

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043737**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.19

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201990543

(22) Дата подачи заявки
2017.10.06

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ С ПОМОЩЬЮ ГИБРИДНЫХ БЕЛКОВ

(31) 62/405,551; 62/510,108

(32) 2016.10.07; 2017.05.23

(33) US

(43) 2020.01.09

(86) PCT/US2017/055628

(87) WO 2018/067993 2018.04.12

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ТСР2 ТЕРАПЬЮТИКС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Баеурле Патрик, Шецкевич Грегори,
Хофмейстер Роберт (US)**

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

(56) WO-A2-2013063419

EP-A1-2258719

WO-A1-2016187349

Baeuerle P.: "A058/TRuC-T Cells Targeting CD19 or Mesothelin Demonstrate Superior Antitumor Activity in Preclinical Models Compared to CAR-T Cells (Poster session)", THIRD CRI-CIMT-EATI-AACR INTERNATIONAL CANCER IMMUNOTHERAPY CONFERENCE, 7 September 2017 (2017-09-07), page 60, XP002777097, Retrieved from the Internet: URL:https://staticl.squarespace.com/static/56dee71e555986fb3ae583e2/t/59ad08b1b8a79b086c865d6c/1504512189107/CIMT_Abstracts_170904.pdf, [retrieved on 2018-01-09], the whole document

Lee Eun-A: "Solid-state target CAR-T, 'TRUC platform' (KR)", Biol.co.kr, 21 September 2017 (2017-09-21), XP002777098, Retrieved from the Internet: URL:http://www.biospectator.com/view/news_print.php?varAtclId=4037, [retrieved on 2018-01-09], the whole document

(57) В изобретении предлагаются гибридные белки (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), Т-клетки, сконструированные с возможностью экспрессии одного или более TFP, а также способы их использования для лечения заболеваний, включая рак.

043737
B1

043737
B1

Перекрестная ссылка

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/405 551, поданной 7 октября 2016 г., и по предварительной заявке на патент США № 62/510 108, поданной 23 мая 2017 г., каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Уровень техники

Большинство пациентов с солидными опухолями на поздних стадиях не поддаются лечению с помощью стандартной терапии. Кроме того, традиционные методы лечения часто имеют серьезные побочные эффекты. Были предприняты многочисленные попытки с целью задействовать иммунную систему пациента для отторжения раковых клеток - такой подход коллективно именуется иммунотерапией рака. Однако из-за некоторых препятствий достижение клинической эффективности становится достаточно трудным. Несмотря на то что были выявлены сотни так называемых опухолевых антигенов, они часто являются своими и поэтому могут направить действие иммунотерапии рака против здоровых тканей, или же они являются слабо иммуногенными. Более того, раковые клетки используют множество механизмов для того, чтобы стать невидимыми или враждебными к инициации и распространению иммунной атаки при иммунотерапии рака.

Недавние разработки, которые используют терапию на основе аутологических Т-клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами (CAR), которая основывается на перенаправлении генетически сконструированных Т-клеток к подходящей молекуле клеточной поверхности на раковых клетках, демонстрируют обещающие результаты с точки зрения использования возможностей иммунной системы для лечения В-клеточных злокачественных опухолей (см., например, Sadelain et al., *Cancer Discovery* 3:388-398 (2013)). Клинические результаты для CAR-Т-клеток, специфических к CD-19 (которые называются CTL019), продемонстрировали полную ремиссию у пациентов, страдающих от хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), а также у детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) (см., например, Kalos et al., *Sci Transl Med* 3:95ra73 (2011), Porter et al., *NEJM* 365:725-733 (2011), Grupp et al., *NEJM* 368:1509-1518 (2013)). Альтернативный подход заключается в использовании альфа- и бета-цепей Т-клеточного рецептора (TCR), выбранных для ассоциированного с опухолью пептидного антигена для генетически сконструированных аутологических Т-клеток. Такие цепи TCR будут образовывать полные комплексы TCR и обеспечивать Т-клетки TCR для второй определенной специфичности. Обнадеживающие результаты были получены для сконструированных аутологических Т-клеток, экспрессирующих альфа- и бета-цепи TCR, специфические к NY-ESO-1, у пациентов с синовиальной карциномой.

