или C-конце, и сохранение его активности связывания эпитопа оценивается с использованием анализов, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, включающей антитело, нанотело, диатело, триатело или минитело, фрагмент F(ab')₂, фрагмент F(ab), одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) и однодоменное антитело (sdAb) или его функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент включает scFv.

[0083] Антигенсвязывающий фрагмент может включать природные аминокислотные последовательности или может быть разработана, сконструирована или модифицирована для обеспечения желаемых и/или улучшенных свойств, таких как, например, аффинность связывания. Как правило, аффинность связывания антигенсвязывающего фрагмента, например, антитела, с антигеном-мишенью (например, антигеном CD19) можно рассчитать методом Скэтчарда, описанным Frankel *et al.*, *Mol. Immunol.*, **16**:101-06, 1979. В некоторых вариантах осуществления изобретения аффинность связывания измеряют по скорости диссоциации антиген/антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения аффинность связывания измеряют с помощью конкурентного радиоиммуноанализа. В некоторых вариантах осуществления изобретения аффинность связывания измеряют с помощью ELISA. В некоторых вариантах осуществления изобретения аффинность антител измеряют с помощью проточной цитометрии. Антитело, которое «избирательно связывает» антиген (например, CD19), представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, который не связывает в значительной степени другие антигены, но связывает антиген-мишень с высокой аффинностью, например, с константой равновесия (KD) 100 нМ или меньше, например, 60 нМ или меньше, например, 30 нМ или меньше, например, 15 нМ или меньше, или 10 нМ или меньше, или 5 нМ или меньше, или 1 нМ или меньше, или 500 пМ или меньше, или 400 пМ или меньше, или 300 пМ или меньше, или 200 пМ или меньше, или 100 пМ или меньше.

[0084] Квалифицированный специалист может выбрать ECD на основе желаемой локализации или функции клетки, которая генетически модифицирована для экспрессии химерного полипептида (гуманизированного рецептора HingeNotch) по настоящему изобретению. Например, химерный полипептид с ECD, включающий антитело, специфичное к антигену HER2, может нацеливать клетки на клетки рака молочной железы, экспрессирующие HER2. В некоторых вариантах осуществления изобретения ECD описанных гуманизированных рецепторов HingeNotch способен связывать опухолеассоциированный антиген (ТАА) или опухолеспецифический антиген (TSA). Специалисту в данной области техники будет понятно, что ТАА включают молекулу, такую как, например, белок, присутствующую на опухолевых клетках и на нормальных клетках, или на многих нормальных клетках, но в гораздо более низкой концентрации, чем на

опухолевых клетках. Напротив, TSA обычно включают молекулу, такую как, например, белок, который присутствует в опухолевых клетках, но отсутствует в нормальных клетках.

[0085] В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент специфичен в отношении эпитопа, присутствующего в антигене, который экспрессируется опухолевой клеткой, то есть антигена, ассоциированного с опухолью. Опухولةассоциированный антиген может представлять собой антиген, связанный, например, с клеткой рака молочной железы, В-клеточной лимфомой, раком поджелудочной железы, клеткой лимфомы Ходжкина, клеткой рака яичников, клеткой рака предстательной железы, мезотелиомой, клеткой рака легкого, клеткой неходжкинской В-клеточной лимфомы (В-NHL), клеткой рака яичника, клеткой рака предстательной железы, клетка мезотелиомы, клеткой меланомы, клеткой хронического лимфоцитарного лейкоза, клеткой острого лимфолейкоза, клеткой нейробластомы, глиомой, глиобластомой, клеткой колоректального рака и т. д. Также следует понимать, что антиген, ассоциированный с опухолью, также может экспрессироваться нераковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен является специфичным для эпитопа, присутствующего в тканеспецифическом антигене. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен является специфичным для эпитопа, присутствующего в антигене, ассоциированном с заболеванием.

[0086] Неограничивающие примеры подходящих антигенов-мишеней включают CD19, B7H3 (CD276), BCMA (CD269), щелочную фосфатазу, плацентарного типа 2 (ALPPL2), зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), сигнальный регуляторный белок α (SIRP α), CD123, CD171, CD179 α , CD20, CD213A2, CD22, CD24, CD246, CD272, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD46, CD71, CD97, CEA, CLDN6, CLECL1, CS-1, EGFR, EGFRvIII, ELF2M, EpCAM, EphA2, эфрин B2, FAP, FLT3, GD2, GD3, GM3, GPRC5D, HER2 (ERBB2/neu), IGLL1, IL-11R α , KIT (CD 117), MUC1, NCAM, PAP, PDGFR- β , PRSS21, PSCA, PSMA, ROR1, SSEA-4, TAG72, TEM1/CD248, TEM7R, TSHR, VEGFR2, ALPI, цитруллинированный виментин, cMet и Axl.

[0087] В некоторых вариантах осуществления изобретения целевой антиген выбран из CD19, B7H3 (CD276), BCMA (CD269), ALPPL2, CD123, CD171, CD179 α , CD20, CD213A2, CD22, CD24, CD246, CD272, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD46, CD71, CD97, CEA, CLDN6, CLECL1, CS-1, EGFR, EGFRvIII, ELF2M, EpCAM, EphA2, эфрин B2, FAP, FLT3, GD2, GD3, GM3, GPRC5D, HER2 (ERBB2/neu), IGLL1, IL-11Ra, KIT (CD117), MUC1, NCAM, PAP, PDGFR- β , PRSS21, PSCA, PSMA, ROR1, SSEA-4, TAG72, TEM1/CD248, TEM7R, TSHR, VEGFR2, ALPI, цитруллинированный виментин, cMet, Axl, GPC2, рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (Her2/neu), CD276 (B7H3), IL-13R α 1, IL-13R α 2, α -фетопротеин (AFP), карциноэмбриональный антиген (CEA), раковый антиген-125 (CA-125), CA19-9, кальретицин, MUC-1, белок эпителиальной мембраны (EMA), антиген эпителиальной опухоли (ETA), тирозиназы, антигена, ассоциированного с меланомой (MAGE), CD34, CD45, CD123, CD93, CD99, CD117, хромогранина, цитокератина, десмина, глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), белка жидкости при макроскопической

кистозной болезни (GCDFP-15), ALK, DLK1, FAP, NY-ESO, WT1, антигена HMB-45, белка мелан-А (антиген меланомы, распознаваемый Т-лимфоцитами; MART-1), myo-D1, мышечно-специфического актина (MSA), нейрофиламента, нейронспецифической энолазы (NSE), плацентарной щелочной фосфатазы, синаптофизина, тиреоглобулина, тиреоидного фактора транскрипции-1, AOC3 (VAP-1), CAM-3001, CCL11 (эотаксин-1), CD125, CD147 (басигин), CD154 (CD40L), CD2, CD20, CD23 (рецептор IgE), CD25 (субъединица гетеродимерного рецептора IL-2), CD3, CD4, CD5, IFN- α , IFN- γ , IgE, области Fc IgE, IL-1, IL-12, IL-23, IL-13, IL-17, IL-17A, IL-22, IL-4, IL-5, IL-6, рецептора IL-6, интегрин α 4, интегрин α 4 β 7, LFA-1 (CD11 α), миостатина, OX-40, склеросцина, SOST, TGF β 1, TNF- α , VEGF-A, изофермента пируваткиназы типа M2 (опухоль M2-PK), CD20, CD5, CD7, CD3, TRBC1, TRBC2, BCMA, CD38, CD123, CD93, CD34, CD1 α , SLAMF7/CS1, FLT3, CD33, CD123, TALLA-1, CSPG4, DLL3, легкой каппа-цепи, легкой лямбда-цепи, CD16/ Fc γ RIII, CD64, FITC, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (ганглиозид G2), GD3, EGFRvIII (вариант III эпидермального фактора роста), EGFR и его изовариантов, TEM-8, белка спермы 17 (Sp17), мезотелина. Дополнительно неограничивающие примеры подходящих антигенов включают PAP (фосфатаза простаты), антиген стволовых клеток простаты (PSCA), простеин, NKG2D, TARP (белок с альтернативной рамкой считывания гамма-рецептора Т-клеток), Trp-p8, STEAP1 (шеститрансмембранный эпителиальный антиген простаты 1), аномальный белок gas, аномальный белок p53, интегрин β 3 (CD61), галактин, K-Ras (V-Ki-gas2 вирусный онкоген крысиной саркомы Кирстена), Ral-B, GPC2, CD276 (B7H3) или IL-13R α . В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой Her2. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой ALPPL2. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой BCMA. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент ECD является специфическим для репортерного белка, такого как GFP и eGFP. Неограничивающие примеры такого антигенсвязывающего фрагмента включают LaG17 анти-GFP нанотело. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент ECD включает анти-BCMA полностью гуманизированный домен VH (FHVH). В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой сигнальный регуляторный белок α (SIRP α).

[0088] Дополнительные антигены, подходящие для нацеливания химерными полипептидными рецепторами, описанными в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, GPC2, рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (Her2/neu), CD276 (B7H3), IL-13R α 1, IL-13R α 2, α -фетопроtein (AFP), карциноэмбриональный антиген (CEA), раковый антиген-125 (CA-125), CA19-9, кальретицин, MUC-1, белок эпителиальной мембраны (EMA), антиген эпителиальной опухоли (ETA). Другие подходящие антигены-мишени включают, но не ограничиваются ими, тирозиназу, антиген, ассоциированный с меланомой (MAGE), CD34, CD45, CD123, CD93, CD99, CD117, хромогранин, цитокератин, десмин, глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), белок жидкости при макроскопической кистозной болезни (GCDFP-15), ALK, DLK1, FAP, NY-ESO, WT1,

антиген HMB-45, белок мелан-А (антиген меланомы, распознаваемый Т-лимфоцитами; MART-1), myo-D1, мышечно-специфический актин (MSA), нейрофиламент, нейронспецифическую энолазу (NSE), плацентарную щелочную фосфатазу, синаптофизин, тиреоглобулин, тиреоидный фактор транскрипции-1.

[0089] Дополнительные антигены, подходящие для нацеливания химерными рецепторами, описанными в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, антигены, связанные с воспалительным заболеванием, такие как AOC3 (VAP-1), CAM-3001, CCL11 (эотаксин-1), CD125, CD147 (басигин), CD154 (CD40L), CD2, CD20, CD23 (рецептор IgE), CD25 (субъединица гетеромера рецептора IL-2), CD3, CD4, CD5, IFN- α , IFN- γ , IgE, области Fc IgE, IL-1, IL-12, IL-23, IL-13, IL-17, IL-17A, IL-22, IL-4, IL-5, IL-5, IL-6, рецептор IL-6, интегрин $\alpha 4$, интегрин $\alpha 4\beta 7$, LFA-1 (CD11 α), миостатин, OX-40, склеросцин, SOST, TGF β 1, TNF- α и VEGF-A.

[0090] Дополнительно антигены, подходящие для нацеливания химерными полипептидами, описанные в настоящем документе включают, но не ограничиваются ими, изофермент пируваткиназы типа M2 (опухоль M2-PK), CD20, CD5, CD7, CD3, TRBC1, TRBC2, BCMA, CD38, CD123, CD93, CD34, CD1 α , SLAMF7/CS1, FLT3, CD33, CD123, TALLA-1, CSPG4, DLL3, легкую каппа-цепь, легкую лямбда-цепь, CD16/Fc γ RIII, CD64, FITC, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (ганглиозид G2), GD3, EGFRvIII (вариант III эпидермального фактора роста), EGFR и его изоварианты, TEM-8, белок спермы 17 (Sp17), мезотелин. Дополнительно неограничивающие примеры подходящих антигенов включают PAP (фосфатаза простаты), антиген стволовых клеток простаты (PSCA), простеин, NKG2D, TARP (белок с альтернативной рамкой считывания гамма-рецептора Т-клеток), Trp-p8, STEAP1 (шеститрансмембранный эпителиальный антиген простаты 1), аномальный белок gas, аномальный белок p53, интегрин $\beta 3$ (CD61), галактин, K-Ras (V-Ki-gas2 вирусный онкоген крысиной саркомы Кирстена) и Ral-B. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой GPC2, CD19, Her2/neu, CD276 (B7H3), IL-13R α 1 или IL-13R α 2.

[0091] В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой Her2. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой ALPPL2. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой BCMA. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент ECD является специфическим для репортерного белка, такого как GFP и eGFP. Неограничивающие примеры такого антигенсвязывающего фрагмента включают LaG17 анти-GFP нанотело. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент ECD включает анти-BCMA полностью гуманизированный домен VH (FHVH).

[0092] В некоторых вариантах осуществления изобретения антигены, подходящие для нацеливания химерными полипептидами, описанными в настоящем документе, включают лиганды, полученные из патогена. Например, антиген может представлять собой HER2, продуцируемый HER2-положительными клетками рака молочной железы. В

некоторых вариантах осуществления изобретения антиген может представлять собой CD19, который экспрессируется при В-клеточном лейкозе. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген может представлять собой EGFR, который экспрессируется на мультиформной глиобластоме (GBM), но гораздо менее экспрессируется на здоровой ткани ЦНС. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген может представлять собой CEA, который связан с раком у взрослых, например раком толстой кишки.

[0093] В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент ECD специфична в отношении мишени клеточной поверхности, где неограничивающие примеры мишеней клеточной поверхности включают CD19, CD30, Her2, CD22, ENPP3, EGFR, CD20, CD52, CD11 α и α -интегрин. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды, описанные в настоящем документе включают внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD19, BCMA, CEA, HER2, MUC1, CD20, ALPPL2, BCMA, или EGFR. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды, предложенные в настоящем документе, (например, гуманизированные рецепторы HingeNotch) включают внеклеточный домен, включающий антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD19. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды, предложенные в настоящем документе, (например, рецепторы Hinge-Notch) включают внеклеточный домен, включающий антигенсвязывающий фрагмент, который связывает ALPPL2. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды, предложенные в настоящем документе, (например, рецепторы Hinge-Notch) включают внеклеточный домен, включающий антигенсвязывающий фрагмент, который связывает BCMA. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды, предложенные в настоящем документе, (например, рецепторы Hinge-Notch) включают внеклеточный домен, включающий антигенсвязывающий фрагмент, который связывает Her2.

[0094] В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды, описанные в настоящем документе (например, гуманизированные рецепторы HingeNotch) включают внеклеточный домен, включающий антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD19, ALPPL2, BCMA или Her2. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13 в списке последовательностей. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%

идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент включает аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент включает аминокислотную последовательность, имеющую последовательность SEQ ID NO: 13, где один, два, три, четыре или пять аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 13 заменены другим аминокислотным остатком.

Шарнирный домен

[0095] Как указано выше, внеклеточные домены Notch, расположенные на N-конце TMD химерного полипептида по настоящему изобретению, включают домен олигомеризации (например, шарнирный домен), содержащий один или несколько полипептидных мотивов, которые способствуют образованию олигомеров химерных полипептидов посредством межмолекулярной дисульфидной связи. В этих случаях в химерных рецепторах Notch, описанных в настоящем документе, шарнирный домен обычно включает гибкую олиго- или полипептидную соединительную область между ECD и TMD. Таким образом, шарнирный домен обеспечивает гибкость между ECD и TMD, а также обеспечивает сайты для межмолекулярных дисульфидных связей между двумя или более мономерами химерных полипептидов с образованием олигомерного комплекса. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает мотивы, которые способствуют образованию химерных полипептидов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает мотивы, которые способствуют образованию тримера химерных полипептидов, описанных в настоящем документе (например, шарнирный домен, полученный из OX40).

[0096] Последовательности шарнирного полипептида, подходящие для композиций и способов по настоящему изобретению, могут представлять собой природные полипептидные последовательности шарнирного соединения (например, из встречающихся в природе иммуноглобулинов). Альтернативно, последовательность шарнирного полипептида может быть синтетической последовательностью, которая соответствует природной последовательности шарнирного полипептида, или может быть полностью синтетической последовательностью шарнирного соединения, или может быть разработана, сконструирована или модифицирована для обеспечения желаемых и/или улучшенных свойств, например, модулирующий транскрипцию. Подходящие шарнирные полипептидные последовательности включают, но не ограничиваются ими, последовательности, полученные из подклассов IgA, IgD и IgG, такие как шарнирный домен IgG1, шарнирный домен IgG2, шарнирный домен IgG3 и шарнирный домен IgG4 или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирная полипептидная последовательность содержит один или несколько мотивов CXXC. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность шарнирного полипептида содержит один или несколько мотивов CPPC. Дополнительную информацию в этом отношении можно найти, например, в недавнем обзоре Vidarsson G. *et*

al., *Frontiers Immunol.* October 20, 2014, последовательность шарнирного полипептида содержит один или несколько мотивов CPPC. Дополнительную информацию в этом отношении можно найти, например, в недавнем обзоре.

[0097] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает последовательность шарнирного полипептида, полученную из шарнирного домена IgG1 или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает последовательность шарнирного полипептида, полученную из шарнирного домена IgG2 или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает последовательность шарнирного полипептида, полученную из шарнирного домена IgG3 или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает последовательность шарнирного полипептида, полученную из шарнирного домена IgG4 или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает последовательность шарнирного полипептида, полученную из шарнирного домена IgA или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает последовательность шарнирного полипептида, полученную из шарнирного домена IgD или его функционального варианта.

[0098] Дополнительные шарнирные полипептидные последовательности, подходящие для композиций и способов, описанных в настоящем документе, включают, но этим не ограничиваются, шарнирные полипептидные последовательности, полученные из шарнирного домена CD8 α , шарнирного домена CD28, шарнирного домена CD152, шарнирного домена PD-1, шарнирного домена CTLA4, шарнирного домена OX40, шарнирного домена Fc γ RIII α и их функциональных вариантов. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает последовательность шарнирного полипептида, полученную из шарнирного домена CD8 α или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает последовательность шарнирного полипептида, полученную из шарнирного домена CD28 или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает последовательность шарнирного полипептида, полученную из шарнирного домена OX40 или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает последовательность шарнирного полипептида, полученную из шарнирного домена IgG4 или его функционального варианта.

[0099] Длина и/или аминокислотный состав шарнирного домена выбираются таким образом, чтобы обеспечить гибкость и способность к олигомеризации. Специалист в данной области легко поймет, что длина и аминокислотный состав шарнирной полипептидной последовательности могут быть оптимизированы для изменения ориентации и/или близости ECD и TMD относительно друг друга, а также мономеров химерных полипептидов друг к другу для достижения желаемой активности химерного полипептида согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления

изобретения одноцепочечный пептид, включающий около от одного до 100 аминокислотных остатков (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и так далее аминокислотных остатков), может быть использован в качестве шарнирного домена. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает примерно от 5 до 50, примерно от 10 до 60, примерно от 20 до 70, примерно от 30 до 80, примерно от 40 до 90, примерно от 50 до 100, примерно от 60 до 80, примерно от 70 до 100, примерно от 30 до 60, примерно от 20 до 80, примерно от 30 до 90 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает примерно от 1 до 10, примерно от 5 до 15, примерно от 10 до 20, примерно от 15 до 25, примерно от 20 до 40, примерно от 30 до 50, примерно от 40 до 60, примерно от 50 до 70 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает примерно от 40 до 70, примерно от 50 до 80, примерно от 60 до 80, примерно от 70 до 90 или примерно от 80 до 100 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает примерно от 1 до 10, примерно от 5 до 15, примерно от 10 до 20, примерно от 15 до 25 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности, например, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или на 99% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 15-19 в списке последовательностей. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 15-19. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 15-19. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает аминокислотную последовательность на около 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 15-19. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 15-19, где один, два, три, четыре или пять аминокислотных остатков в любой из SEQ ID NO: 15-19 заменены другим аминокислотным остатком.

[0100] В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности, например, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15 в списке последовательностей. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный

домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает аминокислотную последовательность на около 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую последовательность SEQ ID NO: 15, где один, два, три, четыре или пять аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 15 заменены другим аминокислотным остатком.

Трансмембранный домен (TMD)

[0101] Как указано выше, химерные полипептиды согласно настоящему изобретению включают трансмембранный домен, включающий один или несколько индуцируемых лигандом сайтов протеолитического расщепления.

[0102] Примеры сайтов протеолитического расщепления в рецепторе Notch (например, S2 или S3) описаны выше. Дополнительные сайты протеолитического расщепления, подходящие для композиций и способов, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, сайт расщепления металлопротеиназой для MMP, выбранной из коллагеназы-1, -2 и -3 (MMP-1, -8 и -13), желатиназы А и В (MMP-2 и -9), стромелизина 1, 2 и 3 (MMP-3, -10 и -11), матрилизина (MMP-7) и мембранных металлопротеиназ (MT1-MMP и MT2-MMP). Например, последовательность расщепления MMP-9 представляет собой Pro-X-X-Hy (где X представляет собой произвольный остаток; Hy представляет собой гидрофобный остаток, такой как Leu, Ile, Val, Phe, Trp, Tyr, Val, Met и Pro), например, Pro-X-X-Hy-(Ser/Thr), например, Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr-Ser (SEQ ID NO: 76) или Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr (SEQ ID NO: 77). Другим примером подходящего сайта расщепления протеазой является сайт расщепления активатором плазминогена, например, сайт расщепления активатором плазминогена урокиназного типа (uPA) или сайтом расщепления тканевым активатором плазминогена (tPA). Другим примером подходящего сайта расщепления протеазой является сайт расщепления пролактина. Конкретные примеры последовательностей расщепления uPA и tPA включают последовательности, содержащие Val-Gly-Arg. Другой типичный сайт расщепления протеазой, который может быть включен в протеолитически расщепляемый линкер, представляет собой сайт расщепления протеазой вируса травления табака (TEV), например, Glu-Asn-Leu-Tyr-Thr-Gln-Ser (SEQ ID NO: 78), где протеаза расщепляет глутамин и серин. Другим примером сайта расщепления протеазой, который может быть включен в протеолитически расщепляемый линкер, является сайт расщепления энтерокиназой, например, Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (SEQ ID NO: 79), где расщепление происходит после остатка лизина. Другим примером сайта расщепления протеазой, который может быть включен в протеолитически расщепляемый линкер, является сайт расщепления тромбином,

например, Leu-Val-Pro-Arg (SEQ ID NO: 80). Дополнительные подходящие линкеры, содержащие сайты расщепления протеазами, включают последовательности, расщепляемые следующими протеазами: протеазой PreScission™ (слитый белок, содержащий протеазу риновируса человека 3С и глутатион-S-трансферазу), тромбином, катепсином В, протеазой вируса Эпштейна-Барр, MMP-3 (стромелизин), MMP-7 (матрилизин), MMP-9; термолизинподобной ММП, матриксной металлопротеиназой 2 (ММП-2), катепсином L; катепсином D, матриксной металлопротеиназой 1 (MMP-1), активатором плазминогена урокиназного типа (uPA), матриксной металлопротеиназой мембранного типа 1 (MT-MMP), стромелизином 3 (или MMP-11), термолизин, коллагеназой фибробластов и стромелизином-1, матриксной металлопротеиназой 13 (коллагеназа-3), тканевым активатором плазминогена (tPA), простатическим специфическим антигеном человека, калликреином (hK3), нейтрофильной эластазой и кальпаином (кальций-активируемая нейтральная протеаза). Протеазы, которые не являются нативными для клетки-хозяина, в которой экспрессируется рецептор (например, TEV), можно использовать в качестве дополнительного регуляторного механизма, в котором активация гуманизированного HingeNotch невозможна до тех пор, пока протеаза не будет экспрессирована или обеспечена иным образом. Протеазы, которые не являются нативными для клетки-хозяина, в которой экспрессируется рецептор (например, TEV), можно использовать в качестве дополнительного регуляторного механизма, в котором активация гуманизированного HingeNotch невозможна до тех пор, пока протеаза не будет экспрессирована или обеспечена иным образом. Кроме того, протеаза может быть ассоциирована с опухолью или заболеванием (экспрессируется в значительно большей степени, чем в нормальной ткани) и служить независимым регуляторным механизмом. Например, некоторые матриксные металлопротеазы высоко экспрессируются при определенных типах рака.

[0103] Как правило, TMD, подходящий для химерных полипептидов и рецепторов Hinge-Notch, описанных в настоящем документе, может представлять собой любой трансмембранный домен трансмембранного рецептора типа 1, включающий по меньшей мере один сайт расщепления γ -секретазой. Подробное описание структуры и функции комплекса γ -секретазы, а также его белков-субстратов, включая белок-предшественник амилоида (APP) и Notch, можно найти, например, в недавнем обзоре Zhang *et al.*, *Frontiers Cell Neurosci* (2014). Подходящие TMD из трансмембранных рецепторов типа 1, не ограничиваясь ими, включают CLSTN1, CLSTN2, APLP1, APLP2, LRP8, APP, BTC, TGBR3, SPN, CD44, CSF1R, CXCL16, CX3CL1, DCC, DLL1, DSG2, DAG1, CDH1, EPCAM, EPHA4, EPHB2, EFNB1, EFNB2, ErbB4, GHR, HLA-A и IFNAR2, где TMD включает по меньшей мере один сайт расщепления γ -секретазой. Дополнительные TMD, подходящие для композиций и способов, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, трансмембранные домены трансмембранных рецепторов типа IL1R1, IL1R2, IL6R, INSR, ERN1, ERN2, JAG2, KCNE1, KCNE2, KCNE3, KCNE4, KL, CHL1, PTPRF, SCN1B, SCN3B, NPR3, NGFR, PLXDC2, PAM, AGER, ROBO1, SORCS3, SORCS1,

SORL1, SDC1, SDC2, SPN, TYR, TYRP1, DCT, VASN, FLT1, CDH5, PKHD1, NECTIN1, PCDHGC3, NRG1, LRP1B, CDH2, NRG2, PTPRK, SCN2B, Nradd и PTPRM. В некоторых вариантах осуществления изобретения TMD химерных полипептидов или рецепторов Notch по настоящему изобретению представляет собой TMD, полученный из TMD члена семейства кальсинтенинов, такого как алкадеин альфа и алкадеин гамма.

[0104] В некоторых вариантах осуществления изобретения TMD для химерных полипептидов, описанных в настоящем документе, представляет собой один из трансмембранных доменов, известных для рецепторов Notch. В некоторых вариантах осуществления изобретения TMD химерных полипептидов или рецепторов Notch по настоящему изобретению представляет собой TMD, полученный из другого рецептора Notch. Например, в гуманизированном рецепторе HingeNotch, основанном на Notch1 человека, TMD Notch1 можно заменить на TMD Notch3 или TMD Notch от животного, отличного от человека, такого как *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis* или *Gallus*.

[0105] В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность, проявляющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, 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% идентичность аминокислотной последовательности одной или нескольким SEQ ID NO: 21-30 в списке последовательностей. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 21-30. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 21-30. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность на около 100% идентичную аминокислотной последовательности одной или нескольким SEQ ID NO: 21-30. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 21-30, где один, два, три, четыре или пять аминокислотных остатков в любой из SEQ ID NO: 21-30 заменены другим аминокислотным остатком.

[0106] В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность, проявляющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, 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% идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21 в списке последовательностей. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по

меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность на около 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую последовательность SEQ ID NO: 21, где один, два, три, четыре или пять аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 21-30 заменены другим аминокислотным остатком.

[0107] В некоторых вариантах осуществления изобретения аминокислотная замена (замены) в TMD включает одну или несколько замен в мотиве «GV» TMD. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одна из таких замен(ы) представляет собой замену аланина. Например, один, два, три, четыре, пять или более аминокислотных остатков последовательности FMYVAAAFAVLLFFVGCGVLLS (SEQ ID NO: 21) могут быть заменены другим аминокислотным остатком. В некоторых вариантах осуществления изобретения аминокислотный остаток в положении 18 и/или 19 мотива «GV» в SEQ ID NO: 17 заменен другим аминокислотным остатком. В некоторых вариантах осуществления изобретения остаток глицина в положении 18 SEQ ID NO: 21 заменен другим аминокислотным остатком. В некоторых вариантах осуществления изобретения остаток валина в положении 19 SEQ ID NO: 21 заменен другим аминокислотным остатком. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую последовательность, имеющую последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 21 с мутацией в положении, соответствующем положению 18 SEQ ID NO: 21, такой как мутации G18A. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность, имеющую последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 17 с мутацией в положении, соответствующем положению 19 SEQ ID NO: 21, такой как мутации V19A.

Последовательность остановки-переноса (STS)

[0108] В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды по изобретению включают последовательность остановки-переноса (STS), которая представляет собой высокозаряженный домен, расположенный на С-конце TMD. Не привязываясь к какой-либо конкретной теории, такой сильно заряженный домен между TMD и ICD предотвращает проникновение ICD в мембрану. STS связан с TMD и ICD в следующем порядке, от N-конца к С-концу, TMD-STS-ICD. Длина и/или аминокислотный состав STS могут быть выбраны для достижения желаемой чувствительности рецептора. В некоторых вариантах осуществления изобретения STS включает около 4 до около 40 аминокислотных остатков (например, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 и так далее аминокислотных остатков). В некоторых вариантах осуществления

изобретения STS включает примерно от 4 до 15, примерно от 6 до 20, примерно от 8 до 25, примерно от 10 до 30, примерно от 12 до 35, примерно от 14 до 40, примерно от 5 до 40, примерно от 10 до 35, примерно от 15 до 30, примерно от 20 до 25, примерно от 20 до 40, примерно от 10 до 30, примерно от 4 до 20 или примерно от 5 до 25 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления изобретения STS включает примерно от 4 до 10, примерно от 5 до 12, примерно от 6 до 14, примерно от 7 до 18, примерно от 8 до 20, примерно от 9 до 22, примерно от 10 до 24 или примерно от 11 до 26 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления изобретения STS включает примерно от 4 до 10 остатков, например, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления изобретения STS включает последовательность по меньшей мере на 80% идентичную, например, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или на 99% идентичную последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 31-51 в списке последовательностей. В некоторых вариантах осуществления изобретения STS включает аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичности последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 31-51. В некоторых вариантах осуществления изобретения STS включает аминокислотную последовательность по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 31-51. В некоторых вариантах осуществления изобретения STS включает аминокислотную последовательность на около 100% идентичную последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 31-51. В некоторых вариантах осуществления изобретения STS включает аминокислотную последовательность, имеющую последовательность, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 31-51, где один, два, три, четыре или пять аминокислотных остатков в любой из SEQ ID NO: 31-51 заменены другим аминокислотным остатком.

[0109] В некоторых вариантах осуществления изобретения STS включает последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 80% идентичности последовательности, например, по меньшей мере 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, или 99% идентичности последовательности с STS последовательностью из Notch1, Notch2, Notch3, Notch4, CLSTN1, CLSTN2, CSF1R, CXCL16, DAG1, GHR, PTPRF, AGER, KL, NRG1, LRP1B, Jag2, EPCAM, KCNE3, CDH2, NRG2, PTPRK, BTC, EPHA3, IL1R2 или PTPRM. В некоторых вариантах осуществления изобретения STS включает последовательность, содержащую только Lys (K) или Arg (R) в первых четырех аминокислотных остатках. В некоторых вариантах осуществления изобретения STS включает один, два, три, четыре, пять или более основных остатков. В некоторых вариантах осуществления изобретения STS включает пять, четыре, три, два, один или ноль

ароматических остатков или остатков с гидрофобными и/или объемными боковыми цепями.

[0110] В некоторых вариантах осуществления изобретения STS включает последовательность по меньшей мере на 80% идентичную, например, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или на 99% идентичную последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 31-36 в списке последовательностей. В некоторых вариантах осуществления изобретения STS включает аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 31-36. В некоторых вариантах осуществления изобретения STS включает аминокислотную последовательность по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 31-36. В некоторых вариантах осуществления изобретения STS включает аминокислотную последовательность на около 100% идентичную последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 31-36. В некоторых вариантах осуществления изобретения STS включает аминокислотную последовательность, имеющую последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 31-36, где один, два, три, четыре или пять аминокислотных остатков в любой из SEQ ID NO: 31-36 заменены другим аминокислотным остатком. В некоторых вариантах осуществления изобретения STS включает последовательность по меньшей мере на 70% идентичную последовательности, например, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или на 99% идентичную последовательности STS из Notch1, Notch2, Notch3, Notch4, CLSTN1, CLSTN2, JAG2, PTPRF, LRP1B, NRG2, KCNE2, KCNE3, KCNE4, AGER, PKHD1, GHR, PTPRM, DAG1, NRG1, EPCAM, KL, PTPRK, CXCL16 или любой из перечисленных в таблицах 3 и 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения STS включает последовательность, содержащую только Lys (K) или Arg (R) в первых четырех аминокислотных остатках. В некоторых вариантах осуществления изобретения STS включает один, два, три, четыре, пять или более основных остатков. В некоторых вариантах осуществления изобретения STS содержит пять, четыре, три, два, один или ноль ароматических остатков или остатков с гидрофобными и/или объемными боковыми цепями.

Внутриклеточный домен (ICD)

[0111] Как указано выше, химерные полипептиды по изобретению включают транскрипционный эффектор. Транскрипционный эффектор по изобретению представляет собой полипептидный элемент, который активирует или ингибирует транскрипцию управляемой промотором последовательности ДНК. Транскрипционные эффекторы, подходящие для композиций и способов по настоящему изобретению, могут быть естественными транскрипционными эффекторами или могут быть разработаны,

сконструированы или модифицированы для обеспечения желаемых и/или улучшенных свойств, например, модуляции транскрипции. В некоторых вариантах осуществления изобретения транскрипционный эффектор представляет собой эффектор транскрипции человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения транскрипционный эффектор представляет собой гуманизированный эффектор транскрипции.

[0112] Как обсуждалось выше, сконструированные рецепторы Notch по настоящему изобретению имеют преимущество в том, что они могут обеспечивать возможность запуска специальной программы транскрипции в сконструированных клетках. В некоторых вариантах осуществления изобретения транскрипционный эффектор по изобретению представляет собой специальный эффектор транскрипции, который запускает транскрипцию с определенной последовательности, которая появляется только один раз в сконструированной клетке.

[0113] В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды по изобретению представляют собой транскрипционный эффектор, содержащий ДНК-связывающий домен (DBD), функционально связанный с другим доменом, через который эффектор транскрипции оказывает свое действие (эффекторный домен). Как более подробно описано ниже, иллюстративные эффекторные домены, подходящие для сконструированных рецепторов Notch по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, домены, активирующие транскрипцию, домены-репрессоры транскрипции, эпигенетические эффекторные домены и ферменты, модифицирующие ДНК.

[0114] Примеры типов подходящих DBD для гуманизированных рецепторов HingeNotch, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, гомеодомены, домены лейциновой молнии, домены HMG-box, домены вилки/крылатой спирали, основные домены спираль-петля-спираль (bHLH), домены Helix-Turn-Helix (HTH), домены T-box и домены «цинковые пальцы».

[0115] В некоторых вариантах осуществления изобретения DBD, используемые в эффекторе транскрипции, получены из факторов транскрипции человека. Например, факторы транскрипции, из которых можно получить DBD, включают полипептиды, содержащие гомеодомен человека, такие как, например, Oct-3/4, Cdx-2, Gbx2, Gsh1, HesX1, НохА1 О, НохА1 и НохВ1. Дополнительные полипептиды, содержащие гомеодомен человека, из которых могут быть получены подходящие DBD, включают Irx2, Isl1, Meis1, Meox2, Nanog, Nkx2.2, Onecut, Otx1, Oxt2, Pax5, Pax6, Pdx1, Tcf1, Tcf2 и Zfhx1.

[0116] В некоторых вариантах осуществления изобретения DBD, используемые в эффекторе транскрипции, описанном в настоящем документе, получены из полипептидов, содержащих домен «цинкового пальца» человека, таких как, например, Klf-4, Atbfl, Esrrb, Gcnf, Jarid2, Jmjd1 a, Jmjd2c, Klf-3, Klf-5, Mel-18, Myst3 и Nad. Дополнительные полипептиды, содержащие домен «цинкового пальца» человека, из которых можно получить подходящие DBD, включают REST, Rex-1, Rybp, Sall4, SalM, Tif1, YY1, Zeb2, Zfp281, Zfp57, Zic3, Coup-Tfl, Coup-Tf2, Bmi1, Rnf2, Mta1, Piasl, Pias2, Pias3 и Piasy.

[0117] В некоторых вариантах осуществления изобретения DBD, включенные в транскрипционный эффектор гуманизированных рецепторов HingeNotch, описанных в настоящем документе, происходят из полипептидов, содержащих домен HMG-box человека, таких как, например, Sox-2, Sox-6, Sox-9, Sox-10, Sox-15, Lef1, Tcf-7, Tcf7l1. Белки, содержащие домен bHLH человека, из которых можно получить подходящие DBD, включают, но не ограничиваются ими, c-Myc, L-Myc, N-Myc, Hand1, Mad1, Mad3, Mad4, Mxi1, Myf5, Neurog2, Ngn3, Olig2, Tcf3 и f4. Неограничивающие примеры полипептидов домена вилки/крылатой спирали, из которых можно получить подходящие DBD, включают Foxd и Foxd3.

[0118] В некоторых вариантах осуществления изобретения DBD, включенные в эффектор транскрипции гуманизированных рецепторов HingeNotch, описанных в настоящем документе, происходят из (i) полипептидов, содержащих домен НТН, таких как BAF155 и тому подобное; (ii) полипептиды, содержащие домен лейциновой молнии, такие как, например, C/EBP β и mafa; (iii) домен T-box, содержащий полипептиды, такие как, например, Eomes и Tbx-3; (vi) домен RFX, содержащий полипептиды, такие как Rfx4 и тому подобное; и (v) домен STAT, содержащий полипептиды, такие как Stat3 и подобные.

[0119] В некоторых вариантах осуществления изобретения DBD, включенные в транскрипционный эффектор гуманизированных рецепторов HingeNotch, описанных в настоящем документе, могут быть получены из белка гомеобокса А ядерного фактора 1 гепатоцитов человека (HNF1 α), белка гомеобокса В ядерного фактора 1 гепатоцитов человека (HNF1 β), содержащего парный домен белка человека (Pax-6), содержащего парный домен белка человека (Pax-1), содержащего парный домен белка человека (Pax-2), содержащего парный домен белка человека (Pax-3), содержащего парный домен белка человека (Pax-4) или содержащего парный домен белка человека (Pax-7).

[0120] В некоторых вариантах осуществления изобретения ДНК-связывающий домен получен из белка гомеобокса А ядерного фактора 1 гепатоцитов человека (HNF1 α) белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения HNF1 α ДНК-связывающий домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 или ее функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления изобретения ДНК-связывающий домен получен из содержащего парный домен белка человека, Pax6. В некоторых вариантах осуществления изобретения Pax6 ДНК-связывающий домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или ее функциональный вариант.

[0121] Как указано выше, транскрипционный эффектор гуманизированных рецепторов HingeNotch, описанных в настоящем документе, включает второй домен, через который эффектор транскрипции оказывает свое действие (эффекторный домен). В некоторых вариантах осуществления изобретения транскрипционный эффектор непосредственно регулирует дифференцировку клетки. Специалисту в данной области будет понятно, что эффектор транскрипции может быть активатором транскрипции или репрессором транскрипции. Типичные эффекторный домены, подходящие для сконструированных рецепторов Notch по настоящему изобретению, включают, но не

ограничиваются ими, домены, активирующие транскрипцию, домены-репрессоры транскрипции, эпигенетические эффекторный домены и ферменты, модифицирующие ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения транскрипционный эффектор представляет собой репрессор транскрипции. В некоторых вариантах осуществления изобретения транскрипционный эффектор представляет собой активатор транскрипции. В некоторых вариантах осуществления изобретения транскрипционный эффектор непосредственно регулирует дифференцировку клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения транскрипционный эффектор косвенно модулирует (например, регулирует) дифференцировку клетки путем модулирования экспрессии второго транскрипционного фактора.

[0122] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторный домен транскрипционного эффектора включает домен, активирующий транскрипцию. Неограничивающие примеры доменов, активирующих транскрипцию, подходящих для использования в композициях и способах, раскрытых в настоящем документе, включают домен активации p65 NFκB; и коровый домен гистон-ацетилтрансферазы белка p300, ассоциированного с E1A человека (коровый домен активации НАТ p300). В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторный домен транскрипционного эффектора включает домен активации p65 NFκB.

[0123] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторный домен транскрипционного эффектора включает человеческий или гуманизированный домен репрессора транскрипции. Неограничивающие примеры доменов-репрессоров транскрипции, подходящих для использования в композициях и способах, описанных в настоящем документе, включают связанный с Круппелем домен репрессии бокса (KRAB); домен репрессии фактора транскрипции сайленсинга репрессорного элемента (REST); мотив WRPW репрессии домена белков-репрессоров основной спирали-петли-спирали, связанных с волосатыми белками (WRPW); домен репрессии ДНК (цитозин-5)-метилтрансферазы 3B (DNMT3B); и домен репрессии хроматина HP1 альфа. В некоторых вариантах осуществления изобретения домен репрессора транскрипции включает домен репрессора KRAB.

[0124] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторный домен транскрипционного эффектора включает человеческий или гуманизированный эпигенетический эффекторный домен. Примеры эпигенетических эффекторных доменов, подходящих для использования в композициях и способах, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, ДНК-метилтрансферазы DNMT (DNMT1, DNMT3), HAT1, GCN5, PCAF, MLL, SET, DOT1, SUV39H, G9a, KAT2A/B, EZH1/2, TET1/2, эффекторные домены белков семейства SIRT, гистоновые деацетилазы, LSD1 и эффекторные домены белков семейства KDM.

[0125] Эффекторные домены, подходящие для композиций и способов по настоящему изобретению, могут быть природными эффекторами транскрипции или могут быть разработаны, сконструированы или модифицированы для обеспечения желаемых

и/или улучшенных свойств, например, модуляции транскрипции а эукариотическая клетка. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторный домен получен из животного белка. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторный домен получен из белка млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторный домен получен из белка нечеловеческого примата. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторный домен получен из человеческого белка.

[0126] В некоторых вариантах осуществления изобретения DBD транскрипционного эффектора связан с его эффекторным доменом представляет собой на N-конце.

[0127] В некоторых вариантах осуществления изобретения ICD химерных рецепторов, описанных в настоящем документе, дополнительно включает сигнальную последовательность ядерной локализации (NLS). NLS представляют собой короткие пептидные мотивы, которые опосредуют импорт белков в ядро путем связывания с их рецепторами, известными как импортины (кариоферины).

[0128] Химерные полипептиды и гуманизированные рецепторы HingeNotch по настоящему изобретению могут представлять собой химерные полипептиды любой длины, включая химерные полипептиды, которые обычно имеют в длину от около 100 аминокислот (aa) до около 1000 aa, например, от около 100 aa до около 200 aa, от около 150 aa до около 250 aa, от около 200 aa до около 300 aa, от около 250 aa до около 350 aa, от около 300 aa до около 400 aa, от около 350 aa до около 450 aa, от около 400 aa до около 500 aa. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные химерные полипептиды имеют в длину по меньшей мере около 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1,000 aa. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные химерные полипептиды имеют в длину менее чем около 1,500, 1,400, 1,300, 1,200, 1,100, 1,000, 950, 900, 850, 800, 750, 700, 600, 500, 400, 350, 300, 250 или 200 aa. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные химерные полипептиды имеют в длину обычно от около 400 aa до около 450 aa, от около 450 aa до около 500 aa, от около 500 aa до около 550 aa, от около 550 aa до около 600 aa, от около 600 aa до около 650 aa, от около 650 aa до около 700 aa, от около 700 aa до около 750 aa, от около 750 aa до около 800 aa, от около 800 aa до около 850 aa, от около 850 aa до около 900 aa, от около 900 aa до около 950 aa или от около 950 aa до около 1000 aa. В некоторых случаях химерные полипептиды по настоящему изобретению имеют длину от около 300 aa до около 400 aa. В некоторых случаях химерные полипептиды по настоящему изобретению имеют длину от около 300 aa до около 350 aa. В некоторых случаях химерные полипептиды по настоящему изобретению имеют длину от около 300 aa до около 325 aa. В некоторых случаях химерные полипептиды по настоящему изобретению имеют длину от около 350 aa до около 400 aa. В некоторых случаях химерные полипептиды по настоящему изобретению имеют в длину от 591 aa до 920 aa.

[0129] В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды по настоящему изобретению включают аминокислотную последовательность длиной менее чем 500, менее чем 600, менее чем 700, менее чем 800, или менее чем 900 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный полипептид

включает аминокислотную последовательность длиной менее чем 600 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды по настоящему изобретению включают аминокислотную последовательность длиной менее чем 600 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды по настоящему изобретению включают аминокислотную последовательность длиной менее чем 500 аминокислотных остатков.

Дополнительные домены

[0130] В некоторых вариантах осуществления изобретения внеклеточные домены Notch, расположенные на N-конце TMD, могут дополнительно включать дополнительные домены, например, сигнал мембранной локализации, такой как сигнал CD8 α , детектируемый маркер, такой как метка тус или метка his и тому подобное. Не привязываясь к какой-либо конкретной теории, может оказаться полезным включение дополнительных доменов на N-конце шарнирного домена. Также предполагается, что химерные полипептиды, описанные в настоящем документе, могут быть дополнительно сконструированы для включения одного или нескольких дополнительных признаков, таких как сигнальная последовательность, обнаруживаемая метка, сайт расщепления, специфичный для опухоли, сайт расщепления, специфичный для заболевания, или их комбинации. Например, некоторые протеазы (такие как матриксные металлопротеазы) активируются при раке, обеспечивая опухолеспецифическую специфичность расщепления не за счет специфического сайта расщепления, а за счет более высоких уровней специфических протеаз. Дополнительную информацию по этому поводу можно найти, например, в работе J.S. Dudani *et al.*, *Annu Rev Cancer Biol* (2018), 2:353-76, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки.

[0131] В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный полипептид по изобретению включает: (a) шарнирный домен, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 15-19; (b) трансмембранный домен, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 21-30; и (c) домен последовательности остановки-переноса, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 31-51. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный полипептид по изобретению включает: (a) шарнирный домен, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 15-19; (b) трансмембранный домен, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 21-30; и (c) домен последовательности остановки-переноса, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 31-51. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный полипептид по изобретению включает: (a) шарнирный домен, включающий

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 15-19; (b) трансмембранный домен, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 21-30; и (c) домен последовательности остановки-переноса, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 31-51.

[0132] В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный полипептид по изобретению включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с химерным рецептором, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения настоящем документе предложены химерные полипептиды, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2, 4-12, и 65-66, указанных в списке последовательностей. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды включают аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды включают аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды включают аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды включают аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды включают аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды включают аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды включают аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды включают аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды включают аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере

около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды включают аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды включают аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды включают аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды включают аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 66.

[0133] В некоторых вариантах осуществления изобретения следующие домены получены из полипептидов человека: (а) внеклеточный лиганд-связывающий домен, (b) шарнирный домен, (с) TMD и (d) ICD. В некоторых вариантах осуществления изобретения следующие домены являются по существу неиммуногенными у человека: (а) внеклеточный лиганд-связывающий домен, (b) шарнирный домен, (с) TMD и (d) ICD. В некоторых вариантах осуществления изобретения ICD является по существу неиммуногенным для человека. Способы и системы, подходящие для определения иммуногенности белка в клетках человека, известны в данной области. Например, иммуногенность можно предсказать *in vitro*, инкубируя клетки с белком и отслеживая поверхностную экспрессию рецепторов на антигенпрезентирующих клетках, пролиферацию Т-клеток или высвобождение цитокинов. Идентификация Т-клеточных эпитопов *in silico* также может быть использована для прогнозирования антигенности новых полипептидных последовательностей.

Молекулы нуклеиновой кислоты

[0134] В другом аспекте настоящем документе предложены различные молекулы нуклеиновых кислот, включая нуклеотидные последовательности, кодирующие химерные полипептиды согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения кассеты экспрессии и векторы экспрессии содержат эти молекулы нуклеиновой кислоты, функционально связанные с последовательностями гетерологичных нуклеиновых кислот, такими как, например, регуляторные последовательности, которые обеспечивают экспрессию рецептора *in vivo* в клетке-хозяине.

[0135] Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут иметь любую длину, в том числе, например, в диапазоне между около 1,5 Kb и около 50 Kb, в диапазоне между около 5 Kb и около 40 Kb, в диапазоне между около 5 Kb и около 30 Kb, в диапазоне между около 5 Kb и около 20 Kb или в диапазоне между около 10 Kb и около 50 Kb, например в диапазоне между около 15 Kb и 30 Kb, в диапазоне между около 20 Kb и

около 50 Kb, в диапазоне между около 20 Kb и около 40 Kb, около 5 Kb и около 25 Kb, или около 30 Kb и около 50 Kb.

[0136] В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем документе предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный полипептид, включающий от N-конца к С-концу: (a) внеклеточный лиганд-связывающий домен, обладающий аффинностью связывания с выбранным лигандом; (b) шарнирный домен, способный способствовать образованию олигомера химерного полипептида посредством межмолекулярной дисульфидной связи; (c) трансмембранный домен, включающий один или несколько сайтов протеолитического расщепления, индуцируемых лигандом; и (d) внутриклеточный домен, включающий транскрипционный эффектор человека или гуманизированного человека, где связывание выбранного лиганда с внеклеточным лиганд-связывающим доменом индуцирует расщепление в индуцируемом лигандом сайте протеолитического расщепления между эффектором транскрипции и шарнирным доменом, и при этом химерный полипептид не включает повтор LIN-12-Notch (LNR) и/или домен гетеродимеризации (HD) рецептора Notch.

[0137] В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотидная последовательность включена в кассету экспрессии или вектор экспрессии. Следует понимать, что кассета экспрессии обычно включает конструкцию генетического материала, которая содержит кодирующие последовательности и достаточную регуляторную информацию для управления надлежащей транскрипцией и/или трансляцией кодирующих последовательностей в клетке-реципиенте, *in vivo* и/или *ex vivo*. Как правило, кассета экспрессии может быть встроена в вектор для нацеливания на желаемую клетку-хозяина и/или на субъекта. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии по настоящему изобретению включает кодирующую последовательность химерного полипептида, описанного в настоящем документе, которая функционально связана с элементами контроля экспрессии, такими как промотор, и, необязательно, любую или комбинацию других последовательностей нуклеиновых кислот, которые влияют на транскрипцию или трансляцию кодирующей последовательности.