Помимо способности генетически модифицированных Т-клеток, экспрессирующих CAR или второй TCR, распознавать и уничтожать соответствующие клетки-мишени *in vitro/ex vivo*, успешная терапия для пациента с использованием сконструированных Т-клеток предполагает способность Т-клеток к сильной активации, размножению, стойкости с течением времени, а в случае рецидива заболевания - к обеспечению вторичного ответа. Высокая и контролируемая клиническая эффективность CAR-Т-клеток на текущий момент ограничена ВСМА- и CD-19-положительными В-клеточными злокачественными опухолями и пациентами, экспрессирующими HLA-A2, с экспрессирующими NY-ESO-1-пептид синовиальными саркомами. Существует очевидная потребность в улучшении генетически сконструированных Т-клеток для более широкого действия против различных злокачественных опухолей у человека. В настоящем документе описаны новые гибридные белки субъединиц TCR, включая CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, а также альфа- и бета-цепей TCR со связывающими доменами, специфическими к антигенам клеточной поверхности, которые могут потенциально преодолеть ограничения существующих подходов. В настоящем документе описаны новые гибридные белки, которые по сравнению с CAR более эффективно уничтожают клетки-мишени, однако высвобождают сравнительные или более низкие уровни провоспалительных цитокинов. Эти гибридные белки и способы их использования представляют собой преимущество гибридных белков Т-клеточного рецептора (TCR) (TFP) перед CAR, поскольку повышенные уровни таких цитокинов связаны с дозозамещающей токсичностью адаптивной CAR-Т терапии.

Сущность изобретения

В настоящем документе предлагаются гибридные белки (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), Т-клетки, сконструированные с возможностью экспрессировать один или более TFP, а также способы их использования для лечения заболеваний.

В одном аспекте в настоящем документе предлагается выделенная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR и домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий связывающий домен против мезотелина.

В одном аспекте в настоящем документе предлагается выделенная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR, содержащую по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон; и домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, причем субъединица TCR и домен антитела функционально соединены, и при этом TFP внедряется в TCR

при экспрессии в Т-клетке.

В одном аспекте в настоящем документе предлагается выделенная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR, содержащую по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 гамма; и домен человеческого или гуманизованного антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, причем субъединица TCR и домен антитела функционально соединены, и при этом TFP внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке. В одном аспекте в настоящем документе предлагается выделенная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR, содержащую по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 дельта; и домен человеческого или гуманизованного антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, причем субъединица TCR и домен антитела функционально соединены, и при этом TFP внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке. В одном аспекте в настоящем документе предлагается выделенная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR, содержащую по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена TCR альфа; и домен человеческого или гуманизованного антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, причем субъединица TCR и домен антитела функционально соединены, и при этом TFP внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке. В одном аспекте в настоящем документе предлагается выделенная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR, содержащую по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена TCR бета; и домен человеческого или гуманизованного антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, причем субъединица TCR и домен антитела функционально соединены, и при этом TFP внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке. В одном аспекте в настоящем документе предлагается выделенная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR и домен человеческого или гуманизованного антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, который представляет собой связывающий домен против мезотелина.

В некоторых случаях субъединица TCR и домен антитела функционально соединены. В некоторых случаях TFP внедряется в TCR при экспрессии в Т-клетке. В некоторых случаях кодируемый антигенсвязывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В некоторых случаях кодируемая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 1 до 4. В некоторых случаях субъединица TCR содержит внеклеточный домен TCR. В некоторых случаях субъединица TCR содержит трансмембранный домен TCR. В некоторых случаях субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR. В некоторых случаях субъединица TCR содержит (i) внеклеточный домен TCR, (ii) трансмембранный домен TCR и (iii) внутриклеточный домен TCR, причем по меньшей мере два из (i), (ii) и (iii) относятся к одной субъединице TCR. В некоторых случаях субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен, выбранный из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, или аминокислотную последовательность, имеющую к тому же по меньшей мере одну, две или три модификации. В некоторых случаях субъединица TCR содержит внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен, выбранный из функционального сигнального домена 4-1BB и/или функционального сигнального домена CD3 дзета, или аминокислотную последовательность, имеющую к тому же по меньшей мере одну модификацию. В некоторых случаях домен человеческого или гуманизованного антитела содержит фрагмент антитела. В некоторых случаях домен человеческого или гуманизованного антитела содержит scFv или домен V_H . В некоторых случаях выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует (i) CDR1 легкой цепи (LC), CDR2 LC и CDR3 LC аминокислотной последовательности связывающего домена легкой цепи против мезотелина с 70-100% идентичности последовательности с CDR1 легкой цепи (LC), CDR2 LC и CDR3 LC связывающего домена легкой цепи против мезотелина, представленного в настоящем документе, соответственно, и/или (ii) CDR1 тяжелой цепи (HC), CDR2 HC и CDR3 HC аминокислотной последовательности связывающего домена тяжелой цепи против мезотелина с 70-100% идентичности последовательности с CDR1 тяжелой цепи (HC), CDR2 HC и CDR3 HC связывающего домена тяжелой цепи против мезотелина, представленного в настоящем документе, соответственно. В некоторых случаях выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует переменный участок легкой цепи, причем переменный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи для переменного участка легкой цепи, представленного в настоящем документе, или последовательность с 95-99% идентичности с аминокислотной последовательностью переменного участка легкой цепи для переменного участка легкой цепи, представленного в настоящем документе. В некоторых случаях выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует переменный участок тяжелой цепи, причем varia-