[0138] В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотидная последовательность включена в клонирующий вектор или вектор экспрессии. Специалисту в данной области должно быть понятно, что термин «вектор» обычно относится к рекомбинантной полинуклеотидной конструкции, предназначенной для переноса между клетками-хозяевами, и которая может быть использована для целей трансформации, например введения гетерологичной ДНК в клетки-хозяева. клетка-хозяин. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления вектор может представлять собой репликон, такой как плазида, фаг или космида, в который может быть вставлен другой сегмент ДНК, чтобы вызвать репликацию вставленного сегмента. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор экспрессии может представлять собой интегрирующий вектор. В

некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотидная последовательность включена в клонирующий вектор.

[0139] В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор экспрессии может представлять собой вирусный вектор. Как должно быть понятно специалисту в данной области, термин «вирусный вектор» широко используется для обозначения либо молекулы нуклеиновой кислоты (например, плазмиды-переносчика), которая включает элементы нуклеиновой кислоты вирусного происхождения, которые обычно облегчают перенос молекула нуклеиновой кислоты или интеграция в геном клетки или в вирусную частицу, которая опосредует перенос нуклеиновой кислоты. Вирусные частицы, как правило, включают в себя различные вирусные компоненты, а иногда также компоненты клетки-хозяина в дополнение к нуклеиновой кислоте(ам). Термин вирусный вектор может относиться либо к вирусу или вирусной частице, способной переносить нуклеиновую кислоту в клетку, либо к самой перенесенной нуклеиновой кислоте. Вирусные векторы и плазмиды-переносчики содержат структурные и/или функциональные генетические элементы, которые в основном происходят от вируса. Термин «ретровирусный вектор» относится к вирусному вектору или плазмиде, содержащей структурные и функциональные генетические элементы или их части, которые в основном происходят от ретровируса. Термин «лентивирусный вектор» относится к вирусному вектору или плазмиде, содержащей структурные и функциональные генетические элементы или их части, включая LTR, которые преимущественно происходят от лентивируса, который относится к роду ретровирусов.

[0140] В некоторых вариантах осуществления изобретения настоящем документе предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептид с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с химерным рецептором, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения настоящем документе предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептид с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 2, 4-12, и 65-66 как указано в списке последовательностей. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновой кислоты кодируют полипептид с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновой кислоты кодируют полипептид с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновой кислоты кодируют полипептид с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. В

некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновой кислоты кодируют полипептид с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновой кислоты кодируют полипептид с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновой кислоты кодируют полипептид с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновой кислоты кодируют полипептид с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновой кислоты кодируют полипептид с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновой кислоты кодируют полипептид с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновой кислоты кодируют полипептид с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновой кислоты кодируют полипептид с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновой кислоты кодируют полипептид с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере около 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 66.

[0141] Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие химерные рецепторы, могут быть оптимизированы для экспрессии в интересующей клетке-хозяине. Например, содержание G-C в последовательности может быть доведено до средних уровней для данной клетки, рассчитанных по отношению к известным генам, экспрессируемым в клетке-хозяине. Способы оптимизации использования кодонов известны в данной области. Использование кодонов в кодирующей последовательности описанного в настоящем документе химерного рецептора может быть оптимизировано для усиления экспрессии в клетке-хозяине, так что около 1%, около 5%, около 10%, около 25%, около 50%, около 75% или до 100% кодонов в кодирующей последовательности были оптимизированы для экспрессии в конкретной клетке-хозяине.

[0142] Некоторые варианты осуществления, описанные в настоящем документе, относятся к векторам или экспрессионным кассетам, включающим молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую химерные рецепторы, описанные в настоящем документе. Кассета экспрессии обычно содержит кодирующие последовательности и достаточную регуляторную информацию для управления надлежащей транскрипцией и/или трансляцией кодирующих последовательностей в реципиентной клетке *in vivo* и/или *ex vivo*. Кассета экспрессии может быть встроена в вектор для нацеливания на желаемую клетку-хозяина и/или на субъекта. Кассета экспрессии может быть встроена в плазмиду, космиду, вирус, автономно реплицирующуюся молекулу полинуклеотида, фаг, как линейную или кольцевую, одноцепочечную или двухцепочечную молекулу полинуклеотида ДНК или РНК, полученную из любого источника, способную к геномной интеграции или автономная репликация, включая молекулу нуклеиновой кислоты, где одна или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты связаны функционально оперативным образом, то есть функционально связаны.

[0143] Также в настоящем документе предложены векторы, плазмиды или вирусы, содержащие одну или несколько молекул нуклеиновых кислот, кодирующих раскрытый здесь химерный рецептор. Молекулы нуклеиновой кислоты могут содержаться в векторе, способном направлять их экспрессию, например, в клетке, которая была трансформирована/трансдуцирована вектором. Подходящие векторы для применения в эукариотических и прокариотических клетках известны в данной области техники и являются коммерчески доступными или легко могут быть получены квалифицированным специалистом. См., например, Sambrook, J., & Russell, D. W. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory и Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory (совместно именуемая здесь «Sambrook»); Ausubel, F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, NY: Wiley (включая дополнения до 2014); Bollag, D. M. *et al.* (1996). *Protein Methods*. New York, NY: Wiley-Liss; Huang, L. *et al.* (2005). *Nonviral Vectors for Gene Therapy*. San Diego: Academic Press; Kaplitt, M. G. *et al.* (1995). *Viral Vectors: Gene Therapy and Neuroscience Applications*. San Diego, CA: Academic Press; Lefkovits, I. (1997). *The Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques*. San Diego, CA: Academic Press; Doyle, A. *et al.* (1998). *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. New York, NY: Wiley; Mullis, K. B., Ferré, F. & Gibbs, R. (1994). *PCR: The Polymerase Chain Reaction*. Boston: Birkhauser Publisher; Greenfield, E. A. (2014). *Antibodies: A Laboratory Manual* (2nd ed.). New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; Beaucage, S. L. *et al.* (2000). *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. New York, NY: Wiley, (включая дополнения до 2014); и Makrides, S. C. (2003). *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*. Amsterdam, NL: Elsevier Sciences B.V., описание которых включено в настоящий документ в качестве ссылок).

[0144] ДНК-векторы можно вводить в эукариотические клетки с помощью обычных методов трансформации или трансфекции. Подходящие способы трансформации или

трансфекции клеток-хозяев можно найти в работе Sambrook *et al.* (2012, выше) и другие стандартные лабораторные руководства по молекулярной биологии, такие как трансфекция с помощью фосфата кальция, трансфекция, опосредованная DEAE-декстраном, трансфекция, микроинъекция, трансфекция, опосредованная катионными липидами, электропорация, трансдукция, загрузка соскобом, баллистическое введение, нуклеопорация, гидродинамический шок и инфекции.

[0145] Вирусные векторы, которые можно использовать в описании, включают, например, ретровирусные векторы, аденовирусные векторы и аденоассоциированные вирусные векторы, лентивирусные векторы, вирус герпеса, обезьяний вирус 40 (SV40) и векторы вируса папилломы крупного рогатого скота (см., например, Gluzman (Ed.), *Eukaryotic Viral Vectors*, CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Например, химерный рецептор, описанный в настоящем документе, может быть получен в эукариотическом хозяине, таком как клетки млекопитающих (например, клетки COS, клетки NIH 3T3 или клетки HeLa). Эти клетки доступны из многих источников, включая Американскую коллекцию типовых культур (Manassas, VA). При выборе системы экспрессии необходимо следить за совместимостью компонентов друг с другом. Специалисты с обычной квалификацией могут выбрать и разработать системы экспрессии, подходящие и функционирующие в выбранной сконструированной клетке. Если требуются дополнительные рекомендации по выбору системы экспрессии, квалифицированные специалисты могут обратиться к P. Jones, «*Vectors: Cloning Applications*», John Wiley and Sons, New York, NY, 2009).

[0146] Предложенные молекулы нуклеиновой кислоты могут содержать природные последовательности или последовательности, которые отличаются от тех, которые встречаются в природе, но из-за вырожденности генетического кода кодируют один и тот же полипептид, например, антитело. Эти молекулы нуклеиновых кислот могут состоять из РНК или ДНК (например, геномной ДНК, кДНК или синтетической ДНК, такой как полученная в результате синтеза на основе фосфорамидитов) или комбинаций или модификаций нуклеотидов в этих типах нуклеиновых кислот. Кроме того, молекулы нуклеиновой кислоты могут быть двухцепочечными или одноцепочечными (например, смысловая или антисмысловая цепь).

[0147] Молекулы нуклеиновых кислот не ограничиваются последовательностями, которые кодируют полипептиды (например, антитела); также могут быть включены некоторые или все не кодирующие последовательности, расположенные выше или ниже кодирующей последовательности (например, кодирующей последовательности химерного рецептора). Специалисты в области молекулярной биологии знакомы с обычными процедурами выделения молекул нуклеиновых кислот. Их можно, например, получить обработкой геномной ДНК эндонуклеазами рестрикции или проведением полимеразной цепной реакции (PCR). В случае, если молекула нуклеиновой кислоты представляет собой рибонуклеиновую кислоту (РНК), молекулы могут быть получены, например, путем транскрипции *in vitro*.

Рекомбинантные клетки и клеточные культуры

[0148] Нуклеиновая кислота по настоящему изобретению по настоящему изобретению может быть введена в клетку-хозяина, такую как, например, Т-лимфоцит человека, для получения рекомбинантной клетки, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты. Соответственно, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам получения рекомбинантной клетки, включая (а) получение клетки, способной к экспрессии белка, и (b) приведение предоставленной клетки в контакт с рекомбинантной нуклеиновой кислотой по изобретению.

[0149] Введение молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в клетки может быть достигнуто способами, известными специалистам в данной области, такими как, например, вирусная инфекция, трансфекция, конъюгация, слияние протопластов, липофекция, электропорация, нуклеофекция, преципитация фосфатом кальция, трансфекция, опосредованная полиэтиленимином (PEI), трансфекция, опосредованная DEAE-декстраном, трансфекция, опосредованная липосомами, технология пушки частиц, осаждение фосфатом кальция, прямая микроинъекция, доставка нуклеиновой кислоты с помощью наночастиц и тому подобное.

[0150] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновой кислоты могут быть доставлены с помощью вирусных или невирусных носителей доставки, известных в данной области. Например, молекула нуклеиновой кислоты может быть стабильно интегрирована в геном хозяина, или может реплицироваться эписомально, или присутствовать в рекомбинантной клетке в виде мини-кольцевого вектора экспрессии для транзитной экспрессии. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты сохраняется и реплицируется в рекомбинантной клетке как эписомальная единица. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты интегрируется в геном рекомбинантной клетки. Стабильная интеграция может быть достигнута с использованием классических методов случайной геномной рекомбинации или с помощью более точных методов, таких как редактирование генома CRISPR/Cas9 с помощью направляющей РНК или редактирование генома эндонуклеазы с помощью ДНК с помощью NgAgo (*Natronobacterium gregoryi* Argonaute), или с помощью более точных методов, таких как редактирование генома TALEN (эффektorные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции). В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты присутствует в рекомбинантной клетке в виде мини-кольцевого вектора экспрессии для транзитной экспрессии.

[0151] Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть инкапсулированы в вирусный капсид или липидную наночастицу или могут быть доставлены вирусными или невирусными средствами доставки и способами, известными в данной области, такими как электропорация. Например, введение нуклеиновых кислот в клетки может быть осуществлено с помощью вирусной трансдукции. В неограничивающем примере аденоассоциированный вирус (AAV) сконструирован для доставки нуклеиновых кислот в

клетки-мишени посредством вирусной трансдукции. Описано несколько серотипов AAV, и все известные серотипы могут инфицировать клетки из множества различных типов тканей. AAV способен трансдуцировать широкий спектр видов и тканей *in vivo* без признаков токсичности и вызывает относительно мягкие врожденные и адаптивные иммунные реакции.

[0152] Векторные системы, полученные из лентивирусов, также применимы для доставки нуклеиновых кислот и генной терапии посредством вирусной трансдукции. Лентивирусные векторы обладают несколькими привлекательными свойствами в качестве средств доставки генов, в том числе: (i) устойчивая доставка генов посредством стабильной интеграции вектора в геном хозяина; (ii) способность инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки; (iii) широкий тканевой тропизм, включая важные типы клеток-мишеней для генной и клеточной терапии; (iv) отсутствие экспрессии вирусных белков после векторной трансдукции; (v) способность доставлять сложные генетические элементы, такие как полицистронные или интронсодержащие последовательности; (vi) потенциально более безопасный профиль сайта интеграции; и (vii) относительно простая система для манипулирования и производства векторов.

[0153] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки-хозяева могут быть генетически сконструированы (например, трансдуцированы, трансформированы или трансфицированы) с использованием, например, векторной конструкции по настоящей заявке, которая может быть, например, вирусным вектором или вектором для гомологичной рекомбинации, который включает нуклеиновые кислотные последовательности, гомологичные части генома клетки-хозяина, или могут представлять собой вектор экспрессии для экспрессии представляющих интерес полипептидов. Эти клетки могут быть либо нетрансформированными клетками, либо клетками, которые уже были трансфицированы по меньшей мере одной молекулой нуклеиновой кислоты.

[0154] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная клетка представляет собой прокариотическую клетку или эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка присутствует *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка присутствует *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка присутствует *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная клетка представляет собой прокариотическую клетку, содержащую рекомбинантную нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная прокариотическая клетка включает рекомбинантную нуклеиновую кислоту, которая представляет собой клонирующий вектор. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная клетка представляет собой клетку животного. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка животного представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка животного является клеткой человека. В некоторых

вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой клетку примата, отличного от человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка млекопитающего представляет собой иммунную клетку, нейрон, эпителиальную клетку и эндотелиальную клетку или стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная клетка представляет собой клетку иммунной системы, например, лимфоцит (например, Т клетку или NK клетку) или дендритную клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммунная клетка представляет собой В клетку, моноцит, естественную киллерную (NK) клетку, базофил, эозинофил, нейтрофил, дендритную клетку, макрофаг, регуляторную Т-клетку, хелперную Т-клетку (Т_H), цитотоксическую Т-клетку (Т_{CTL}) или другую Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка иммунной системы представляет собой Т-лимфоцит.

[0155] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку. В некоторых вариантах клетка представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой Т-клетку-предшественник или регуляторную Т-клетку (Treg). В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой клетку CD34⁺, CD8⁺ или CD4⁺. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой CD8⁺ Т цитотоксический лимфоцит, выбранный из группы, включающей наивные CD8⁺ Т клетки, CD8⁺ Т-клетки центральной памяти, CD8⁺ Т-клетки эффекторной памяти и объемные CD8⁺ Т клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой CD4⁺ Т-хелперный лимфоцит, выбранный из группы, включающий наивные CD4⁺ Т-клетки, CD4⁺ Т-клетки центральной памяти, CD4⁺ Т-клетки эффекторной памяти и объемные CD4⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки могут быть получены с помощью лейкофереза, проводимого на образце, полученном от субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента-человека.

[0156] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная клетка дополнительно включает молекулу первой и второй нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе, где молекула первой нуклеиновой кислоты и молекула второй нуклеиновой кислоты не имеют одинаковой последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная клетка дополнительно включает первый и второй химерный полипептид, как описано в настоящем документе, где первый химерный полипептид и второй химерный полипептид не имеют одинаковой последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый химерный полипептид модулирует экспрессию и/или активность второго химерного полипептида.

[0157] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная клетка дополнительно включает кассету экспрессии или вектор, кодирующий представляющий интерес белок, функционально связанный с промотором, где экспрессия белка модулируется эффектором транскрипции химерного рецептора. В некоторых вариантах

осуществления изобретения представляющий интерес белок гетерологичен рекомбинантной клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичный белок представляет собой белок, который в норме не встречается в клетке, например, в норме не продуцируется клеткой. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор экспрессии кодирует копию белка, который уже присутствует в клетке. Примеры типов белков, подходящих для использования с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают цитокины, цитотоксины, хемокины, иммуномодуляторы, проапоптотические факторы, антиапоптотические факторы, гормоны, факторы дифференцировки, факторы дедифференцировки, рецепторы иммунных клеток или репортеры.

[0158] В некоторых вариантах осуществления изобретения рецептор иммунной клетки представляет собой рецептор Т-клетки (TCR). В некоторых вариантах осуществления изобретения рецептор иммунной клетки представляет собой рецептор химерного антигена (CAR). В некоторых вариантах осуществления изобретения кассета экспрессии, кодирующая представляющий интерес белок, включена в ту же молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует химерный рецептор согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения кассета экспрессии, кодирующая представляющий интерес белок, включена во второй вектор экспрессии, который отделен от молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный рецептор согласно настоящему изобретению. В другом аспекте в настоящем документе предложены клеточные культуры, включающие по меньшей мере одну рекомбинантную клетку, как описано в настоящем документе, и культуральную среду. Как правило, культуральная среда может представлять собой любую подходящую культуральную среду для культивирования описанных в настоящем документе клеток. Методы трансформации широкого спектра вышеупомянутых клеток и видов известны в данной области техники и описаны в технической и научной литературе. Соответственно, клеточные культуры, включающие по меньшей мере одну рекомбинантную клетку, как описано в настоящем документе, также входят в объем настоящей заявки. Способы и системы, подходящие для создания и поддержания клеточных культур, известны в данной области.

Фармацевтические композиции

[0159] В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновые кислоты и/или рекомбинантные клетки по настоящему изобретению могут быть включены в композиции, включая фармацевтические композиции. Такие композиции включают одну или несколько нуклеиновых кислот и/или рекомбинантных клеток, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент, например, носитель.

[0160] Фармацевтические композиции, пригодные для инъекций, включают стерильные водные растворы (где они растворимы в воде) или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) или

фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко набирать шприцем. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае диспергирования и за счет использования поверхностно-активных веществ, например, додецилсульфата натрия. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, аскорбиновой кислотой, тимеросалом и тому подобное. Во многих случаях в композицию обычно включают изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть обеспечено включением в композицию агента, замедляющего всасывание, например моностеарата алюминия и желатина.

[0161] Стерильные растворы для инъекций могут быть изготовлены путем включения активного соединения в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше.

[0162] В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды и рецепторы Notch по настоящему изобретению также можно вводить путем трансфекции или инфицирования с использованием способов, известных в данной области, включая, помимо прочего, способы, описанные McCaffrey *et al.* (*Nature* **418**:6893, 2002), Xia *et al.* (*Nature Biotechnol.* **20**:1006-10, 2002), или Putnam (*Am. J. Health Syst. Pharm.* **53**:151-60, 1996, erratum at *Am. J. Health Syst. Pharm.* **53**:325, 1996).

[0163] Как более подробно описано ниже, в некоторых вариантах осуществления рекомбинантные клетки согласно настоящему изобретению могут быть составлены для введения субъекту с использованием методов, известных специалистам в данной области. Например, составы, содержащие популяции рекомбинантных клеток, могут включать фармацевтически приемлемый эксципиент(ы). Эксципиенты, включенные в препараты, будут иметь различное назначение в зависимости, например, от используемых рекомбинантных клеток и способа введения. Примеры обычно используемых эксципиентов включают, без ограничения, физиологический раствор, забуференный физиологический раствор, декстрозу, воду для инъекций, глицерин, этанол и их комбинации, стабилизаторы, солюбилизующие агенты и поверхностно-активные вещества, буферы и консерванты,

тонизирующие агенты, наполнители и смазывающие агенты. Составы, содержащие рекомбинантные клетки, могут быть приготовлены и культивированы в отсутствие нечеловеческих компонентов, например, в отсутствие сыворотки животных. Состав может включать одну популяцию рекомбинантных клеток или более одной, например две, три, четыре, пять, шесть или более популяций рекомбинантных клеток.

[0164] Составы, содержащие популяцию(и) рекомбинантных клеток, можно вводить субъекту с использованием способов и способов, известных специалисту в данной области. Типичные способы включают, но не ограничиваются ими, внутривенную инъекцию. Другие способы включают, помимо прочего, внутриопухолевый, внутрикожный, подкожный (SC, SQ, Sub-Q, Нуро), внутримышечный (в/м), внутриартериальный, интрамедуллярный, внутрисердечный, внутрисуставной (суставной), интрасиновиальный (область суставной жидкости), внутричерепной, интраспинальный и интратекальный (спинномозговая жидкость). Для осуществления такого введения могут быть использованы устройства, подходящие для парентерального введения инфузии составов.

СПОСОБЫ ПО ИЗОБРЕТЕНИЮ

[0165] Введение любой терапевтической композиции, описанной в настоящем документе, например, химерных полипептидов, гуманизированных рецепторов HingeNotch, нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток и фармацевтических композиций, можно использовать для лечения пациентов от соответствующих заболеваний, таких как рак и хронические инфекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновые кислоты, рекомбинантные клетки и фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть включены в терапевтические агенты для применения в способах лечения или помощи в лечении субъекта, у которого имеется, у которого есть подозрения или у которого может быть высокий риск развития одного или нескольких заболеваний.

[0166] Соответственно, в одном аспекте некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам ингибирования активности клетки-мишени у субъекта, где способы включают введение субъекту первой терапии, включающей одну или более из нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток, и фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, где первая терапия ингибирует клетку-мишень. Например, клетка-мишень может быть ингибирована, если ее пролиферация снижена, если ее патологическое или патогенное поведение снижено, если она разрушена или убита и т. д. Ингибирование включает снижение измеряемого патологического или патогенного поведения по меньшей мере на около 10%, на около 15%, на около 20%, на около 25%, на около 30%, на около 35%, на около 40%, на около 45%, на около 50%, на около 55%, на около 60%, на около 65%, на около 70%, на около 75%, на около 80%, на около 85%, на около 90%, на около 95% или на около 100%. В некоторых вариантах осуществления изобретения способы включают введение субъекту эффективного количества рекомбинантных клеток, описанных в настоящем документе, где рекомбинантные клетки ингибируют активность клеток-мишеней у субъекта. Как правило,

клетки-мишени в раскрытых способах могут представлять собой клетки любого типа у субъекта и могут представлять собой, например, клетку острого лейкоза миеломы, клетку анапластической лимфомы, клетку астроцитомы, В-клеточную раковую клетку, клетку рака молочной железы, клетку рака толстой кишки, клетку эпендимомы, клетку глиобластомы, клетку глиомы, клетку лейомиосаркомы, клетку липосаркомы, клетку рака печени, клетку рака легкого, клетку лимфомы из мантийных клеток, клетку меланомы, клетку нейробластомы, клетку немелкоклеточного рака легкого, клетку олигодендроглиомы, клетку рака яичника, клетку рака поджелудочной железы, клетку периферической Т-клеточной лимфомы, клетку рака почки, клетку саркомы, клетку рака желудка, клетку карциномы, клетку мезотелиомы или клетку саркомы. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-мишень представляет собой патогенную клетку.

[0167] В другом аспекте некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам оказания помощи в лечении заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, где способы включают введение субъекту первой терапии, включающей одну или более рекомбинантных клеток, включая химерный полипептид, описанный в настоящем документе, и/или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, где первая терапия лечит заболевание у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения способы включают введение субъекту первой терапии, включающей эффективное количество рекомбинантных клеток, описанных в настоящем документе, где рекомбинантные клетки лечат заболевание.

[0168] В другом аспекте некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам содействия или помощи в лечении заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, где способы включают введение субъекту первой терапии, включающей один или более химерных полипептидов, гуманизированные рецепторы HingeNotch, нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток и фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, и вторая терапия, где первая и второй терапии, при этом первая и вторая терапия вместе лечат заболевание у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения способы включают введение субъекту первой терапии, включающей эффективное количество рекомбинантных клеток, описанных в настоящем документе, где рекомбинантная клетки лечат заболевание.

Введение субъекту рекомбинантных клеток

[0169] В некоторых вариантах осуществления изобретения способы по изобретению включают введение эффективного количества или числа рекомбинантных клеток субъекту, нуждающемуся в таком лечении. Эта стадия введения может быть осуществлена с использованием любого способа имплантации, известного в данной области. Например, рекомбинантные клетки можно вводить непосредственно в кровоток субъекта или вводить субъекту иным образом.

[0170] В некоторых вариантах осуществления изобретения способы, описанные в настоящем документе, включают введение (термин используется взаимозаменяемо с терминами «инъекция», «имплантация» и «трансплантация») рекомбинантных клеток

субъекту с помощью метода или пути, которые приводят по меньшей мере к частичной локализации введенных клеток в желаемом месте, так что возникает(ют) желаемый(ые) эффект(ы). Рекомбинантные клетки или их дифференцированное потомство можно вводить любым подходящим путем, который приводит к доставке в желаемое место у субъекта, где по меньшей мере часть введенных клеток или компонентов клеток остается жизнеспособной. Период жизнеспособности клеток после введения субъекту может составлять от нескольких часов, например, двадцати четырех часов, до нескольких дней, до нескольких лет или даже в течение жизни субъекта, то есть длительное приживание.

[0171] При профилактическом применении рекомбинантные клетки, описанные в настоящем документе, можно вводить субъекту до появления симптома заболевания или состояния, подлежащего лечению. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления профилактическое введение популяции рекомбинантных клеток предотвращает появление симптомов заболевания или состояния.

[0172] Когда в некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантные клетки предложены для терапии, они предоставляются в момент (или после) появления симптома или признака заболевания или состояния, например, при появлении заболевания или состояния.

[0173] Для использования в различных вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, эффективное количество рекомбинантных клеток, как описано в настоящем документе, может составлять по меньшей мере 10^2 клеток, по меньшей мере 5×10^2 клеток, по меньшей мере 10^3 клеток, по меньшей мере 5×10^3 клеток, по меньшей мере 10^4 клеток, по меньшей мере 5×10^4 клеток, по меньшей мере 10^5 клеток, по меньшей мере 2×10^5 клеток, по меньшей мере 3×10^5 клеток, по меньшей мере 4×10^5 клеток, по меньшей мере 5×10^5 клеток, по меньшей мере 6×10^5 клеток, по меньшей мере 7×10^5 клеток, по меньшей мере 8×10^5 клеток, по меньшей мере 9×10^5 клеток, по меньшей мере 1×10^6 клеток, по меньшей мере 2×10^6 клеток, по меньшей мере 3×10^6 клеток, по меньшей мере 4×10^6 клеток, по меньшей мере 5×10^6 клеток, по меньшей мере 6×10^6 клеток, по меньшей мере 7×10^6 клеток, по меньшей мере 8×10^6 клеток, по меньшей мере 9×10^6 клеток или кратное им. Рекомбинантные клетки могут быть получены от одного или нескольких доноров или могут быть получены из аутологичного источника. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные клетки размножают в культуре перед введением нуждающемуся в этом субъекту.

[0174] В некоторых вариантах осуществления изобретения доставка композиции рекомбинантных клеток (например, композиции, включающей множество рекомбинантных клеток в соответствии с любой из клеток, описанных в настоящем документе) субъекту с помощью способа или пути приводит к по меньшей мере частичной локализации клеточный состав в нужном месте. Композицию, включающую рекомбинантные клетки, можно вводить любым подходящим путем, который приводит к эффективному лечению субъекта, например, введение приводит к доставке в желаемое место у субъекта, куда доставляется по меньшей мере часть композиции, например, по меньшей мере 1×10^4 клеток,

доставляется в желаемый участок в течение определенного периода времени. Способы введения включают инъекции, инфузии, инстилляций. «Инъекция» включает, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, подоболочечную, внутрижелудочковую, внутрикапсульную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, подкожную, внутрисуставную, подкапсульную, субарахноидальную, интраспинальную, интрацереброспинальную и интрастернальную инъекцию и инфузию. В некоторых вариантах осуществления изобретения путь введения является внутривенным. Для доставки клеток стандартным способом введения является доставка путем инъекции или инфузии.

[0175] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантная клетки вводят системно, например, путем инфузии или инъекции. Например, популяцию рекомбинантных клеток вводят иначе, чем непосредственно в целевое место, ткань или орган, так что она попадает в систему кровообращения субъекта и, таким образом, подвергается метаболизму и другим подобным биологическим процессам.

[0176] Эффективность лечения, включающего любую из представленных здесь композиций для лечения заболевания или состояния, может определить опытный клиницист. Однако специалисту в данной области понятно, что лечение считается эффективным, если любой один или все признаки или симптомы или маркеры заболевания улучшаются или уменьшаются. Эффективность также может быть измерена отсутствием ухудшения состояния субъекта, что оценивается по уменьшению госпитализации или потребности в медицинских вмешательствах (например, прогрессирование заболевания останавливается или, по крайней мере, замедляется). Способы определения этих показателей известны специалистам в данной области и/или описаны в настоящем документе. Лечение включает любое лечение заболевания у субъекта или животного (некоторые неограничивающие примеры включают человека или млекопитающее) и включает: (1) ингибирование заболевания, например остановку или замедление прогрессирования симптомов; или (2) облегчение заболевания, например, регресс симптомов; и (3) предотвращение или снижение вероятности развития симптомов.

[0177] В некоторых вариантах осуществления описанных способов субъектом является млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления изобретения млекопитающим является человек. В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта имеется или подозревается наличие заболевания, связанного с ингибированием клеточной передачи сигналов, опосредованной лигандом или антигеном клеточной поверхности. Заболевания, подходящие для лечения композициями и способами по настоящему изобретению, включают, но этим не ограничивается, рак, аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания и инфекционные заболевания. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой рак или хроническую инфекцию.

Дополнительные лекарственные препараты

[0178] Как обсуждалось выше, рекомбинантная клетки и фармацевтическая композиции, описанные в настоящем документе, можно вводить в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, такими как, например, химиотерапевтические или противораковые агенты или противораковые терапевтические препараты. Введение «в сочетании с» одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами включает одновременное (одновременное) и последовательное введение в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько дополнительных терапевтических агентов, химиотерапевтических средств, противораковых агентов или противораковых терапевтических препаратов выбраны из группы, включающей химиотерапию, лучевую терапию, иммунотерапию, гормональную терапию, токсинотерапию и хирургию. Термины «химиотерапия» и «противораковый агент» используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Можно использовать различные классы противораковых агентов. Неограничивающие примеры включают: алкилирующие агенты, антимаболиты, антрациклины, растительные алкалоиды, ингибиторы топоизомеразы, подофиллотоксин, антитела (например, моноклональные или поликлональные), ингибиторы тирозинкиназы (например, мезилат иматиниба (Gleevec® или Glivec®)), гормональные препараты, растворимые рецепторы и другие противоопухолевые средства.

[0179] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения описанные способы лечения дополнительно включают введение субъекту второй терапии. Как правило, вторая терапия может представлять собой любую терапию, известную в данной области. Неограничивающие примеры методов лечения, подходящих для применения в сочетании с описанными в настоящем документе терапевтическими композициями, включают химиотерапию, лучевую терапию, иммунотерапию, гормональную терапию, терапию токсинами и хирургию. В некоторых вариантах осуществления изобретения вторая терапия включает одно или несколько дополнительных терапевтических средств, таких как, например, химиотерапевтические средства или противораковые средства или противораковые терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения первое терапевтическое средство и второе терапевтическое средство вводят совместно в одной и той же композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения первую терапию и вторую терапию вводят вместе в одной и той же композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения первую терапию и вторую терапию вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления изобретения первую терапию и вторую терапию вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления изобретения первую терапию вводят перед второй терапией. В некоторых вариантах осуществления изобретения первую терапию проводят после второй терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения первую терапию и вторую терапию вводят поочередно.

Способы модулирования активности клетки

[0180] В другом аспекте настоящем документе предложены различные способы модулирования активности клетки. Способы включают следующие стадии: (а) обеспечение эффективного количества любых рекомбинантных клеток, предложенных в настоящем документе, и (b) приведение их в контакт с выбранным лигандом, где связывание выбранного лиганда с внеклеточным лиганд-связывающим доменом индуцирует расщепление лиганд-индуцируемого сайта протеолитического расщепления и высвобождение транскрипционного эффектора, где высвобожденный транскрипционный эффектор модулирует активность рекомбинантной клетки. Специалисту в данной области после прочтения настоящего описания будет понятно, что раскрытые способы могут быть осуществлены *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*.

[0181] Неограничивающие примеры клеточной активности, которые можно модулировать с использованием способов, представленных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, экспрессию генов, пролиферацию, апоптоз, неапоптозную гибель, дифференцировку, дедифференцировку, миграцию, секрецию генного продукта, клеточная адгезия и цитолитическая активность.

[0182] В некоторых вариантах осуществления изобретения высвобожденный транскрипционный эффектор модулирует экспрессию генного продукта клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения высвобожденный транскрипционный эффектор модулирует экспрессию продукта гетерологичного гена в клетке. Продукт гетерологичного гена представляет собой продукт, который обычно не обнаруживается в нативной клетке, например, в норме не продуцируется клеткой. Например, клетка может быть генетически модифицирована нуклеиновой кислотой, включающей нуклеотидную последовательность, кодирующую продукт гетерологичного гена.

[0183] В некоторых вариантах осуществления изобретения продукт гетерологичного гена представляет собой продукт секретируемого гена. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичный генный продукт представляет собой генный продукт клеточной поверхности. В некоторых случаях продукт гетерологичного гена представляет собой продукт внутриклеточного гена. В некоторых вариантах осуществления изобретения высвобожденный транскрипционный эффектор одновременно модулирует экспрессию двух или более гетерологичных генных продуктов в клетке.

[0184] В некоторых вариантах осуществления изобретения продукт гена в клетке выбран из группы, включающей хемокин, хемокиновый рецептор, рецептор химерного антигена, цитокин, рецептор цитокина, фактор дифференцировки, фактор роста, рецептор фактора роста, гормон, метаболический фермент, белок патогенного происхождения, индуктор пролиферации, рецептор, РНК-управляемую нуклеазу, сайт-специфическую нуклеазу, Т-клеточный рецептор (TCR) или его компонент, рецептор химерного антигена (CAR), токсин, полученный из токсина белок, эффектор транскрипции, активатор транскрипции, репрессор транскрипции, регулятор трансляции, активатор трансляции, репрессор трансляции, активирующий иммунорецептор, антитело, ингибитор апоптоза,

индуктор апоптоза, сконструированный Т-клеточный рецептор, иммуноактиватор, иммуноингибитор и ингибирующий иммунорецептор.

[0185] В некоторых вариантах осуществления изобретения высвобожденный эффектор транскрипции модулирует (например, активирует) экспрессию белка, которая затем может усиливать цитотоксичность или клеточную пролиферацию или избегать истощения, такого как IFN γ , IL-2 и т. д.

[0186] В некоторых вариантах осуществления изобретения высвобожденный эффектор транскрипции модулирует дифференцировку клетки, и клетка представляет собой иммунную клетку, стволовую клетку, прогениторную клетку или клетку-предшественник.

[0187] Химерные полипептиды по настоящему изобретению обеспечивают более высокую степень экспрессии, чем существующие рецепторы SynNotch первого поколения, при использовании идентичных связывающих доменов и ICD. В зависимости от пары лиганд/связывающий домен и их аффинности химерные полипептиды по настоящему изобретению могут обеспечивать усиление экспрессии по меньшей мере на около 10%, на около 15%, на около 20%, на около 25%, на около 30%, на около 35%, на около 40%, на около 45%, на около 50% выше, чем у соответствующего рецептора SynNotch. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды согласно настоящему изобретению могут обеспечивать усиление экспрессии по меньшей мере на около 50%, на около 100%, на около 150%, на около 200%, на около 250%, на около 300%, на около 400%, на около 500%, на около 600% выше чем у соответствующего рецептора SynNotch.

[0188] Кроме того, химерные полипептиды согласно настоящему изобретению могут обеспечивать регуляцию транскрипции, которая зависит от степени активации Т-клеток, независимо от связывания лиганда. Например, при экспрессии в Т-клетке некоторые рецепторы согласно настоящему изобретению обеспечивают более сильный индуцированный лигандом сигнал, когда Т-клетка активирована, по сравнению с индуцированным лигандом сигналом, когда Т-клетка не активирована. Это обеспечивает дополнительную гибкость в использовании, например, в случаях, когда желательно усилить или подавить Т-клеточный ответ при активации, несмотря на отсутствие лиганда химерного рецептора.

СИСТЕМЫ И НАБОРЫ

[0189] Также в настоящем документе предложены наборы, включающие химерные полипептиды, гуманизированные рецепторы HingeNotch, рекомбинантные нуклеиновые кислоты, рекомбинантные клетки или фармацевтические композиции, предложенные и описанные в настоящем документе, а также письменные инструкции по их изготовлению и применению. Например, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены наборы, которые включают одно или несколько из следующего: (i) химерный полипептид, описанный в настоящем документе, (ii) рекомбинантные нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе, (iii) рекомбинантную клетку, описанную в настоящем документе, и (iv) фармацевтическую композицию, описанную в настоящем

документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения системы и/или наборы по настоящему изобретению дополнительно включают один или несколько шприцев (включая предварительно заполненные шприцы) и/или катетеры (включая предварительно заполненные шприцы), используемые для введения субъекту любой из предложенных рекомбинантных нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток или фармацевтических композиций. В некоторых вариантах осуществления изобретения набор может содержать один или несколько дополнительных терапевтических агентов, которые можно вводить одновременно или последовательно с другими компонентами набора для желаемой цели, например, для модулирования активности клетки, ингибирования раковой клетки-мишени или лечения заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

[0190] Любая из вышеописанных систем и наборов может дополнительно включать один или несколько дополнительных реагентов, где такие дополнительные реагенты могут быть выбраны из следующего: буферы для разбавления; растворы для восстановления, промывочные буферы, контрольные реагенты, контрольные векторы экспрессии, полипептиды отрицательного контроля, полипептиды положительного контроля, реагенты для получения *in vitro* полипептидов химерных рецепторов.

[0191] В некоторых вариантах осуществления изобретения система или набор могут дополнительно включать инструкции по использованию компонентов набора для практического применения способов. Инструкции по применению методов обычно записываются на подходящем носителе записи. Например, инструкция может быть напечатана на подложке, такой как бумага или пластик и т. д. Инструкция может быть в наборах в виде листка-вкладыша, в маркировке контейнера набора или его компонентов (то есть связанные с упаковкой или подупаковкой) и т. д. Инструкции могут быть представлены в виде файла данных электронного хранения, присутствующего на подходящем считываемом компьютером носителе данных, например, CD-ROM, дискета, флэш-накопитель и т. д. В некоторых случаях фактических инструкций нет в комплекте, но предусмотрены средства для получения инструкций из удаленного источника (например, через интернет). Примером этого варианта осуществления является комплект, который включает веб-адрес, по которому можно просмотреть инструкции и/или с которого можно загрузить инструкции. Как и в случае с инструкциями, это средство получения инструкций может быть записано на подходящей подложке.

[0192] Не делается допущение, что любая ссылка, цитируемая в настоящем документе, представляет собой предшествующий уровень техники. В обсуждении ссылок указывается то, что утверждают их авторы, и авторы изобретения оставляют за собой право оспаривать точность и актуальность цитируемых документов. Понятно, что, хотя в настоящем документе упоминается ряд источников информации, включая статьи из научных журналов, патентные документы и учебники; эта ссылка не является признанием того, что любой из этих документов составляет часть общеизвестных сведений в данной области техники.

[0193] Обсуждение общих способов, приведенных в настоящем документе, предназначено только для иллюстративных целей. Другие альтернативные способы и альтернативы будут очевидны специалистам в данной области техники после ознакомления с этим описанием и должны быть включены в сущность и объем настоящей заявки.

[0194] В данном описании упоминаются различные патенты, патентные заявки и другие типы публикаций (например, журнальные статьи, записи в электронной базе данных и т.д.). Описание всех патентов, патентных заявок и других публикаций, цитируемых в настоящем документе, настоящим включено в качестве ссылок во всей их полноте в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка были конкретно и отдельно указаны для включения в качестве ссылки.

ПРИМЕРЫ

[0195] При практическом воплощении настоящего изобретения используются, если не указано иное, общепринятые методы молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии, биохимии, химии нуклеиновых кислот и иммунологии, которые хорошо известны специалистам в данной области. Такие методы полностью объясняются в цитированной выше литературе.

[0196] Дополнительные варианты осуществления изобретения описаны более подробно в следующих примерах, которые представлены в качестве иллюстрации и никоим образом не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения или формулы изобретения.

ПРИМЕР 1

Дизайн и конструирование химерных конструкций рецепторов и ответных элементов

[0197] В этом примере описывается разработка и создание семейства гуманизированных рецепторов Notch в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения. Подробную информацию для различных иллюстративных рецепторов согласно настоящему изобретению можно найти в таблицах 1 и 2 далее.

[0198] В этих рецепторах Notch последовательность DBD была слита на N-конце с последовательностью TAD, за исключением рецептора pRay242, где последовательность DBD была слита на C-конце с последовательностью TAD. Последовательности TAD предшествовала 3-аминокислотная линкерная последовательность (TCR) в следующих рецепторах pRay239 (SEQ ID NO: 1), pRay240 (SEQ ID NO: 2), pRay241 (SEQ ID NO: 3), pRay243 (SEQ ID NO: 5), pRay244 (SEQ ID NO: 6), pRay250 (SEQ ID NO: 7), pRay251 (SEQ ID NO: 8), pRay252 (SEQ ID NO: 9).

[0199] Компактный ответный элемент 4× Рах6 (SEQ ID NO: 67) был разработан для конструирования одиночных векторных конструкций, таких как pRay445B и pRay451C. Этот компактный ответный элемент 4× Рах6 состоит из консенсусного мотива распознавания Рах6 ATTTTCACGCATGAGTGCACAG (SEQ ID NO: 59), повторенного 4 раза и с удаленными спейсерными последовательностями. Эту последовательность (SEQ ID

NO: 67) помещали выше минимального промотора TATA, и вместе ее клонировали в сайты EcoRI/BamHI общего лентивирусного вектора (называемого «EcoRI (GAATCC)-BamHI (GGATCC)-линеаризованная последовательность плазмидного вектора отвечающего элемента» и описана как SEQ ID NO: 64).

В этот вектор между сайтами BamHI (GGATCC) и NotI (GCGGCCGC) вектора ответа с использованием стандартных методов клонирования вставляли следующую конструкцию BCMA-CAR с меткой FLAG. Последовательность полученной плазмиды представлена как SEQ ID NO: 68. Это CAR второго поколения, который включает следующие элементы: последовательность Козака (gcsгссасс), последовательность сигнального пептида CD8a (SEQ ID NO: 689), FLAG-тег (SEQ ID NO: 70), анти-BCMA scFv (SEQ ID NO: 71), CD8 TMD (SEQ ID NO: 72), 41BB (SEQ ID NO: 73) и CD3z (SEQ ID NO: 74).

[0201] Гуманизированный шарнирный рецептор Notch помещали ниже промотора PGK мыши и вместе вставляли в сайт SbfI (CCTGCAGG) вектора общего ответа. Последовательности рецепторов представлены в обновленном файле Excel, а последовательность промотора PGK представлена как SEQ ID NO: 75.

[0202] Вместе общая архитектура одновекторной конструкции pRay445B и pRay451C выглядит следующим образом:

[Компактный ответный элемент 4×PAX6]-[минимальный промотор TATA]-[FLAG-TAGGED анти-BCMA CAR]-[мышинный промотор PGK]-[последовательность pRay445B или pRay451C]

ТАБЛИЦА 1. В этой таблице представлено краткое описание каждого из химерных рецепторов Notch, их соответствующих компонентов, а также соответствующих идентификаторов последовательностей, как указано в списке последовательностей. ECD: внеклеточный домен; N-JMD: N-концевой околочелюстной домен; TMD: трансмембранный домен; STS: последовательность остановки-переноса; DBD: ДНК-связывающий домен; TAD: домен транскрипции.

ID кон стру кции и	Описание рецептора	ECD [0200]	N-JMD [0200]	TMD [0200]	STS [0200]	DBD [0200]	TAD	Полная последо вательн ость
pRa y239	antiCD19scFv- Notch1deltaNR R-Notch2STS- HNF1aDBD- p65(361-551)	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 1
pRa y240	antiCD19scFv- CD8Hinge2- Notch1TMD- Notch2STS- HNF1aDBD- p65(361-551)	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 2
pRa y241	antiCD19scFv- RoboFn- Notch1TMD- HNF1aDBD- p65(361-551)	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 3
pRa y242	antiCD19scFv- CD8Hinge2- Notch1TMD- Notch2STS- p65(361-551)- HNF1aDBD	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 4
pRa y243	antiCD19scFv- CD8Hinge2-	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 5

	Notch1(1758-1878)-HNF1aDBD-p65(361-551)							
pRaly244	antiCD19scFv-CD8Hinge2-Notch1(1758-1788)-HNF1aDBD-p65(361-551)	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 6
pRaly250	antiCD19scFv-CD8Hinge2-Notch1(1758-1800)-HNF1aDBD-p65(361-551)	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 7
pRaly251	antiCD19scFv-CD8Hinge2-Notch1(1758-1825)-HNF1aDBD-p65(361-551)	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 8
pRaly252	antiCD19scFv-CD8Hinge2-Notch1(1758-1850)-HNF1aDBD-p65(361-551)	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 9
pRaly253	antiCD19scFv-CD8Hinge2-Notch1(1758-1878)-Pax6DBD-p65(428-551)	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 10

pRay254	antiCD19scFv- CD8Hinge2- Notch1(1758- 1788)- Pax6DBD- p65(428-551)	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 11
pRay255	antiCD19scFv- CD8Hinge2- Notch1TMD- Notch2STS- Pax6DBD- p65(428-551)	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 12
pRay445 B	antiCD19scFv- CD8Hinge2- Notch1TMD- Notch2STS- Pax6DBD- p65(428-551)	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 65
pRay151 C	antiCD19scFv- CD8Hinge2- Notch1TMD- Notch2STS- Pax6DBD- p65(361-551)	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 66

ТАБЛИЦА 2. В этой таблице представлено краткое описание каждого из химерных рецепторов Notch и соответствующих компонентов (с компонентами, разделенными запятыми). Если не указано иное, запись относится к белку человеческого происхождения. Например, «Notch1, Notch1» указывает на то, что две последовательности из Notch1 были слиты для создания этого белкового модуля.

ID констр укции	Описание рецептора	ECD	N-JMD	TMD	STS	DBD	TAD
pRay23 9	анти-CD19 scFv рецептор «miniNotch1» c	Сигнальный пептид CD8a, мус-	Notch1, Notch1	Notch1	Notch2	HNF1a	p65

	Notch2STS, HNF1ДНК- связывающим доменом и доменом трансаkтивации p65(361-551)	tag, анти- CD19 scFv					
pRay24 0	анти-CD19 scFv рецептор «HingeNotch1» с Notch2STS, HNF1ДНК- связывающим доменом и доменом трансаkтивации p65(361-551)	Сигнальны й пептид CD8a, мус- tag, анти- CD19 scFv	укороч енный шарни р CD8	Notch1	Notch2	HNF1a	p65
pRay24 1	анти-CD19 scFv рецептор «Robo1- Notch1» с Notch2STS, HNF1ДНК- связывающий домен и домен трансаkтивации p65(361-551)	Сигнальны й пептид CD8a, мус- tag, анти- CD19 scFv	Robo1	Notch1	Notch2	HNF1a	p65
pRay24 2	анти-CD19 scFv рецептор «HingeNotch1» с Notch2STS; слитый с доменом трансаkтивации p65(361-551) и HNF1ДНК- связывающим доменом (порядок слияния TAD-DBD)	Сигнальны й пептид CD8a, мус- tag, анти- CD19 scFv	укороч енный шарни р CD8	Notch1	Notch2	HNF1a	p65

pRay24 3	анти-CD19 scFv рецептор «HingeNotch1» с удлинением Notch1 ICD до aa1878 и HNF1ДНК- связывающим доменом и доменом трансактиваии p65(361-551)	Сигнальны й пептид CD8a, мус- tag, анти- CD19 scFv	укороч енный шарни р CD8	Notch1	Notch1	HNF1a	p65
pRay24 4	анти-CD19 scFv рецептор «HingeNotch1» с удлинением Notch1 ICD до aa1788 и HNF1ДНК- связывающим доменом и доменом трансактиваии p65(361-551)	Сигнальны й пептид CD8a, мус- tag, анти- CD19 scFv	укороч енный шарни р CD8	Notch1	Notch1	HNF1a	p65
pRay25 0	анти-CD19 scFv рецептор «HingeNotch1» с удлинением Notch1 ICD до aa1800 и HNF1ДНК- связывающим доменом и доменом трансактиваии p65(361-551)	Сигнальны й пептид CD8a, мус- tag, анти- CD19 scFv	укороч енный шарни р CD8	Notch1	Notch1	HNF1a	p65
pRay25 1	анти-CD19 scFv рецептор «HingeNotch1» с удлинением Notch1 ICD до aa1825 и	Сигнальны й пептид CD8a, мус- tag, анти- CD19 scFv	укороч енный шарни р CD8	Notch1	Notch1	HNF1a	p65

	HNFIДНК-связывающим доменом и доменом трансактивации p65(361-551)						
pRay25 2	анти-CD19 scFv рецептор «HingeNotch1» с удлинением Notch1 ICD до aa1850 и HNFIДНК-связывающим доменом и доменом трансактивации p65(361-551)	Сигнальный пептид CD8a, myc-tag, анти-CD19 scFv	укороченный шарнир CD8	Notch1	Notch1	HNFIa	p65
pRay25 3	анти-CD19 scFv рецептор «HingeNotch1» с удлинением Notch1 ICD до aa1878 и Pax6 ДНК-связывающим доменом и доменом трансактивации p65(428-551)	Сигнальный пептид CD8a, myc-tag, анти-CD19 scFv	укороченный шарнир CD8	Notch1	Notch1	Pax6	p65
pRay25 4	анти-CD19 scFv рецептор «HingeNotch1» с удлинением Notch1 ICD до aa1788 и Pax6 ДНК-связывающим доменом и доменом трансактивации p65(428-551)	Сигнальный пептид CD8a, myc-tag, анти-CD19 scFv	укороченный шарнир CD8	Notch1	Notch1	Pax6	p65

pRay25 5	анти-CD19 scFv рецептор «HingeNotch1» с Notch2STS; Pax6 ДНК-связывающий домен и домен трансактиваии p65(428-551)	Сигнальны й пептид CD8a, мус- tag, анти- CD19 scFv	укороч енный шарни р CD8	Notch1	Notch2	Pax6	p65
pRay44 5B	анти-CD19 scFv рецептор «HingeNotch1» с Notch2STS; Pax6 ДНК-связывающий домен и домен трансактиваии p65(428-551) с элементом ответа, управляющим анти-BCMA CAR на одном и том же векторе	Сигнальны й пептид CD8a, мус- tag, анти- CD19 scFv	укороч енный шарни р CD8	Notch1	Notch2	Pax6	p65
pRay15 1C	анти-CD19 scFv «HingeNotch1» рецептор с Notch2STS; Pax6 ДНК-связывающий домен и p65(361- 551) домен трансактиваии с элементом ответа, управляющим анти-BCMA CAR на одном и том же векторе	Сигнальны й пептид CD8a, мус- tag, анти- CD19 scFv	укороч енный шарни р CD8	Notch1	Notch2	Pax6	p65

[0203] Химерные рецепторы, описанные в таблицах 1-2 выше, были созданы путем слияния одноцепочечного антигенсвязывающего фрагмента CD19 scFv (Porter DL *et al.*, 2011) с соответствующим каркасом рецептора, человеческим или гуманизированным транскрипционным эффектором, и домен трансактивации, полученный из субъединицы p65 ядерного фактора NFκB человека (p65). Для конструирования этих рецепторов фрагменты ДНК, кодирующие аминокислотные последовательности, представленные в таблице 1 и перечне последовательностей, амплифицировали с помощью PCR из синтезированных фрагментов гена или плазмид, содержащих последовательность ДНК для указанного белка, и собирали с использованием стандартных методов клонирования (например, overhang PCR, fusion PCR и In-fusion cloning) с фланкирующими последовательностями запуска и остановки трансляции в модифицированный лентивирусный вектор pHR'SIN:CSW вектор (KT Roybal *et al.*, *Cell* 2016 Oct 6; **167**(2):419-32), содержащий промотор фосфолипидкиназы (PGK) для всех экспериментов с первичными Т-клетками, описанных в примерах 5-7 ниже. Все конструкции рецепторов также содержали N-концевой сигнальный пептид CD8α (MALPVTALLLPLALLLHAARP; SEQ ID NO: 56) для нацеливания на мембрану и myc-tag (EQKLISEEDL; SEQ ID NO: 57) для удобного определения поверхностной экспрессии с антителом, конъюгированным с флуоресцентным красителем (α-myc A647®, Cell Signaling Technology, № по каталогу 2233).