белый участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций аминокислотной последовательности вариабельного участка тяжелой цепи для вариабельного участка тяжелой цепи, представленного в настоящем документе, или последовательность с 95-99% идентичности с аминокислотной последовательностью вариабельного участка тяжелой цепи для вариабельного участка тяжелой цепи, представленного в настоящем документе. В некоторых случаях TFP включает в себя внеклеточный домен субъединицы TCR, который содержит внеклеточный домен или его часть, белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях кодируемый TFP включает в себя трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях кодируемый TFP включает в себя трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, дзета-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, CD45, CD2, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях выделенная молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность, кодирующую костимулирующий домен. В некоторых случаях костимулирующий домен является функциональным сигнальным доменом, полученным из белка, выбранного из группы, которая состоит из DAP10, DAP12, CD30, LIGHT, OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137), а также их аминокислотных последовательностей, имеющих к тому же по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях выделенная молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит лидерную последовательность. В некоторых случаях выделенная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой мРНК.

В некоторых случаях TFP включает в себя иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) субъединицы TCR, который содержит ITAM или его часть белка, выбранного из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, дзета-цепи TCR, цепи Fc-эпсилон-рецептора 1, цепи Fc-эпсилон-рецептора 2, цепи Fc-гамма-рецептора 1, цепи Fc-гамма-рецептора 2a, цепи Fc-гамма-рецептора 2b1, цепи Fc-гамма-рецептора 2b2, цепи Fc-гамма-рецептора 3a, цепи Fc-гамма-рецептора 3b, цепи Fc-бета-рецептора 1, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих к тому же по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях ITAM замещает ITAM CD3 гамма, CD3 дельта или CD3 эпсилон. В некоторых случаях ITAM выбирается из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта, и замещает другой ITAM, выбранный из группы, состоящей из субъединицы TCR CD3 дзета, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта. В некоторых случаях нуклеиновая кислота содержит нуклеотидный аналог. В некоторых случаях нуклеотидный аналог выбирается из группы, состоящей из 2'-О-метила, 2'-О-метоксиэтила (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропила, 2'-дезоксидезокси-2'-фтор, 2'-О-аминопропила (2'-О-АП), 2'-О-диметиламиноэтила (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропила (2'-О-DMAP), Т-О-диметиламиноэтилоксиэтила (2-О-DMAEOE), модифицированного 2-О-N-метилацетида (2-О-NMA), закрытой нуклеиновой кислоты (ЗНК), этиленнуклеиновой кислоты (ЭНК), пептидо-нуклеиновой кислоты (ПНК), 1,5-ангидрогекситоловой нуклеиновой кислоты (АНК), морфолино, метилфосфонатного нуклеотида, тиолфосфонатного нуклеотида и 2'-фтор N3-P5'-фосфорамидита. В одном аспекте в настоящем документе предлагается выделенная полипептидная молекула, кодируемая молекулой нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе. В одном аспекте в настоящем документе предлагается выделенная молекула TFP, содержащая человеческий или гуманизированный связывающий домен против мезотелина, внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. В одном аспекте в настоящем документе предлагается выделенная молекула TFP, содержащая человеческий или гуманизированный связывающий домен против мезотелина, внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR.

В некоторых вариантах осуществления домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, который представляет собой связывающий домен против мезотелина, кодируемый нуклеиновой кислотой, или антитело, содержащее связывающий домен против мезотелина, или клетку, экспрессирующую связывающий домен против мезотелина, кодируемый нуклеиновой кислотой, имеет значение аффинности максимум около 200 нМ, 100 нМ, 75 нМ, а 50 нМ, 25 нМ,

20 нМ, 15 нМ, 14 нМ, 13 нМ, 12 нМ, 11 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0.9 нМ, 0.8 нМ, 0.7 нМ, 0.6 нМ, 0.5 нМ, 0.4 нМ, 0.3 нМ, 0.2 нМ, 0.1 нМ, 0.09 нМ, 0.08 нМ, 0.07 нМ, 0.06 нМ, 0.05 нМ, 0.04 нМ, 0.03 нМ, 0.02 нМ или 0.01 нМ; и/или по меньшей мере около 100 нМ, 75 нМ, а 50 нМ, 25 нМ, 20 нМ, 15 нМ, 14 нМ, 13 нМ, 12 нМ, 11 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0.9 нМ, 0.8 нМ, 0.7 нМ, 0.6 нМ, 0.5 нМ, 0.4 нМ, 0.3 нМ, 0.2 нМ, 0.1 нМ, 0.09 нМ, 0.08 нМ, 0.07 нМ, 0.06 нМ, 0.05 нМ, 0.04 нМ, 0.03 нМ, 0.02 нМ или 0.01 нМ; и/или около 200 нМ, 100 нМ, 75 нМ, а 50 нМ, 25 нМ, 20 нМ, 15 нМ, 14 нМ, 13 нМ, 12 нМ, 11 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0.9 нМ, 0.8 нМ, 0.7 нМ, 0.6 нМ, 0.5 нМ, 0.4 нМ, 0.3 нМ, 0.2 нМ, 0.1 нМ, 0.09 нМ, 0.08 нМ, 0.07 нМ, 0.06 нМ, 0.05 нМ, 0.04 нМ, 0.03 нМ, 0.02 нМ или 0.01 нМ.

В одном аспекте в настоящем документе предлагается выделенная молекула TFP, содержащая человеческий или гуманизированный связывающий домен против мезотелина, внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем молекула TFP способна к функциональной интеграции в эндогенный комплекс TCR. В некоторых случаях выделенная молекула TFP содержит антитело или фрагмент антитела, содержащие человеческий или гуманизированный связывающий домен против мезотелина, внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. В некоторых случаях связывающий домен против мезотелина представляет собой scFv, домен V_H или домен верблюдовых V_{HH} . В некоторых случаях связывающий домен против мезотелина содержит тяжелую цепь с 95-100% идентичности с аминокислотной последовательностью тяжелой цепи, представленной в настоящем документе, ее функциональный фрагмент или ее аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций. В некоторых случаях связывающий домен против мезотелина содержит легкую цепь с 95-100% идентичности с аминокислотной последовательностью легкой цепи, представленной в настоящем документе, ее функциональный фрагмент или ее аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций. В некоторых случаях выделенная молекула TFP содержит внеклеточный домен TCR, который содержит внеклеточный домен или его часть, белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма, субъединицы TCR CD3 дельта, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях связывающий домен против мезотелина соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В некоторых случаях линкерная область содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 4.

В некоторых случаях выделенная молекула TFP дополнительно содержит последовательность, кодирующую костимулирующий домен. В некоторых случаях выделенная молекула TFP дополнительно содержит последовательность, кодирующую внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых случаях выделенная молекула TFP дополнительно содержит лидерную последовательность.

В одном аспекте в настоящем документе предлагается вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP, представленный в настоящем документе. В некоторых случаях вектор выбирается из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, вектора вируса саркомы Рауса (BCP) или ретровирусного вектора. В некоторых случаях вектор дополнительно содержит промотор. В некоторых случаях вектор представляет собой транскрибированный *in vitro* вектор. В некоторых случаях последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит poly(A)-хвост. В некоторых случаях последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит 3' нетранслируемую область (3'UTR).

В одном аспекте в настоящем документе предлагается клетка, содержащая вектор, представленный в настоящем документе. В некоторых случаях клетка представляет собой человеческую Т-клетку. В некоторых случаях Т-клетка представляет собой $CD8^+$ или $CD4^+$ Т-клетку. В некоторых случаях Т-клетка представляет собой гамма-дельта Т-клетку. В некоторых случаях Т-клетка представляет собой NK-Т-клетку. В некоторых случаях клетка дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанной со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена. В некоторых случаях ингибирующая молекула содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть PD1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и домен первичной сигнализации.