[0204] Вектор pHR'SIN:CSW также модифицировали для получения плазмид элемента ответа. Для рецепторов на основе HNF1α была сконструирована плазида элемента ответа с использованием синтетического сайта связывания, включающего четыре копии инвертированных повторов 5'-GTTAAT-3' и 5'-ATTAAC-3', которые были клонированы с 5'-конца до минимального промотора TATA. Эту кассету вставляли в сайты рестрикции *EcoRI* и *BamHI* pHR'SIN:CSW. Для рецепторов на основе Pax6 четыре копии согласованного сайта связывания Pax6, ATTTTCACGCATGAGTGCACAG (SEQ ID NO: 59), клонировали с 5'-конца к минимальному промотору TATA и вставляли через сайты рестрикции *EcoRI* и *BamHI*. клонировали с 5'-конца к минимальному промотору TATA и вставляли через сайты рестрикции.

[0205] Для конструирования всех индуцируемых векторов BFP кодирующую последовательность синего флуоресцентного репортерного белка (BFP) клонировали через сайт *BamHI* в сайте множественного клонирования, расположенном 3' относительно ответных элементов. Для конструирования всех индуцируемых векторов CAR были помечены на С-конце зеленым флуоресцентным репортерным белком (GFP) и клонированы через сайт *BamHI* в сайте множественного клонирования, расположенном на 3'-конце к элементам ответа. Все конструкции были клонированы с помощью стандартных методов клонирования и набора для клонирования In-Fusion® (Clontech #ST0345) в соответствии с инструкциями производителя.

ПРИМЕР 2

Выделение и культивирование первичных Т-клеток человека

[0206] В этом примере описано выделение и культивирование первичных Т-клеток человека, которые впоследствии использовались в различных экспериментах по трансдукции клеток, описанных в примере 3 далее.

[0207] В этих экспериментах первичные CD4⁺ и CD8⁺ Т клетки выделяли из крови после афереза и обогащали путем негативной селекции с использованием наборов для выделения Т-клеток человека (коктейль для обогащения CD4⁺ или CD8⁺ человека; STEMCELL Technologies № по каталогу 15062 и 15063). Кровь была получена из Центров крови Тихоокеанского региона (San Francisco, CA) в соответствии с одобрением Институционального наблюдательного совета университета. Т-клетки криоконсервировали в питательной среде (RPMI-1640, ядро клеточной культуры UCSF) с 20% сывороткой человека AB (Valley Biomedical Inc., #HP1022) и 10% ДМСО. После оттаивания Т-клетки культивировали в среде Т-клеток человека, содержащей X-VIVO™ 15 (Lonza #04-418Q), 5% сыворотки человека AB и 10 mM нейтрализованного N-ацетил-L-цистеина (Sigma-Aldrich #A9165), дополненного 30 единиц/мл IL-2 (доклинический репозиторий NCI BRB) для всех экспериментов.

ПРИМЕР 3

Т-клетки человека стабильно трансдуцировали лентивирусными векторами

[0208] В этом примере описан общий протокол, используемый для лентивирусной трансдукции Т-клеток человека.

[0209] Как правило, лентивирусные векторы, псевдотипированные по G-белку оболочки вируса везикулярного стоматита (VSV-G) (пантропные векторы), получали путем трансфекции клеток Lenti-X™ 293T (Clontech #11131D) трансгенным вектором экспрессии pHR⁺SIN:CSW и вирусными упаковочными плазмидами pCMVdR8.91 и pMD2.G с использованием Mirus TransIT®-Lenti (Mirus, #MIR 6606). Как правило, первичные Т-клетки размораживали в тот же день и после 24 часов культивирования стимулировали шариками, содержащими анти-CD3 и анти-CD28 антитела, связанные с поверхностью (Human T-Activator CD3/CD28 Dynabeads®, Life Technologies #11131D) в соотношении 1:3 клетка:гранулы. Через 48 часов собирали вирусный супернатант и первичные Т-клетки подвергали воздействию вируса в течение 24 часов. На 5-й день после стимуляции Т-клеток шарики удаляли, и Т-клетки размножались до 14-го дня, когда они отдыхали и их можно было использовать в анализах. Т-клетки сортировали для анализов с помощью проточного цитометра Beckton Dickinson (BD) FACSAria™ II.

ПРИМЕР 4

Линии раковых клеток

[0210] Используемые линии раковых клеток представляли собой клетки миелогенного лейкоза K562 (ATCC #CCL-243). Клетки K562 трансдуцировали лентивирусом для стабильной экспрессии человеческого CD19 на уровнях, эквивалентных опухолям Дауди. Уровни CD19 определяли путем окрашивания клеток α-CD19 APC (Biolegend #302212). Все клеточные линии сортировали по экспрессии трансгена.

ПРИМЕР 5

Стимуляция первичных Т-клеток *in vitro*

[0211] В этом примере описаны эксперименты, проведенные для демонстрации стимуляции первичных Т-клеток *in vitro* описанными в настоящем документе химерными гуманизированными полипептидами HingeNotch.

[0212] Для всех стимуляций Т-клеток *in vitro* 1×10^5 Т-клеток совместно культивировали с клетками-отправителями в соотношении 1:1 в плоскодонных 96-луночных планшетах для тканевых культур. Культуры анализировали через 24, 48 или 72 часа на активацию репортера с помощью BD Fortessa™ X-50. Весь анализ проточной цитометрии выполняли в программном обеспечении FlowJo™ (TreeStar, Inc.).

ПРИМЕР 6

Профиль активации первичных Т-клеток CD4⁺ человека в отсутствие гена рецептора

[0213] В этом примере описаны эксперименты, проведенные для оценки профиля активации первичных CD4⁺ Т-клеток человека, содержащих (4×)HNF1α-ответный элемент-репортер или (4×)Рах6-ответный элемент-репортер в отсутствие рецептора для его активации.

[0214] В этих экспериментах активация в течение 72-часового периода первичных CD4⁺ Т-клеток человека, содержащих (4×)HNF1α-ответный элемент-репортер (ФИГ. 2) или (4×)Рах6-ответный элемент-репортер (ФИГ. 12). Приблизительно 1×10^5 Т-клеток культивировали по отдельности (верхняя кривая), с 1×10^5 клеток К562 (средняя кривая) или с 1×10^5 CD19⁺ клеток К562 (нижняя кривая) в течение 24, 48 или 72 часа, и активацию транскрипции индуцибельного репортера BFP измеряли с использованием Fortessa X-50 (BD). Указан процент клеток, активированных CD19⁺ К562 (нижняя кривая, %). Этот эксперимент демонстрирует, что репортерная конструкция не активируется клетками CD19 или К562 в отсутствие гуманизованного рецептора HingeNotch.

ПРИМЕР 7

Активация гуманизованного рецептора HingeNotch в первичных CD4⁺ Т-клетках

[0215] В этом примере описаны результаты экспериментов, проведенных для демонстрации активации генов, опосредованной некоторыми новыми гуманизированными рецепторами HingeNotch, описанными в настоящем документе, в первичных клетках CD4⁺. Эти эксперименты проводились с использованием десяти (10) типичных гуманизованных рецепторов: pRay240, pRay242, pRay243, pRay244, pRay250, pRay251, pRay252, pRay253, pRay254, pRay255. В качестве контроля в тех же условиях тестировали гуманизированный MiniNotch (pRay239) и гуманизированный RoboNotch. Краткое описание каждого из химерных рецепторов Notch, их соответствующих компонентов, а также соответствующих идентификаторов последовательностей, как указано в списке последовательностей, представлены в таблице 1. В этих экспериментах приблизительно 1×10^5 двойных положительных Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы и векторы ответа, культивировали по отдельности (верхняя кривая), с 1×10^5 клеток К562 (средняя кривая), или с 1×10^5 CD19⁺ клеток К562 (нижняя кривая) в течение 24, 48 или 72 часа. Активацию

транскрипции индуцибельного репортера BFP измеряли с использованием Fortessa X-50 (BD). Указан процент клеток, активированных CD19⁺ K562 (нижняя кривая, %). Как показано на **ФИГ. 3-11**, было обнаружено, что экспрессия репортерного гена BFP активируется шестью гуманизированными рецепторами HingeNotch, содержащими ДНК-связывающий домен, полученный из HNF1 α человека (pRay240, pRay243, pRay244, pRay250, pRay251, и pRay252), но только при контакте с клетками-мишенями CD19⁺. Напротив, рецепторы MiniNotch (pRay239) и RoboNotch (pRay241) проявляли высокую степень конститутивной активации (не «подобную переключателю») при использовании с ICD по настоящему изобретению. Гуманизированные рецепторы HingeNotch, pRay240, pRay243, pRay244, pRay250, pRay251 и pRay252 различаются прежде всего длиной внутриклеточной последовательности между STS и областью регуляции транскрипции на основе HNF1A и демонстрируют тенденцию к повышенной экспрессии при уменьшенной длине.

[0216] Аналогично, как показано на **ФИГ. 13-15**, было обнаружено, что экспрессия репортерного гена BFP активируется всеми тремя гуманизированными рецепторами HingeNotch, содержащими ДНК-связывающий домен, полученный из Pax6 человека, но только при контакте с клетками-мишенями CD19⁺. Эти конструкции, pRay253, pRay254 и pRay255 также различаются прежде всего длиной внутриклеточной последовательности между STS и областью регуляции транскрипции на основе Pax6, но не проявляют чувствительности к изменениям длины.

ПРИМЕР 8

Генерация репортерных Т-клеток Jurkat

[0217] В этом примере описано получение репортерных Т-клеток Jurkat, которые впоследствии использовали для тестирования гуманизированных рецепторов HingeNotch, описанных в настоящем документе.

[0218] В этих экспериментах Т-клетки Е6-1 Jurkat (ATCC# TIB-152) трансдуцировали лентивирусной репортерной плазмидой, несущей индуцируемый репортерный ген BFP и/или конститутивный репортерный ген mCitrine, как описано ранее (K.T. Roybal *et al.*, *Cell*, **164**:1-10, 2016), за исключением того, что репортерная плазмида, использованная в этих экспериментах, также содержала элементы ответа, соответствующие тестируемым рецепторам. Лентивирусные частицы получали с вектором экспрессии трансгена рецептора, как описано ранее (L. Morsut *et al.*, *Cell* (2016) **164**:780-91). Репортер-положительные клетки Jurkat трансдуцировали отдельными рецепторами и размножали для экспериментов в 96-луночных планшетах. Репортер-положительные клетки Jurkat сортировали по экспрессии mCitrine с использованием проточного цитометра Beckton Dickinson (BD) FACSAriaTM II и размножали.

ПРИМЕР 9

Стимуляция Т-клеток Jurkat *in vitro*

[0219] В этом примере описаны эксперименты, проведенные для демонстрации стимуляции Т-клеток Jurkat *in vitro* гуманизированными полипептидами HingeNotch, описанными в настоящем документе.

[0220] Для всех стимуляций Jurkat Т *in vitro* 1×10^5 клеток Jurkat Т культивировали совместно с клетками-отправителями в соотношении 1:1 в плоскодонных 96-луночных планшетах для тканевых культур. Культуры анализировали через 24, 48 или 72 часа на активацию репортера с помощью BD Fortessa™ X-50. Весь анализ проточной цитометрии выполняли в программном обеспечении FlowJo™ (TreeStar, Inc.).

ПРИМЕР 10

Модели ксенотрансплантата опухоли

[0221] Мышам NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) имплантировали 1×10^6 опухолевых клеток K562-BCMA/CD19 подкожно в левый бок и 1×10^6 опухолевых клеток K562-BCMA в правый бок. Через четыре дня после имплантации опухоли 3×10^6 сконструированных первичных CD4⁺ и CD8⁺ Т клетки (всего 6×10^6 Т клеток) вводили внутривенно через хвостовую вену. Размер опухоли контролировали с помощью штангенциркуля 2-3 раза в неделю, и определяли, что мыши достигли конечной точки, когда размер опухоли составлял ≥ 20 мм.

ПРИМЕР 11

Уничтожение клеток-мишеней лентивирусными векторными конструкциями, содержащими гуманизированные рецепторы HingeNotch и индуцированные цепи BCMA-CAR

[0222] В этом примере описаны эксперименты, проведенные для демонстрации того, что гуманизированные рецепторы HingeNotch согласно настоящему изобретению могут нацеливаться на уничтожение клеток и индуцировать цепи BCMA-CAR.

[0223] В этих экспериментах первичные Т-клетки человека активировали анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали лентивирусными конструкциями, экспрессирующими полностью гуманизированный рецептор HingeNotch (HNF1A), и лентивирусным вектором с индуцируемым анти-CD28-рецептором. Кассета BCMA-CAR содержит элементы ответа HNF1A ниже по течению и минимальный промотор. Клетки сортировали по экспрессии гуманизированного рецептора HingeNotch с помощью msc-tag на 5-й день после первоначальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации вместе с конститутивно экспрессируемым анти-BCMA CAR и негуманизированной схемой рецептора HingeNotch на основе Gal4 в качестве контроля. Для исследования 1×10^5 Т-клеток культивировали совместно с 1×10^5 CD19⁺ клеток K562 (левые панели) или 1×10^5 BCMA⁺ CD19⁺ клеток K562 (правые панели). Индукцию CAR оценивали путем окрашивания маркированного FLAG анти-BCMA CAR (левые панели). Гибель клеток-мишеней оценивали в течение 72 часов с помощью окрашивания DRAQ7 и проточной цитометрии с помощью Fortessa X-50 (BD) (правая панель). Как показано на **ФИГ. 16А**, полностью гуманизированные схемы HingeNotch эффективно очищают клетки-мишени так же эффективно, как схемы на основе CAR или Gal4VP64.

[0224] В этих экспериментах было обнаружено, что двухвекторная схема, состоящая из гуманизированного шарнирного рецептора Notch с использованием фактора транскрипции HNF1A (pRay240) и отвечающего элемента, управляющего полезной нагрузкой BCMA-CAR, индуцирует экспрессию CAR (в присутствии только CD19) до уровней, соответствующих уровням конститутивно экспрессируемого CAR, управляемого промотором SFFV. Для сравнения была включена двойная векторная схема с использованием шарнирного Notch вместо Gal4, и вместе это показывает, что индукция CAR с помощью CD19+ K562 гуманизированным рецептором, по-видимому, происходит медленнее в течение 3 дней. Это, по-видимому, не препятствует способности гуманизированной цепи рецептора очищать клетки-мишени, однако, как показано на правой панели **ФИГ. 16А**, где CD19/BCMA K562, экспрессирующие как антиген-триггер (CD19), так и антиген-мишень CAR (BCMA), очищаются тремя наборами сконструированных CD8+ Т-клеток (конститутивный CAR-, цепь HNF1A- и цепь Gal4VP64) с одинаковой скоростью.

[0225] На **ФИГ. 16В** описан эксперимент *in vivo*, проведенный для демонстрации того, что полностью гуманизированная схема рецептора может эффективно и специфически очищать опухоли в модели с двумя антигенами, предлагая, таким образом, неиммуногенное решение для специфического нацеливания на опухоли. Вкратце, опухоли K562, экспрессирующие как праймирующий антиген, так и антиген-мишень CAR (CD19, BCMA), очищались как цепями рецептора Gal4VP64 (нечеловеческого), так и HNF1A (человеческого). Чтобы продемонстрировать специфичность, той же мыши были имплантированы опухоли K562 только с антигеном CAR (BCMA), и было показано, что они продолжают расти со скоростью, аналогичной контрольным мышам, получавшим нетрансдуцированные Т-клетки. Было показано, что в качестве контроля Т-клетки с конститутивно экспрессированными анти-BCMA CAR уменьшают опухолевую массу в обеих опухолях. Было обнаружено, что полностью гуманизированные схемы HingeNotch (триггер CD19 для цепи полезной нагрузки анти-BCMA CAR) эффективно устраняют двойные положительные опухоли, а не одиночные положительные опухоли.

ПРИМЕР 12

Профиль активации одновекторных рецепторов

[0226] В этом примере описаны эксперименты, проведенные для демонстрации того, что рецепторы на основе Рах6 по настоящему изобретению достаточно малы, чтобы соответствовать конфигурации одного лентивирусного вектора. две полностью гуманизированные конструкции рецептора показаны на **ФИГ. 17**, один с меньшим TAD p65 (pRay445B) и один с более длинным доменом TAD p65 (pRay451C), который показал более сильную индукцию полезной нагрузки CAR. Не привязываясь к какой-либо конкретной теории, этот одновекторный дизайн/формула позволит такой схеме войти в текущие утвержденные производственные конвейеры для клинических применений, а также откроет возможность использовать различные варианты доставки, такие как целевая интеграция с помощью методов CRISPR/Cas9.

[0227] В этих экспериментах 1×10^5 двойных положительных Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19-рецепторы и векторы ответа анти-BCMA CAR, культивировали с 1×10^5 клеток BCMA+ K562 (верхняя кривая), или с 1×10^5 клеток BCMA+ CD19+ K562 (нижняя кривая) в течение 72 часов. Транскрипционную активацию индуцибельного FLAG-меченого анти-BCMA CAR измеряли окрашиванием FLAG-PE на Fortessa X-50 (BD). Отображается процент клеток, активированных BCMA+ CD19+ K562 (нижняя кривая, %) (см., например, ФИГ. 17).

ПРИМЕР 13

Получение рибонуклеопротеиновых комплексов

[0228] В этом примере описано получение комплексов рибонуклеопротеинов (RNP) для CRISPR-опосредованной интеграции нуклеиновых кислот, кодирующих один или несколько гуманизированных рецепторов HingeNotch согласно настоящему изобретению.

[0229] RNP получают путем образования комплекса двухкомпонентной gRNA с Cas9. В этих экспериментах двухкомпонентная gRNA включает crRNA и tracrRNA, как химически синтезированные (с помощью Dharmacon или IDT), так и лиофилизированные. По прибытии лиофилизированную РНК ресуспендируют в Tris-HCl (7,4 pH) с 150 мМ KCl в концентрации 160 мкМ и хранят аликвотами при температуре -80°C . Поли(L-глутаминовую кислоту) (PGA) с молекулярной массой (Mw) около 15-50 кДа (Sigma) ресуспендируют до 100 мг/мл в воде, стерильно фильтруют и затем хранят в аликвотах при температуре -80°C . Cas9-NLS (QB3 Macrolab) получают рекомбинантно, очищают и хранят в концентрации 40 мкМ в 20 мМ HEPES-KOH, pH 7,5, 150 мМ KCl, 10% глицерина, 1 мМ DTT.

[0230] Для получения RNP аликвоты crRNA и tracrRNA размораживают, смешивают в соотношении 1:1 по объему и подвергают отжигу путем инкубации при температуре 37°C в течение 30 минут с получением 80 мкМ раствора мРНК. Затем PGA смешивают со свежеприготовленной gRNA в объемном соотношении 0,8:1, затем образуют комплекс с белком Cas9 до конечного объемного соотношения gRNA:PGA:Cas9 1:0,8:1 (2:1 молярное соотношение gRNA к Cas9) и инкубируют при температуре 37°C в течение 15 мин с получением 14,3 мкМ раствора RNP. RNP подвергают электропорации сразу после образования комплекса.

ПРИМЕР 14

Получение матрицы двухцепочечной ДНК для направленной по гомологии репарации (HDR)

[0231] В этом примере описано получение донорных двухцепочечных ДНК-матриц для CRISPR-опосредованной интеграции раскрытых нуклеиновых кислот посредством пути гомологически направленной репарации (HDR). В этих экспериментах каждая двухцепочечная ДНК-матрица направленной гомологии репарации (HDRT) содержит вставку новой/синтетической ДНК, окруженную гомологическими плечами. Процедуры Gibson Assembly® используются для конструирования плазмид, содержащих последовательности HDRT, и полученные плазмиды используются в качестве матриц для

высокопроизводительной PCR амплификации (полимераза Капа Hot Start). Полученные PCR-ампликоны/HDRT затем очищают с использованием (1,0×) технологии твердофазной обратимой иммобилизации (SPRI) Beckman Coulter на парамагнитных шариках и элюируют в H₂O. Концентрации элюированных HDRT определяют с помощью NanoDrop в разведении 1:20, а затем нормализуют до 1 мкг/мкл. Размер амплифицированного HDRT подтверждается гель-электрофорезом в 1,0% агарозном геле.

ПРИМЕР 15

Электропорация первичных Т-клеток

[0232] В этом примере описан общий протокол, используемый для экспериментов по электропорации первичных Т-клеток. Как правило, первичные Т-клетки получают и культивируют, как описано выше. После стимуляции в течение 48-56 часов Т-клетки собирают из их культуральных сосудов, и анти-человеческие CD3/анти-CD28 Dynabeads отделяют от Т-клеток магнитным полем. Непосредственно перед электропорацией очищенные от гранул клетки центрифугируют в течение 10 мин при 90×g, отсасывают и ресуспендируют в буфере для электропорации Lonza P3. Каждое экспериментальное условие получает диапазон от 750000 до 1 миллиона активированных Т-клеток, ресуспендированных в 20 мкл буфера P3. Все эксперименты по электропорации проводят в 96-луночном формате.

[0233] HDRT аликвотами распределяют в отдельные лунки 96-луночного полипропиленового планшета с V-образным дном. Между стадиями образования комплекса gRNA и Cas9 во время сборки RNP добавляют полиглутаминовую кислоту. Затем к HDRT добавляют RNP в комплексе и инкубируют вместе при комнатной температуре не менее 30 сек. Т-клетки, ресуспендированные в буфере для электропорации, добавляют к смеси RNP и HDRT, быстро перемешивают, а затем переносят в 96-луночный кюветный планшет для электропорации.

[0234] Все электропорации осуществляют с использованием 96-луночной системы электропорации Lonza 4D с импульсным кодом EH115. Если не указано иное, 3,5 мкл RNP (включая 50 пмоль общего RNP) подвергают электропорации вместе с 1-3 мкл матрицы HDR при концентрации 1 мкг/мкл (всего 1-3 мкг матрицы HDR). Сразу после всех электропораций в каждую лунку добавляют по 80 мкл предварительно подогретой среды (без цитокинов) и клетки оставляют на 15 мин при температуре 37°C в инкубаторе для клеточных культур, оставаясь в кюветах для электропорации. Через 15 минут клетки перемещают в сосуды для окончательной культивирования и добавляют среду с добавлением 500 ЕД/мл IL-2.

ПРИМЕР 16

Руководство по дизайну РНК

[0235] В этом примере описывается конструкция направляющей РНК (gRNA) для нацеливания на первый экзон константной цепи гена TCRα (TRAC). Целевая последовательность расположена выше трансмембранного домена TCRα. Этот домен необходим для сборки TCRα и β и адресации к клеточной поверхности. Как негомологичное

соединение концов (NHEJ), так и интеграция CAR с помощью HDR в этом локусе затем эффективно разрушают комплекс TCR.

[0236] Для B2M разработана gRNA, нацеленная на первый экзон гена B2M.