В одном аспекте в настоящем документе предлагается человеческая $CD8^+$ или $CD4^+$ Т-клетка, содержащая по меньшей мере две молекулы TFP, содержащие человеческий или гуманизированный связывающий домен против мезотелина, внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR в человеческой $CD8^+$ или $CD4^+$ Т-клетке, на ней и/или на ее поверхности.

В одном аспекте в настоящем документе предлагается белковый комплекс, содержащий: молекулу TFP, содержащую человеческий или гуманизированный связывающий домен против мезотелина, внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен и внутриклеточный домен; а также по меньшей мере один эндогенный комплекс TCR.

В некоторых случаях TCR содержит внеклеточный домен или его часть, белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы TCR CD3 эпсилон, субъединицы TCR CD3 гамма и субъединицы TCR CD3 дельта. В некоторых случаях связывающий домен против мезотелина соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В некоторых случаях линкерная область содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 1 до 4.

В одном аспекте в настоящем документе предлагается человеческая $CD8^+$ или $CD4^+$ Т-клетка, содержащая по меньшей мере два разных белка TFP на белковый комплекс, представленный в настоящем документе.

В одном аспекте в настоящем документе предлагается способ создания клетки, включающий в себя трансдукцию Т-клетки с помощью вектора, представленного в настоящем документе.

В одном аспекте в настоящем документе предлагается способ получения популяции клеток, содержащих сконструированные РНК, включающий в себя введение транскрибированной *in vitro* РНК или синтетической РНК в клетку, причем РНК содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу TFP, представленную в настоящем документе.

В одном аспекте в настоящем документе предлагается способ обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, включающий в себя введение млекопитающему эффективного количества клетки, экспрессирующей молекулу TFP, представленную в настоящем документе, или экспрессирующей полипептидную молекулу, представленную в настоящем документе.

В некоторых случаях клетка представляет собой аутологическую Т-клетку. В некоторых случаях клетка представляет собой аллогенную Т-клетку. В некоторых случаях млекопитающее является человеком.

В одном аспекте в настоящем документе предлагается способ лечения млекопитающего с заболеванием, связанным с экспрессией мезотелина, включающий в себя введение млекопитающему эффективного количества молекулы TFP, представленной в настоящем документе, клетки, представленной в настоящем документе, или полипептидной молекулы, представленной в настоящем документе. В некоторых случаях заболевание, связанное с экспрессией мезотелина, выбирается из группы, состоящей из пролиферативного заболевания, рака, злокачественной опухоли, не связанного с раком показания, связанного с экспрессией мезотелина. В некоторых случаях заболевание представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из мезотелиомы, почечно-клеточной карциномы, рака желудка, рака молочных желез, рака легких, рака яичников, рака предстательной железы, рака толстой кишки, рака шейки матки, рака головного мозга, рака печени, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака мочевого пузыря, рака мочеточников, рака почек, рака эндометрия, рака пищевода, рака ЖКТ, рака вилочковой железы, холангиокарциномы и рака желудка.

В некоторых случаях заболевание представляет собой рак. В некоторых случаях заболевание выбирается из группы, состоящей из мезотелиомы, папиллярной серозной аденокарциномы яичников, светлоклеточного рака яичников, смешанной карциномы яичников Мюллера, эндометриоидной слизеобразующей карциномы яичников, злокачественного заболевания плевры, аденокарциномы поджелудочной железы, протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, серозной карциномы матки, аденокарциномы легких, карциномы внепеченочного желчного протока, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищевода, колоректальной аденокарциномы, аденокарциномы молочных желез, заболевания, связанного с экспрессией мезотелина, заболевания, связанного с экспрессией мезотелина, неслизеобразующей карциномы яичников, инвазивной протоковой аденокарциномы, аденокарциномы легкого, аденокарциномы желудка/пищевода, колоректальной аденокарциномы, лейкоза, детского острого миелоидного лейкоза, инвазивной внутрипротоковой папиллярно-муцинозной опухоли (IPMN), аденокарциномы эндометрия, аденокарциномы желудка/пищевода, аденокарциномы легкого, аденокарциномы молочных желез и их комбинаций.