Последовательность TRAC gRNA:

[0237] 5'-C*A*G*GGUUCUGGAUAUCUGUGUUUUAGAGC
UAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA
AGUGGCACCGAGUCGGUGCU*U*U*U-3' (SEQ ID NO: 60)

Последовательность B2M gRNA:

[0238] 5'-G*G*C*CACGGAGCGAGACAUCUUUUUAGAGC
UAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA
AGUGGCACCGAGUCGGUGCU*U*U*U-3'. (SEQ ID NO: 61). В этой последовательности звездочка (*) означает 2'-О-метил 3' фосфоротиоат.

Мессенджер PHK

[0239] Модифицированные направляющие PHK (gRNA) и mRNA Cas9 синтезированы компанией TriLink Biotechnologies. Направляющие PHK восстанавливали в концентрации 1 мкг/мкл в Т-буфере для цитопорации (Harvard Apparatus).

AAV

[0240] Нуклеиновые кислоты, кодирующие ряд гуманизированных рецепторов HingeNotch в соответствии с некоторыми описанными в настоящем документе вариантами осуществления, клонированы в остов pAAV-GFP (Cell Biolabs). Полученные конструкции также содержат геномную последовательность гена TCR α (TRAC) (амплифицированную с помощью ПЦР), фланкирующую нацеливающие последовательности gRNA.

[0241] Аналогичная стратегия используется при нацеливании на локус B2M, где нуклеиновые кислоты, кодирующие ряд гуманизированных рецепторов HingeNotch в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, раскрытыми в настоящем документе, клонированы в остов pAAV-GFP (Cell Biolabs). Полученные конструкции также содержат геномную последовательность локуса B2M (амплифицированную с помощью ПЦР), фланкирующую нацеливающие последовательности gRNA.

ПРИМЕР 17

Направленное воздействие на гены

[0242] Через сорок восемь часов после инициации активации Т-клеток шарики CD3/CD28 удаляют с помощью магнита и Т-клетки трансфицируют путем электропереноса mRNA и gRNA Cas9 с использованием системы AgilePulse MAX (Harvard Apparatus). Приблизительно 3×10^6 клеток смешивают с 5 мкг Cas9 и 5 мкг gRNA в кювете диаметром 0,2 см. После электропорации клетки разбавляют культуральной средой и инкубируют при температуре 37°C, 5% CO₂. Рекombинантный донорный вектор AAV6 (производимый SignaGen) добавляют к культуре через 2-4 часа после электропорации при указанной множественности заражения (диапазон от 1×10^5 до 1×10^6). Затем отредактированные клетки культивируют в стандартных условиях (37°C и размножают в среде для роста Т-

клеток, пополняя по мере необходимости для поддержания плотности $\sim 1 \times 10^6$ клеток на мл каждые 2-3 дня).

[0243] Чтобы получить TCR-отрицательные Т-клетки, TCR-положительные Т-клетки удаляют из культуры с использованием магнитных биотин-анти-TCR $\alpha\beta$ и анти-биотиновых микробусин и колонок LS (Miltenyi Biotech). Для полногеномного картирования интеграции TRAC-1928z фракцию TCR-отрицательных клеток анализировали с использованием технологии TLA (Cergentis B.V.)

Несмотря на то, что были описаны конкретные варианты настоящего изобретения, следует понимать, что возможны различные модификации и комбинации, которые рассматриваются в пределах истинного духа и объема прилагаемой формулы изобретения. Таким образом, нет никаких намерений ограничивать точный реферат и изобретение, представленное в настоящем документе.

ССЫЛКИ

Dudani J. S., Warren A. D., and Bhatia S. N., Harnessing Protease Activity to Improve Cancer Care. *Annu. Rev. Cancer Biol.* 2018. 2:353-76.

David L. Porter, M.D., Bruce L. Levine, Ph.D., Michael Kalos, Ph.D., Adam Bagg, M.D., and Carl H. June, M.D. Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *N. Engl J Med.* 2011 Aug 25; **365**(8):725-33.

Gordon WR *et al.*, The molecular logic of Notch signaling - a structural and biochemical perspective. *J. Cell Sci.* (2008) **121**:3109-19.

Gordon WR *et al.*, Mechanical Allosterity: Evidence for a Force Requirement in the Proteolytic Activation of Notch. *Dev Cell* (2015) **33**:729-36.

Morsut L, Roybal KT, Xiong X, Gordley RM, Coyle SM, Thomson M, and Lim WA. Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors. *Cell.* 2016 February 11; **164**(4):780-91.

Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL 3rd, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs.* 2017; **31**(4):317-34.

Nasri M, Karimi A, Allahbakhshian Farsani M. Production, purification and titration of a lentivirus-based vector for gene delivery purposes. *Cytotechnology.* 2014; **66**(6):1031-38.

Roybal KT, Jasper Z. Williams, Leonardo Morsut, Levi J. Rupp, Isabel Kolinko, Joseph H. Choe, Whitney J. Walker, Krista A. McNally, and Wendell A. Lim. Engineering T cells with Customized Therapeutic Response Programs Using Synthetic Notch Receptors. *Cell.* 2016 Oct 6; **167**(2):419-32.

Samulski and Muzyczka (2014). AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annu. Rev. Virol.* **1**:427.

Sakuma, *et al.* (2012). Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem. J.* **443**:603.

Watson D.J., Wolfe J.H. Viral vectors for gene therapy: methods and protocols. Totowa, NJ, USA: Humana Press; 2003. pp. 383-404.

Vidarsson G. *et al.*, IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers Immunol.* (2014) Oct 20; **5**:520.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный полипептид, содержащий от N-конца к С-концу:

- а) внеклеточный лиганд-связывающий домен, обладающий аффинностью связывания с выбранным лигандом;
- б) шарнирный домен, способный способствовать образованию олигомера химерного полипептида посредством межмолекулярной дисульфидной связи;
- с) трансмембранный домен, содержащий один или несколько сайтов протеолитического расщепления, индуцируемых лигандом; и
- д) внутриклеточный домен, содержащий человеческий или гуманизированный эффектор транскрипции,

где связывание выбранного лиганда с внеклеточным лиганд-связывающим доменом приводит к расщеплению в индуцируемом лигандом сайте протеолитического расщепления между эффектором транскрипции и шарнирным доменом,

и где химерный полипептид не содержит повтор LIN-12-Notch (LNR) и/или домен гетеродимеризации (HD) рецептора Notch.

2. Химерный полипептид по п.1, где трансмембранный домен дополнительно содержит последовательность остановки-передачи.

3. Химерный полипептид по любому из пп.1-2, где внеклеточный домен содержит антигенсвязывающий фрагмент, способный связываться с лигандом на поверхности клетки.

4. Химерный полипептид по п.3, где клетка является патогеном.

5. Химерный полипептид по п.3, где клетка является клеткой человека.

6. Химерный полипептид по п.5, где клетка человека является опухолевой клеткой.

7. Химерный полипептид по п.5, где клетка человека представляет собой терминально дифференцированную клетку.

8. Химерный полипептид по любому из пп.1-7, где лиганд содержит белок или углевод.

9. Химерный полипептид по любому из пп.1-8, где лиганд выбран из группы, включающей CD1, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD7, CD8a, CD8b, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27, CD28, CD33, CD34, CD40, CD45, CD48, CD52, CD59, CD66, CD70, CD71, CD72, CD73, CD79A, CD79B, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD94, CD95, CD134, CD140 (PDGFR4), CD152, CD154, CD158, CD178, CD181 (CXCR1), CD182 (CXCR2), CD183 (CXCR3), CD210, CD246, CD252, CD253, CD261, CD262, CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD276 (B7H3), CD279, CD295, CD339 (JAG1), CD340 (HER2), EGFR, FGFR2, CEA, AFP, CA125, MUC-1, MAGE, щелочную фосфатазу, плацентоподобный белок 2 (ALPPL2), антиген созревания В-клеток (BCMA), зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP) и сигнальный регуляторный белок α (SIRP α).

10. Химерный полипептид по любому из пп.1-9, где лиганд выбран из рецепторов клеточной поверхности, белков адгезии, интегринов, муцинов, лектинов, опухолеассоциированных антигенов и опухолеспецифических антигенов.

11. Химерный полипептид по любому из пп.1-10, где лиганд представляет собой опухолеассоциированный антиген или опухолеспецифический антиген.

12. Химерный полипептид по любому из пп.1-11, где внеклеточный лиганд-связывающий домен содержит лиганд-связывающую часть рецептора.

13. Химерный полипептид по любому из пп.3-12, где антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, включающей антитело, нанотело, диатело, триатело, минитело, фрагмент F(ab')₂, фрагмент F(ab)_v, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), однодоменное антитело (sdAb) и его функциональный фрагмент.

14. Химерный полипептид по п.13, где антигенсвязывающий фрагмент содержит scFv.

15. Химерный полипептид по любому из пп.3-14, где антигенсвязывающий фрагмент антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с опухолеассоциированным антигеном, выбранным из группы, включающей CD19, B7H3 (CD276), BCMA (CD269), ALPPL2, CD123, CD171, CD179a, CD20, CD213A2, CD22, CD24, CD246, CD272, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD46, CD71, CD97, CEA, CLDN6, CLECL1, CS-1, EGFR, EGFRvIII, ELF2M, EpCAM, EphA2, эфрин B2, FAP, FLT3, GD2, GD3, GM3, GPRC5D, HER2 (ERBB2/neu), IGLL1, IL-11R α , KIT (CD117), MUC1, NCAM, PAP, PDGFR- β , PRSS21, PSCA, PSMA, ROR1, SIRP α , SSEA-4, TAG72, TEM1/CD248, TEM7R, TSHR, VEGFR2, ALPI, цитруллинированный виментин, cMet и Axl.

16. Химерный полипептид по п.15, где опухолеассоциированный антиген представляет собой CD19, BCMA, CEA, HER2, MUC1, CD20, ALPPL2, SIRP α или EGFR.

17. Химерный полипептид по п.16, где опухолеассоциированный антиген представляет собой CD19, BCMA, HER2 или ALPPL2.

18. Химерный полипептид по любому из пп.1-17, где один или несколько сайтов протеолитического расщепления, индуцируемых лигандом, содержит сайт расщепления γ -секретазой.

19. Химерный полипептид по любому из пп.1-18, где эффектор транскрипции содержит активатор транскрипции или репрессор транскрипции.

20. Химерный полипептид по любому из пп.1-19, где внутриклеточный домен содержит последовательность ядерной локализации.

21. Химерный полипептид по любому из пп.1-20, где эффектор транскрипции содержит: (i) ДНК-связывающий домен и (ii) эффекторный домен, через который эффектор транскрипции оказывает свое действие.

22. Химерный полипептид по п.21, где ДНК-связывающий домен связан с эффекторным доменом на N-конце.

23. Химерный полипептид по п.21, где ДНК-связывающий домен связан C-концом с эффекторным доменом.

24. Химерный полипептид по любому из пп.21-23, где ДНК-связывающий домен получен из белка гомеобокса А ядерного фактора 1 гепатоцитов человека (HNF1 α), белка гомеобокса В ядерного фактора 1 гепатоцитов человека (HNF1 β), содержащего парный

домен белка человека (Рах-6), содержащего парный домен белка человека (Рах-1), содержащего парный домен белка человека (Рах-2), содержащего парный домен белка человека (Рах-3), содержащего парный домен белка человека (Рах-4) или содержащего парный домен белка человека (Рах-7).

25. Химерный полипептид по п.24, где ДНК-связывающий домен получен из белка гомеобокса А ядерного фактора 1 гепатоцитов человека (HNF1 α) белок.

26. Химерный полипептид по п.25, где HNF1 α ДНК-связывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 или ее функциональный вариант.

27. Химерный полипептид по п.24, где ДНК-связывающий домен получен из содержащего парный домен белка человека (Рах6).

28. Химерный полипептид по п.27, где Рах6 ДНК-связывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или ее функциональный вариант.

29. Химерный полипептид по любому из пп.21-28, где эффекторный домен выбран из группы, включающей домен активации транскрипции, домен репрессора транскрипции и эпигенетический эффекторный домен.

30. Химерный полипептид по п.29, где домен активации транскрипции получен из субъединицы ядерного фактора NF κ B p65 человека (p65).

31. Химерный полипептид по п.30, где домен активации транскрипции получен из субъединицы ядерного фактора NF κ B p65 человека (p65).

32. Химерный полипептид по п.31, где эффекторный домен p65 содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 54-55 или ее функциональный вариант.

33. Химерный полипептид по любому из пп.1-32, дополнительно содержащий дополнительный сайт протеолитического расщепления, сигнальную последовательность, детектируемую метку, опухолеспецифический сайт расщепления, специфический для заболевания сайт расщепления и их комбинации.

34. Химерный полипептид по любому из пп.1-33, где шарнирный домен происходит из шарнирного домена CD8 α , шарнирного домена CD28, шарнирного домена CD152, шарнирного домена PD-1, шарнирного домена CTLA4, шарнирного домена OX40, шарнирного домена IgG1, шарнирного домена IgG2, шарнирного домена IgG3 и шарнирного домена IgG4 или функционального варианта любого из них.

35. Химерный полипептид по любому из пп.1-34, где шарнирный домен происходит из шарнирного домена CD8 α или его функционального варианта.

36. Химерный полипептид по любому из пп.1-34, где шарнирный домен получен из шарнирного домена CD28 или его функционального варианта.

37. Химерный полипептид по любому из пп.1-34, где шарнирный домен получен из шарнирного домена OX40 или его функционального варианта.

38. Химерный полипептид по любому из пп.1-34, где шарнирный домен получен из шарнирного домена IgG4 или его функционального варианта.

39. Химерный полипептид по любому из пп.1-38, где шарнирный домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 15-19.

40. Химерный полипептид по любому из пп.1-39, где последовательность остановки-переноса содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 31-51.

41. Химерный полипептид по любому из пп.1-40, где трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 21-30.

42. Химерный полипептид по любому из пп.1-41, где:

а) шарнирный домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 15-19;

б) трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21-30; и

с) домен последовательности остановки-переноса содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 31-51.

43. Химерный полипептид по любому из пп.1-42, где химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность длиной менее чем 500, менее чем 600, менее чем 700, менее чем 800 или менее чем 900 аминокислотных остатков.

44. Химерный полипептид по п.43, где химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность длиной менее чем 600 аминокислотных остатков.

45. Химерный полипептид по любому из пп.1-44, где химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 2, 4-12 и 65-66.

46. Химерный полипептид по любому из пп.1-45, где домены, указанные в пунктах (а)-(d), получены из полипептидов человека.

47. Химерный полипептид по любому из пп.1-46, где домены, указанные в пунктах (а)-(d), являются по существу неиммуногенными у человека.

48. Химерный полипептид по п.47, где внутриклеточный домен является по существу неиммуногенным для человека.

49. Рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный полипептид по пп.1-48.

50. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п.49, где нуклеотидная последовательность включена в кассету экспрессии или вектор экспрессии.

51. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п.50, где вектор экспрессии представляет собой вирусный вектор.

52. Рекombинантная нуклеиновая кислота по п.51, где вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор, аденовирусный вектор, аденоассоциированный вирусный вектор или ретровирусный вектор.

53. Рекombинантная нуклеиновая кислота по любому из пп.49-52, где рекombинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит а последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую представляющий интерес белок, функционально связанный с промотором, где экспрессия представляющего интерес белка модулируется эффектором транскрипции.

54. Рекombинантная клетка, содержащая:

а) химерный полипептид по любому из пп.1-48; и/или

б) рекombинантную нуклеиновую кислоту по любому из пп.49-52.

55. Рекombинантная клетка по п.54, где рекombинантная клетка представляет собой эукариотическую клетку.

56. Рекombинантная клетка по п.55, где эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего.

57. Рекombинантная клетка по п.56, где клетка млекопитающего представляет собой иммунную клетку, нейрон, эпителиальную клетку, и эндотелиальную клетку, или стволовую клетку.

58. Рекombинантная клетка по п.57, где иммунная клетка представляет собой В клетку, моноцит, естественную киллерную клетку, базофил, эозинофил, нейтрофил, дендритную клетку, макрофаг, регуляторную Т-клетку, хелперную Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку или другую Т-клетку.

59. Рекombинантная клетка по любому из пп.54-58, содержащая:

а) первый химерный полипептид и второй химерный полипептид по любому из пп.1-48; и/или

б) первую нуклеиновую кислоту и вторую нуклеиновую кислоту по любому из пп.49-52;

где первый химерный полипептид и второй химерный полипептид не имеют одинаковой последовательности, и/или первая нуклеиновая кислота или вторая нуклеиновая кислота не имеют одинаковой последовательности.

60. Рекombинантная клетка по п.59, где первый химерный полипептид модулирует экспрессию и/или активность второго химерного полипептида.

61. Рекombинантная клетка по любому из пп.54-60, дополнительно содержащая кассету экспрессии, кодирующую представляющий интерес белок, функционально связанную с промотором, где экспрессия представляющего интерес белка модулируется эффектором транскрипции.

62. Рекombинантная клетка по п.61, где представляющий интерес белок гетерологичен клетке.

63. Рекombинантная клетка по п.62, где промотор представляет собой промотор фосфоглицераткиназы (PGK) или промотор GAL4 дрожжей.

64. Рекомбинантная клетка по любому из пп.61-63, где представляющий интерес белок представляет собой цитокин, цитотоксин, хемокин, иммуномодулятор, проапоптотический фактор, антиапоптотический фактор, гормон, фактор дифференцировки, фактор дедифференцировки, рецептор иммунной клетки (например, TCR или CAR) или репортер.

65. Рекомбинантная клетка по любому из пп.61-64, где кассета экспрессии включена во вторую молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которая является отдельной от молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный полипептид.

66. Рекомбинантная клетка по любому из пп.61-64, где кассета экспрессии включена в ту же молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которая кодирует химерный полипептид.

67. Клеточная культура, содержащая по меньшей мере одну рекомбинантную клетку по любому из пп.54-66 и культуральную среду.

68. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и одно или несколько из следующих:

а) рекомбинантную нуклеиновую кислоту по любому из пп.49-52; и

б) рекомбинантную клетку по любому из пп.54-66.

69. Фармацевтическая композиция по п.68, где композиция содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту по любому из пп.49-53 и фармацевтически приемлемый носитель.

70. Фармацевтическая композиция по п.69, где рекомбинантная нуклеиновая кислота инкапсулирована в вирусный капсид или липидную наночастицу.

71. Способ модуляции активности клетки, включающий:

а) получение рекомбинантной клетки по любому из пп.54-66; и

б) приведение рекомбинантной клетки в контакт с выбранным лигандом, где связывание выбранного лиганда с внеклеточным лиганд-связывающим доменом индуцирует расщепление лиганд-индуцируемого сайта протеолитического расщепления и высвобождение эффектора транскрипции, где высвобожденный эффектор транскрипции модулирует активность рекомбинантной клетки.

72. Способ по п.71, где контактирование проводят *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*.

73. Способ по любому из пп.71-72, где активность модулируемой клетки выбрана из группы, включающей: экспрессию выбранного гена, пролиферацию, апоптоз, неапоптотическую гибель, дифференцировку, дедифференцировку, миграцию, секрецию молекулы, клеточную адгезию и цитолитическую активность.

74. Способ по любому из пп.71-73, где высвобожденный эффектор транскрипции модулирует экспрессию генного продукта клетки.

75. Способ по п.71-73, где высвобожденный эффектор транскрипции модулирует экспрессию продукта гетерологичного гена.

76. Способ по любому из пп.74-75, где генный продукт клетки выбран из группы, включающей хемокин, хемокиновый рецептор, рецептор химерного антигена, цитокин,

рецептор цитокина, фактор дифференцировки, фактор роста, рецептор фактора роста, гормон, метаболический фермент, белок патогенного происхождения, индуктор пролиферации, рецептор, РНК-управляемую нуклеазу, сайт-специфическую нуклеазу, Т-клеточный рецептор, токсин, белок, полученный из токсина, регулятор транскрипции, активатор транскрипции, репрессор транскрипции, регулятор трансляции, активатор трансляции, репрессор трансляции, активирующий иммунорецептор, антитело, ингибитор апоптоза, индуктор апоптоза, сконструированный Т-клеточный рецептор, иммуноактиватор, иммуноингибитор и ингибирующий иммунорецептор.

77. Способ по любому из пп.71-76, где высвобожденный эффектор транскрипции модулирует дифференцировку клетки, и где клетка представляет собой иммунную клетку, стволовую клетку, прогениторную клетку или клетку-предшественник.

78. Способ ингибирования активности клетки-мишени у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества рекомбинантных клеток по любому из пп.54-66, где рекомбинантные клетки ингибируют активность клетки-мишени у субъекта.

79. Способ по п.78, где клетка-мишень представляет собой патогенную клетку.

80. Способ по п.79, где патогенная клетка представляет собой раковую клетку.

81. Способ по п.80, где раковая клетка-мишень представляет собой клетку острого лейкоза миеломы, клетку анапластической лимфомы, клетку астроцитомы, В-клеточную раковую клетку, клетку рака молочной железы, клетку рака толстой кишки, клетку эндометриомы, клетку глиобластомы, клетку глиомы, клетку лейомиосаркомы, клетку липосаркомы, клетку рака печени, клетку рака легкого, клетку лимфомы из мантийных клеток, клетку меланомы, клетку нейробластомы, клетку немелкоклеточного рака легкого, клетку олигодендроглиомы, клетку рака яичника, клетку рака поджелудочной железы, клетку периферической Т-клеточной лимфомы, клетку рака почки, клетку саркомы, клетку рака желудка, клетку карциномы, клетку мезотелиомы или клетку саркомы.

82. Способ лечения состояния здоровья у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту первой терапии, включающей эффективное количество рекомбинантной клетки по любому из пп.54-66, где рекомбинантная клетка лечит состояние здоровья субъекта.

83. Способ по п.82, дополнительно включающий введение субъекту второй терапии.

84. Способ по п.83, где вторая терапия выбрана из группы, включающей химиотерапию, лучевую терапию, иммунотерапию, гормональную терапию, токсинотерапию и хирургию.

85. Способ по любому из пп.83-84, где первую терапию и вторую терапию вводят вместе в одной и той же композиции или в отдельных композициях.

86. Способ по п.85, где первую терапию и вторую терапию вводят одновременно.

87. Способ по любому из пп.83-84, где первую терапию и вторую терапию вводят последовательно.

88. Способ по п.88, где первую терапию вводят перед второй терапией.

89. Способ по п.88, где первую терапию проводят после второй терапии.

90. Способ по п.88, где первую терапию и вторую терапию вводят поочередно.

91. Система для модулирования активности клетки, ингибирования раковой клетки-мишени или лечения состояния здоровья у субъекта, нуждающегося в этом, где система включает одно или несколько из следующего:

- a) химерный полипептид по любому из пп.1-48;
- b) рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп.49-53;
- c) рекомбинантная клетка по любому из пп.54-66; и
- d) фармацевтическая композиция по любому из пп.68-70.

92. Способ получения рекомбинантной клетки по любому из пп.54-64, включающий:

- a) получение клетки, способной к экспрессии белка;
- b) приведение предоставленной клетки в контакт с рекомбинантной нуклеиновой кислотой по любому из пп.49-53.

93. Способ по п.92, где клетку получают путем лейкофереза, проводимого на образце, полученном от субъекта, и клетку приводят в контакт *ex vivo*.

94. Способ по п.92, где рекомбинантная нуклеиновая кислота инкапсулирована в вирусный капсид или липидную наночастицу.

95. Применение одного или нескольких из следующих средств для лечения состояния здоровья:

- a) химерный полипептид по любому из пп.1-48;
- b) рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп.49-53;
- c) рекомбинантная клетка по любому из пп.54-66; и
- d) композиция по любому из пп.68-70.

96. Применение по п.95, где состояние здоровья представляет собой рак.

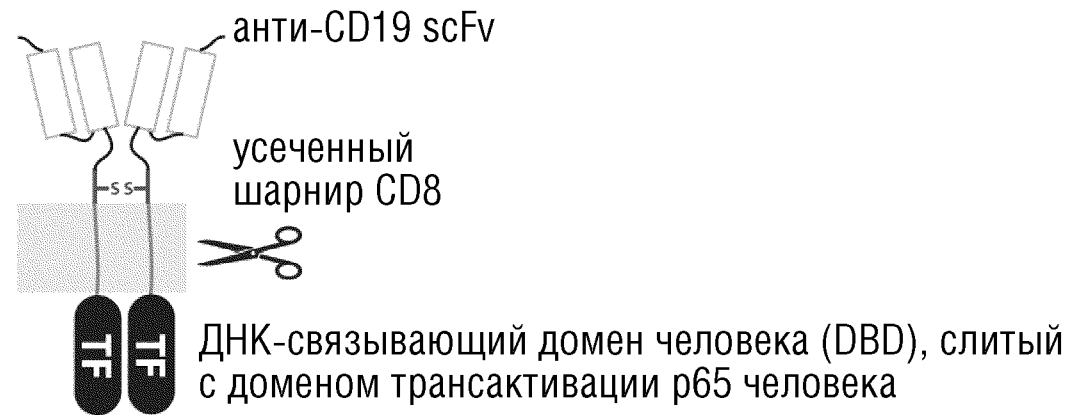
97. Применение по п.96, где рак представляет собой солидную опухоль, опухоль мягких тканей или метастатическое поражение.

98. Применение изобретения по любому из пп.1-94, для изготовления лекарственного средства для лечения заболеваний.

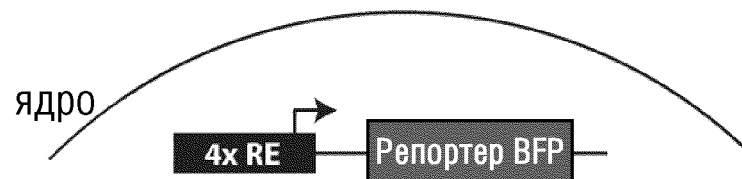
По доверенности

Гуманизированный Hinge-Notch рецептор

ФИГ.1А

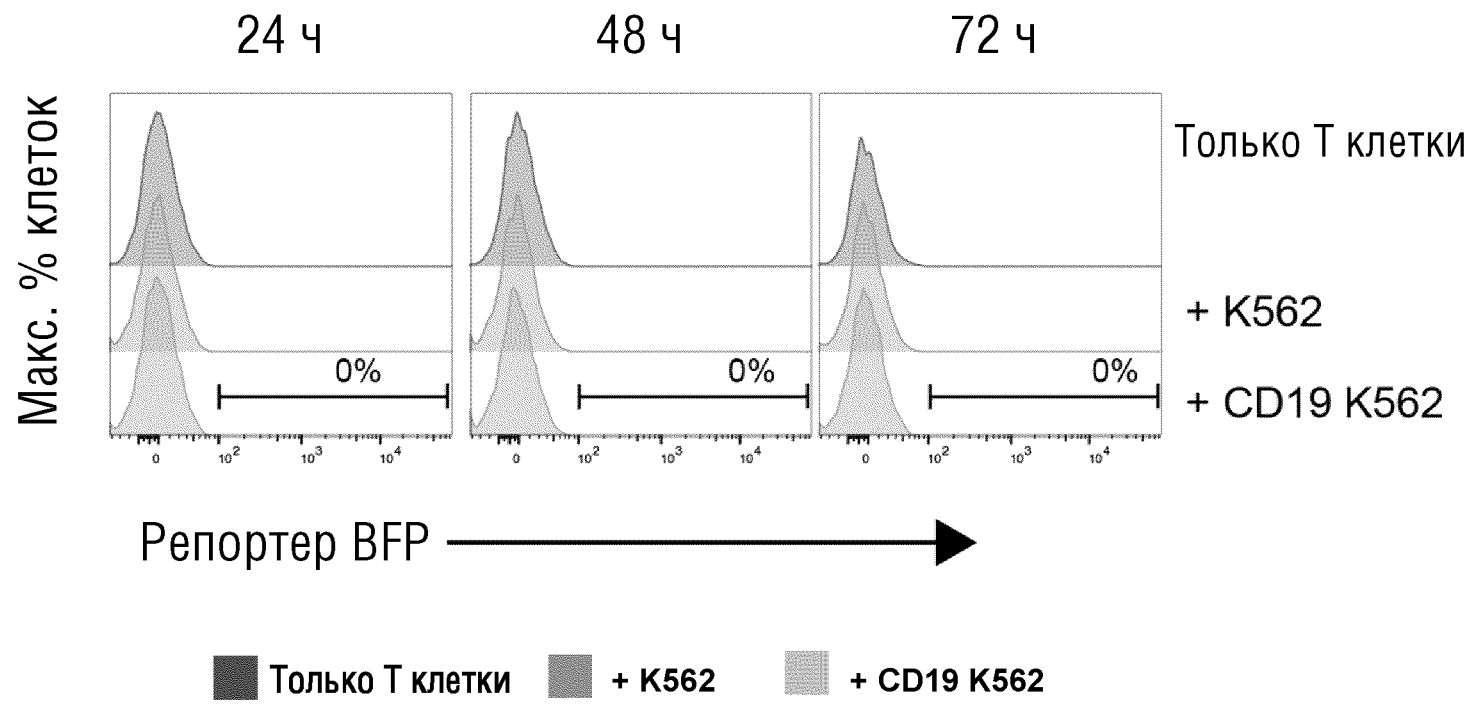


ФИГ.1В



ФИГ.2

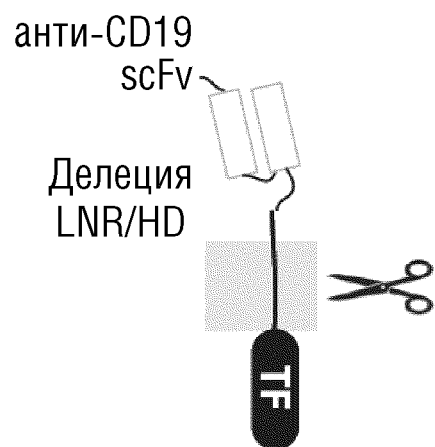
Профиль активации
Первичные Т-клетки CD4 человека
Ответный элемент 4X HNF1A без рецептора



ФИГ.3А

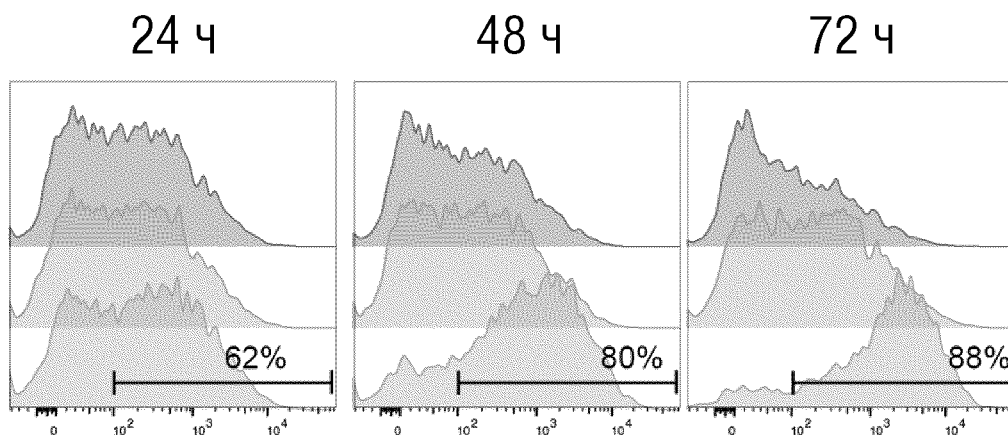
ФИГ.3В

Профиль активации Гуманизированный MiniNotch (HNF1A) pRay239



Человеческий HNF 1α DBD
Человеческий p65

Макс. % клеток



Только Т клетки
+ K562
+ CD19 K562

3/17

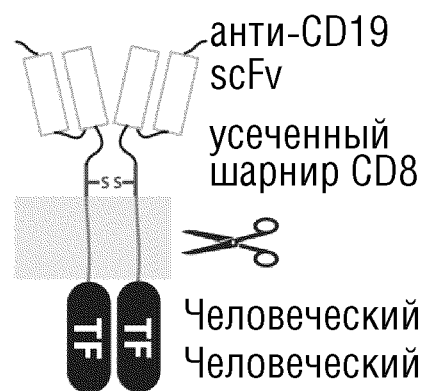
Репортер BFP

Только Т клетки + K562 + CD19 K562

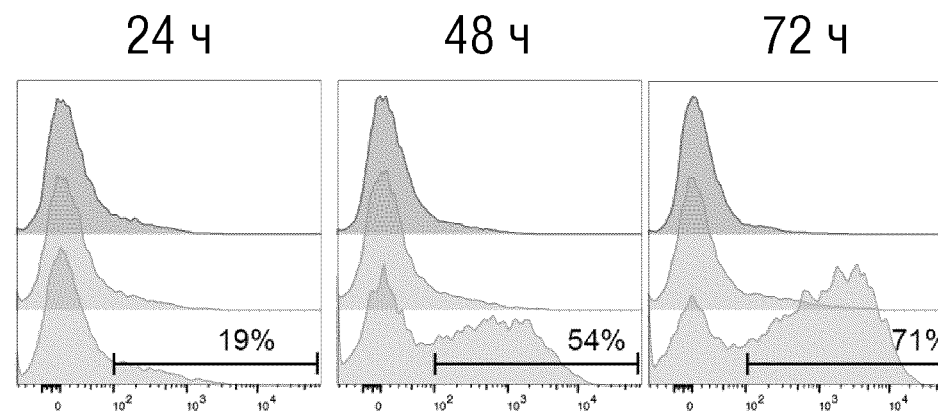
ФИГ.4А

ФИГ.4В

Профиль активации Гуманизированный HingeNotch (HNF1A) pRay240



Макс. % клеток



Только Т клетки

+ K562

+ CD19 K562

Репортер BFP

Только Т клетки

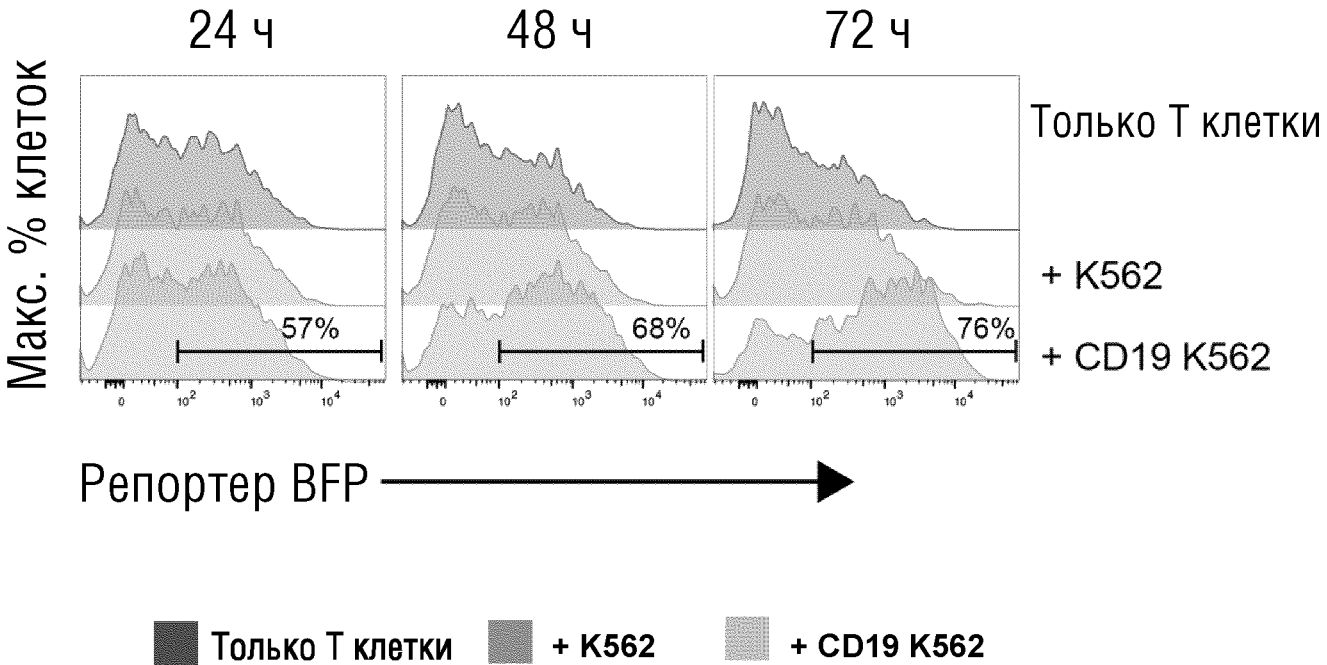
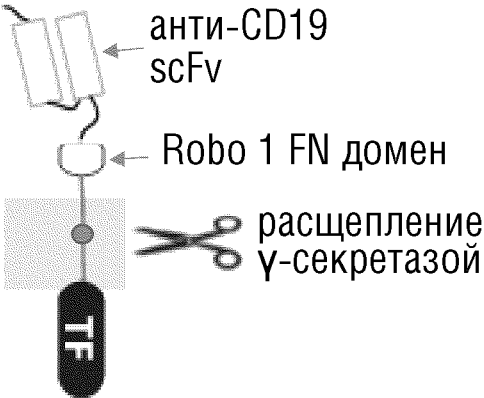
+ K562

+ CD19 K562

ФИГ.5А

ФИГ.5В

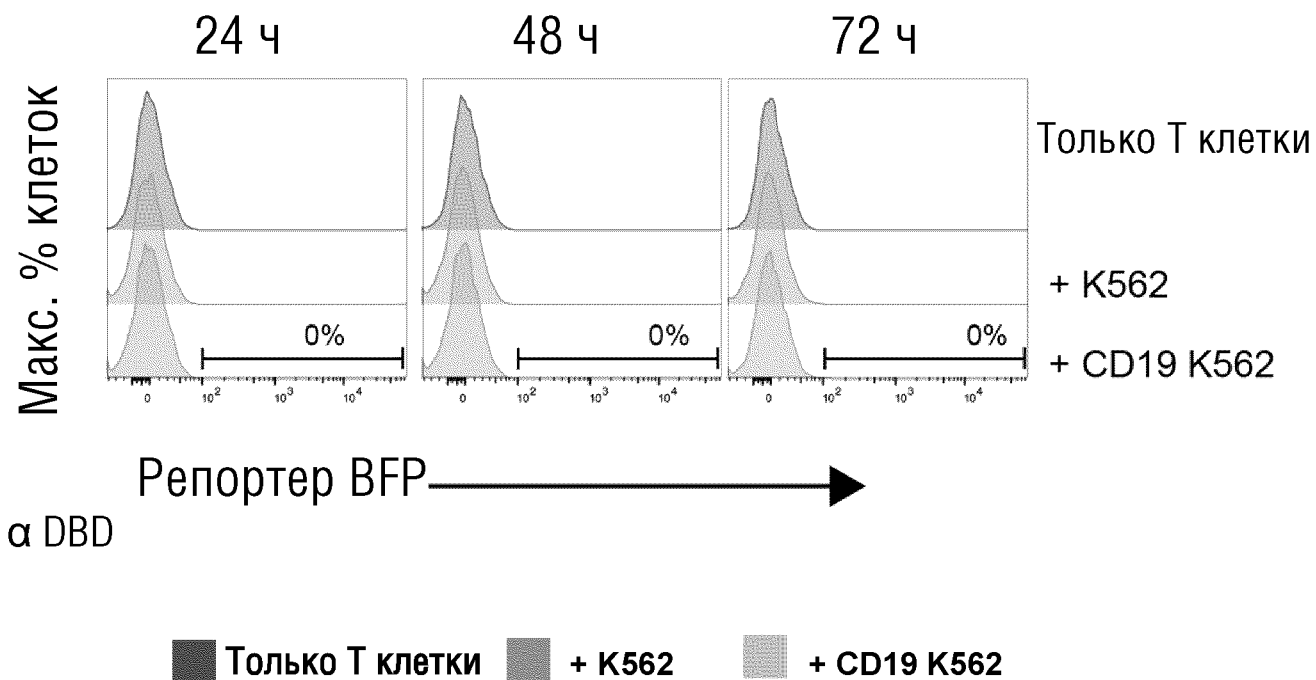
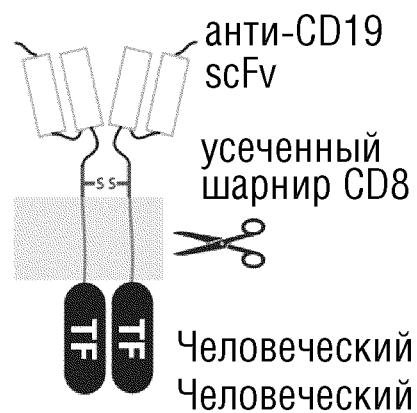
Профиль активации
Гуманизированный RoboNotch (HNF1A) pRay241



ФИГ.6А

ФИГ.6В

Профиль активации
Гуманизированный HingeNotch (HNF1A) pRay242
Перевернутый домен трансаактивации

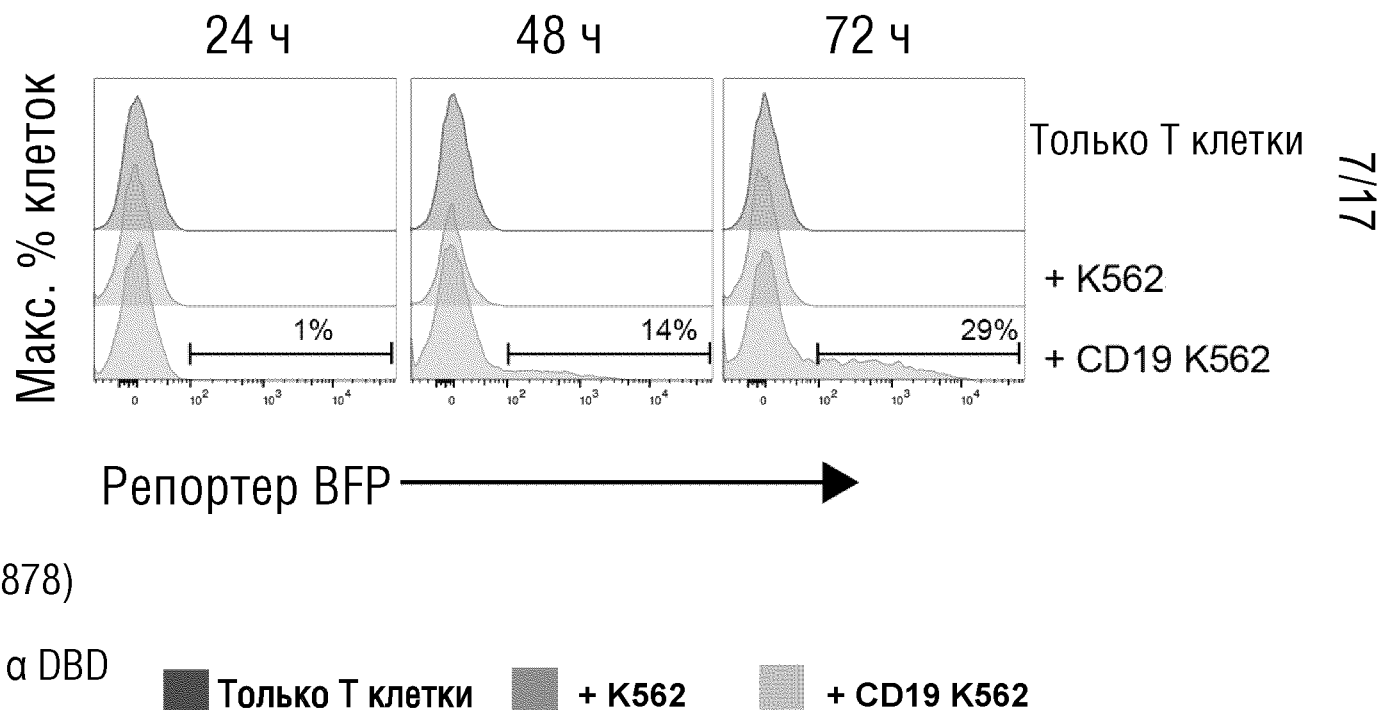
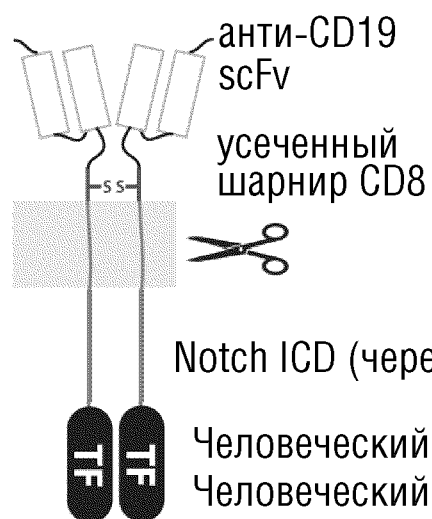


6/17

ФИГ.7А

ФИГ.7В

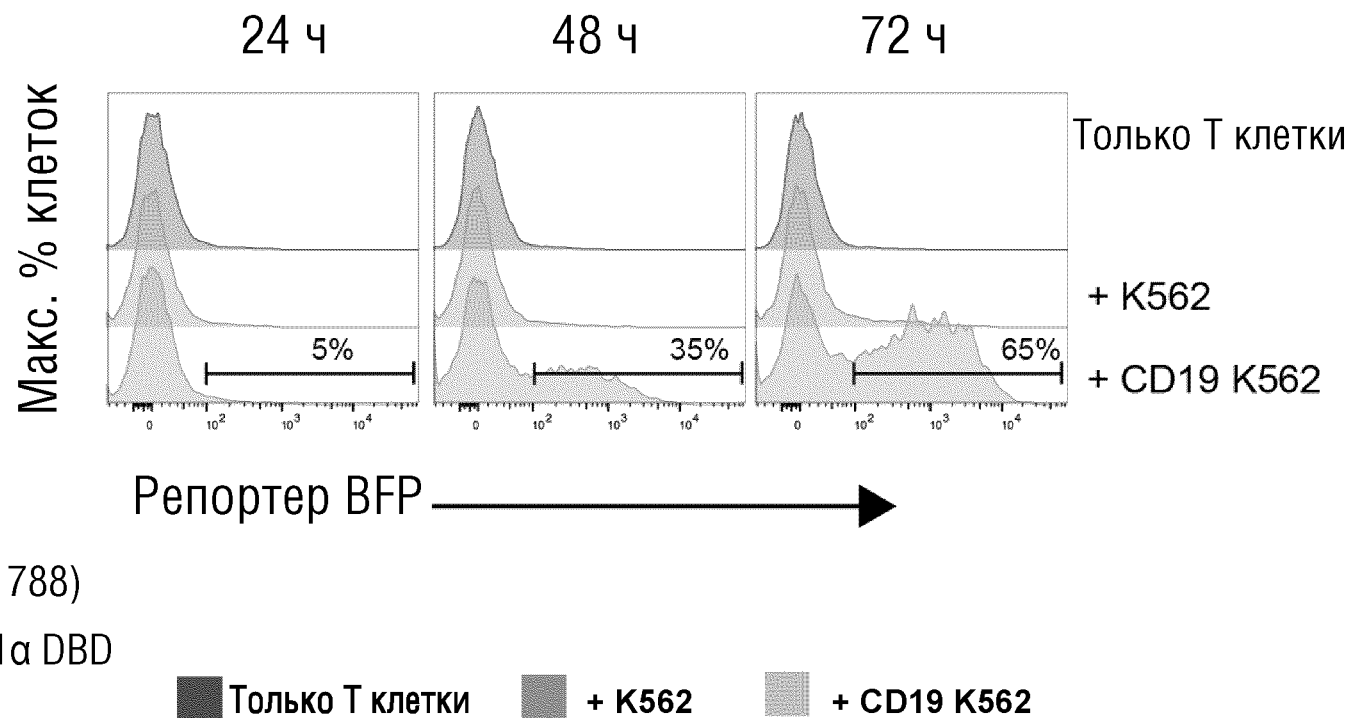
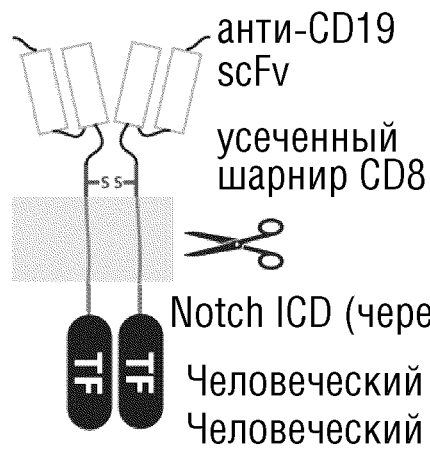
Профиль активации Вариант pRay243 гуманизированного HingeNotch (HNF1A) Notch1



ФИГ.8А

ФИГ.8В

Профиль активации
Вариант pRay244 гуманизированного HingeNotch (HNF1A) Notch1

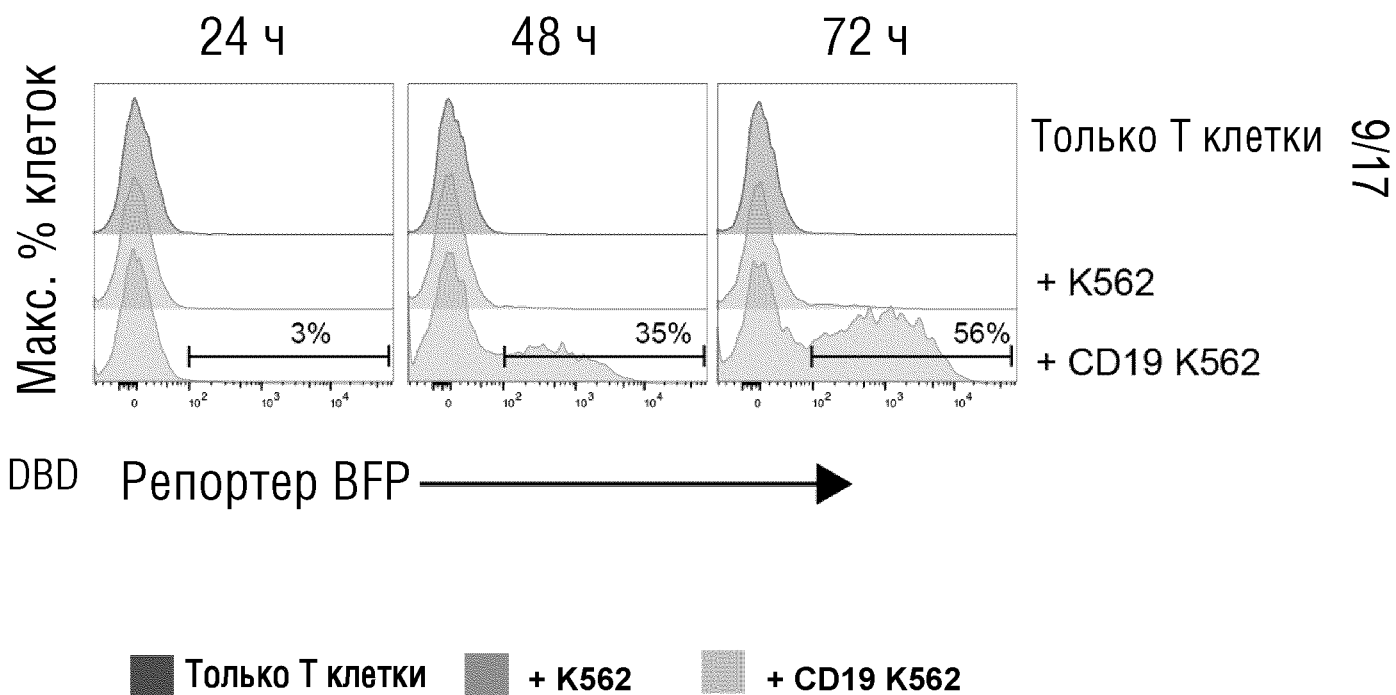
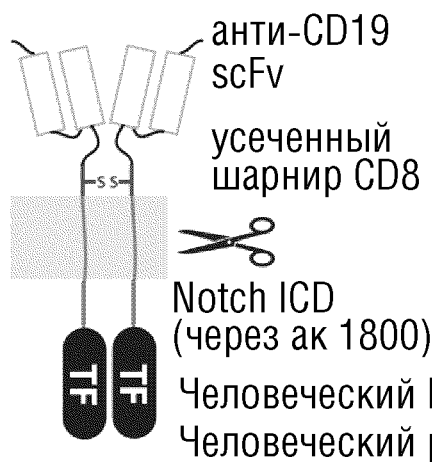


8/17

ФИГ.9А

ФИГ.9В

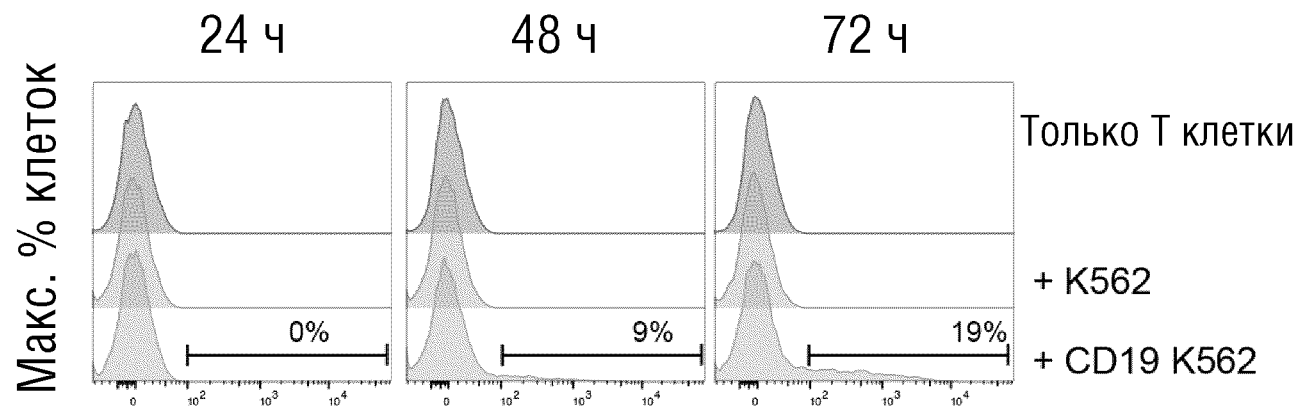
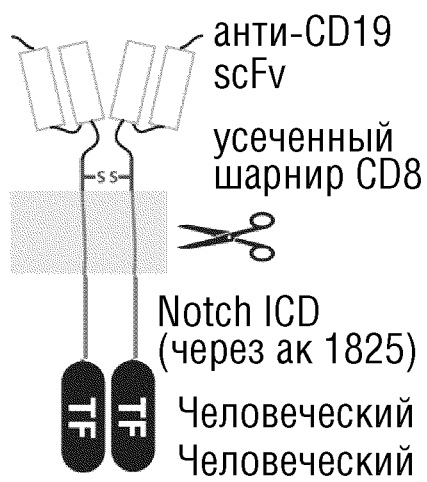
Профиль активации
Вариант pRay250 гуманизированного HingeNotch (HNF1A) Notch1



ФИГ.10А

ФИГ.10В

Профиль активации
Вариант pRay251 гуманизованного HingeNotch (HNF1A) Notch1



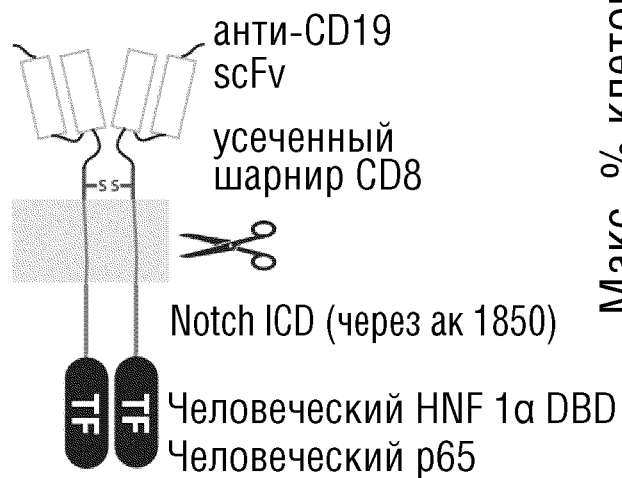
Репортер BFP →

Только Т клетки + K562 + CD19 K562

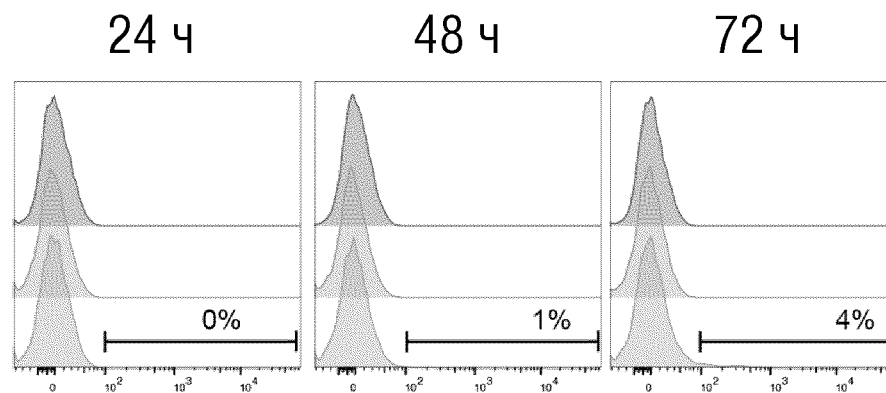
ФИГ.11А

ФИГ.11В

Профиль активации Вариант pRay252 гуманизированного HingeNotch (HNF1A) Notch1



Макс. % клеток



Только Т клетки

+ K562

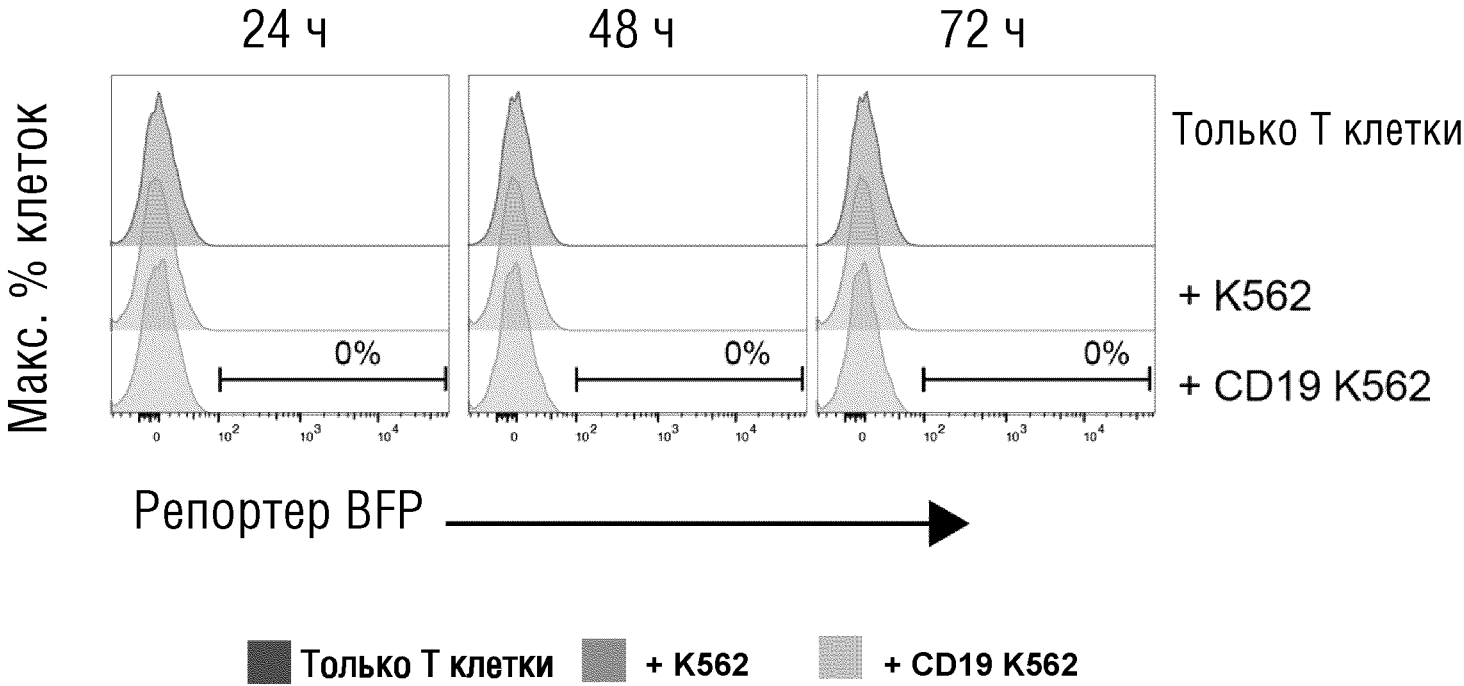
+ CD19 K562

11/17

Репортер BFP →

Только Т клетки + K562 + CD19 K562

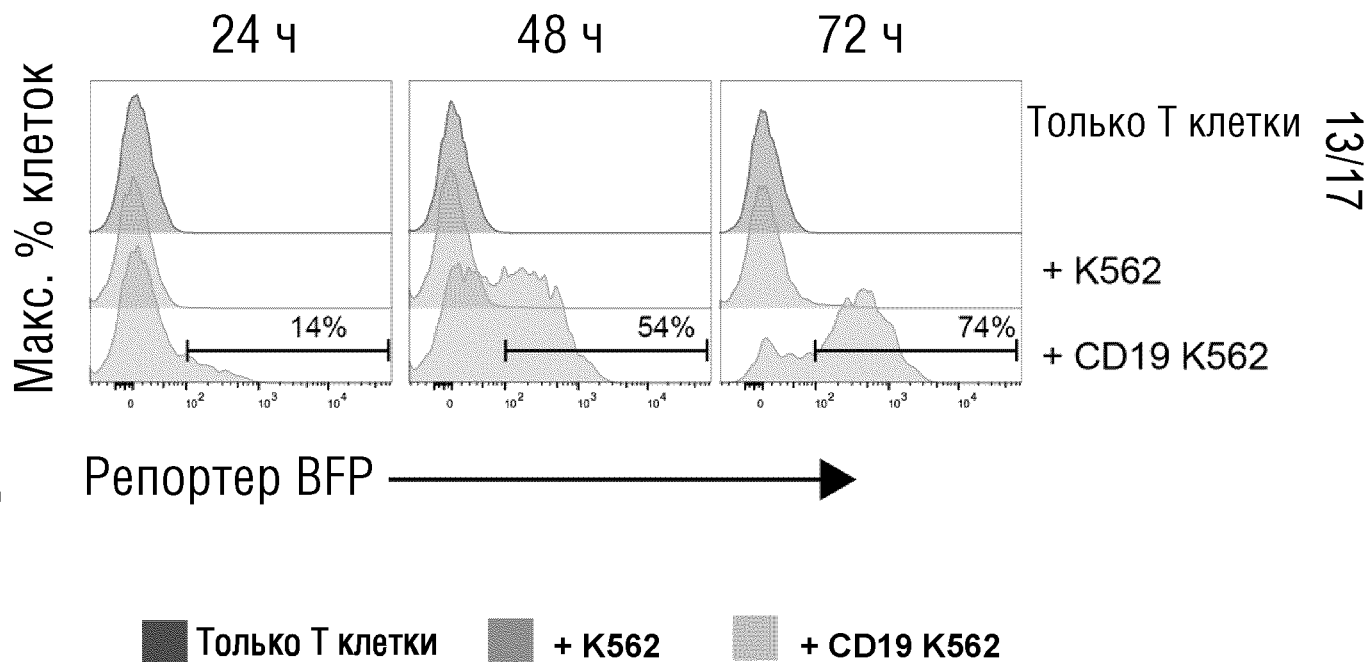
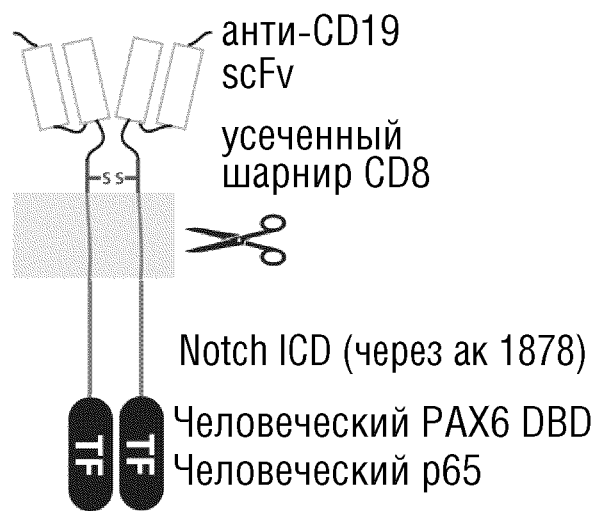
Профиль активации
Первичные Т-клетки CD4 человека
Ответный элемент 4X PAX6 без рецептора



ФИГ.13А

ФИГ.13В

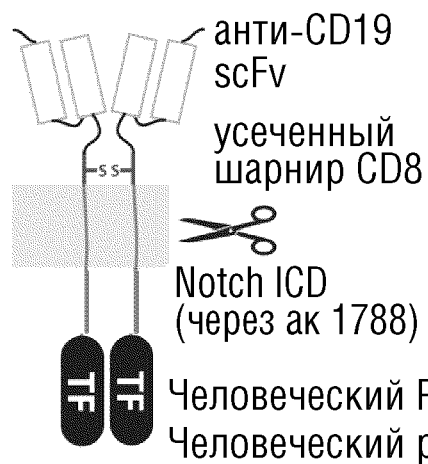
Профиль активации
Вариант pRay253 гуманизированного HingeNotch (PAX6) Notch1



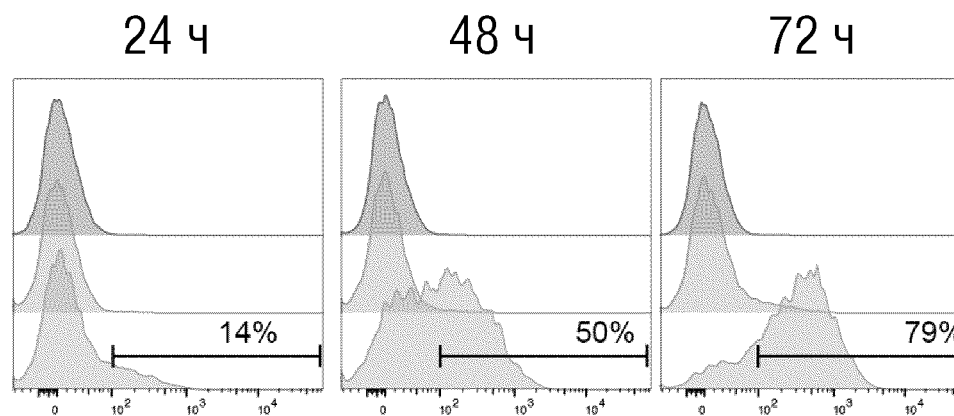
ФИГ.14А

ФИГ.14В

Профиль активации Вариант pRay254 гуманизированного HingeNotch (PAX6) Notch1



Макс. % клеток



Репортер BFP

Только Т клетки + K562 + CD19 K562

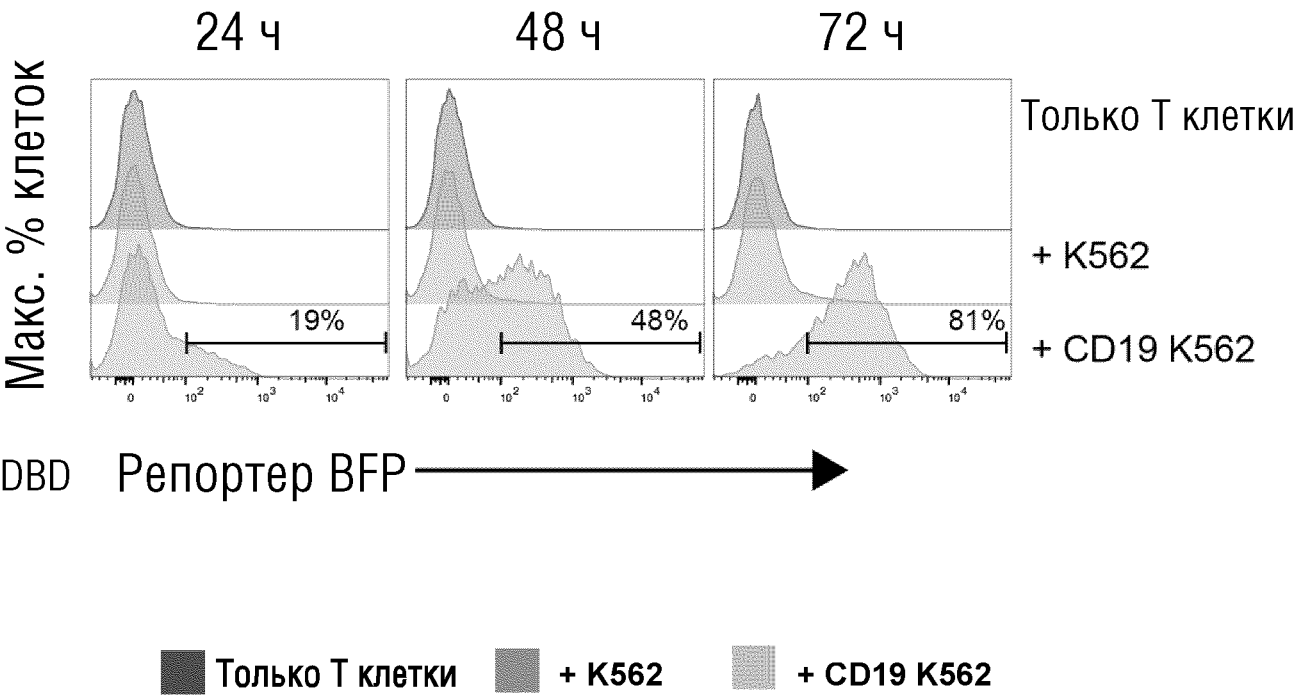
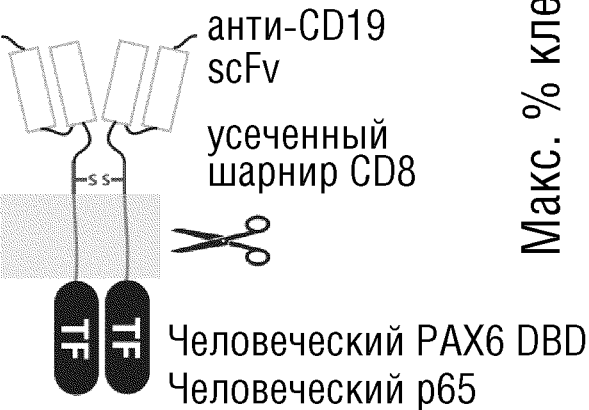
Только Т клетки
+ K562
+ CD19 K562

14/17

ФИГ.15А

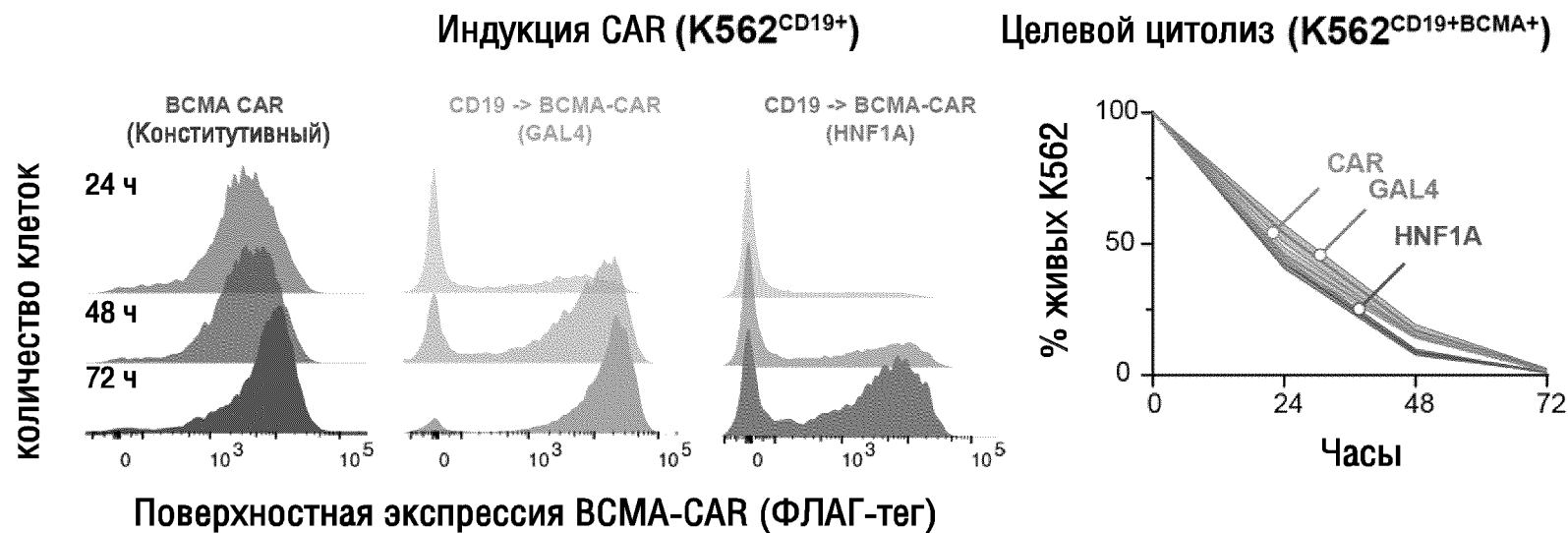
ФИГ.15В

Профиль активации
Гуманизированный HingeNotch (PAX6) pRay255

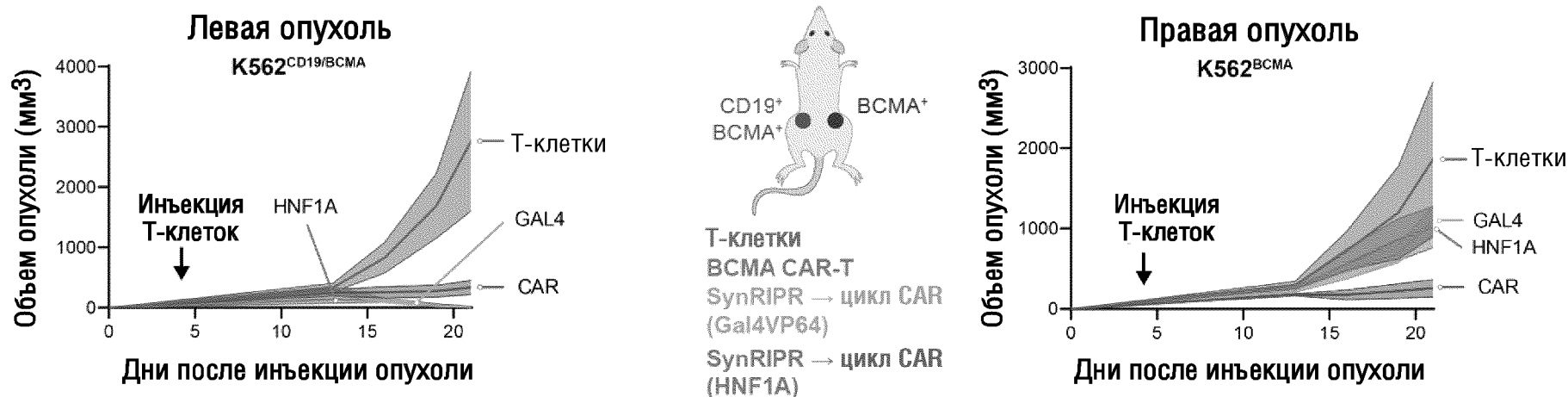


ФИГ.16А

BCMA-CAR цикл гуманизированного примированного CD19



ФИГ.16В



ФИГ.17

Профиль активации
Гуманизированный HingeNotch (PAX6) - одновекторные схемы

72 часа