В некоторых случаях клетки, экспрессирующие молекулу TFP, вводятся в комбинации с веществом, которое повышает эффективность клетки, экспрессирующей молекулу TFP. В некоторых случаях у млекопитающего высвобождается меньше цитокинов по сравнению с млекопитающим, которому вводят эффективное количество Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) против мезотелина. В некоторых случаях клетки, экспрессирующие молекулу TFP, вводятся в комбинации с веществом, которое облегчает один или более побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей молекулу TFP. В некоторых случаях клетки, экспрессирующие молекулу TFP, вводятся в комбинации с веществом, которое лечит заболевание, связанное с мезотелином.

В одном аспекте в качестве лекарственного препарата применяется выделенная молекула нуклеиновой кислоты, представленная в настоящем документе, выделенная полипептидная молекула, представленная в настоящем документе, выделенный TFP, представленный в настоящем документе, комплекс, представленный в настоящем документе, вектор, представленный в настоящем документе, или клетка, представленная в настоящем документе.

В одном аспекте в настоящем документе предлагается способ лечения млекопитающего с заболеванием, связанным с экспрессией мезотелина, включающий в себя введение млекопитающему эффективного количества молекулы TFP, представленной в настоящем документе, клетки, представленной в на-

стоящем документе, или полипептидной молекулы, представленной в настоящем документе, причем у млекопитающего высвобождается меньше цитокинов по сравнению с млекопитающим, которому вводят эффективное количество Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) против мезотелина.

Включение посредством ссылки

Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки.

Краткое описание графических материалов

Новые свойства изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание свойств и преимуществ настоящего изобретения будет получено на основе следующего подробного описания, в котором изложены иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы изобретения, и сопроводительных графических материалов, в которых:

На фиг. 1 представлена схематическая иллюстрация, демонстрирующая использование гибридных полипептидов Т-клеточного рецептора (TFP) по настоящему изобретению. Пример TFP содержит scFv против мезотелина и полноразмерный полипептид CD3 эпсилон, слитые посредством $(G_4S)_3$ линкерной последовательности. Когда TFP вырабатывается Т-клеткой или вводится в нее, он связывается с другими полипептидами эндогенного Т-клеточного рецептора (TCR) (показан таким, который включает в себя два полипептида CD3 эпсилон, один полипептид CD3 гамма, один полипептид CD3 дельта, два полипептида CD3 дзета, одну субъединицу TCR альфа и одну субъединицу TCR бета, причем горизонтальный серый сегмент представляет плазматическую мембрану) для образования перепрограммированного TCR, в котором один или оба эндогенных полипептида CD3 эпсилон замещены TFP.

На фиг. 2 представлена схематическая иллюстрация, демонстрирующая примеры вариантов перепрограммированных гибридных полипептидов Т-клеточного рецептора (TFP) по настоящему изобретению. Иллюстрация, обозначенная scFv:TCR-V α , демонстрирует пример перепрограммированного TCR, содержащего TFP, который содержит scFv против мезотелина и полноразмерный полипептид TCR-V α , слитые посредством $(G_4S)_3$ линкерной последовательности. Иллюстрация, обозначенная scFv:TCR-V α :TCR-V β , демонстрирует пример перепрограммированного TCR, который содержит множество TFP, включая i) scFv против мезотелина и полноразмерный полипептид TCR-V α , слитые посредством $(G_4S)_3$ линкерной последовательности, и ii) scFv против мезотелина и полноразмерный полипептид TCR-V β , слитые посредством $(G_4S)_3$ линкерной последовательности. Иллюстрация, обозначенная scFv: Δ TCR-V α :CD3 ϵ , демонстрирует пример перепрограммированного TCR, который содержит множество TFP, включая i) scFv против мезотелина и усеченный (Δ) полипептид TCR, слитые посредством $(G_4S)_3$ линкерной последовательности, и ii) scFv против мезотелина и полноразмерный полипептид CD3 эпсилон, слитые посредством $(G_4S)_3$ линкерной последовательности. Усеченный (Δ) полипептид TCR усекается путем делеции V α . Иллюстрация, обозначенная scFv:ATCR-V α : Δ TCR-V β , демонстрирует пример перепрограммированного TCR, который содержит множество TFP, включая i) scFv против мезотелина и усеченный (Δ) полипептид TCR V α , слитые посредством $(G_4S)_3$ линкерной последовательности, и ii) scFv против мезотелина и усеченный (Δ) полипептид TCR V β , слитые посредством $(G_4S)_3$ линкерной последовательности. Усеченный (Δ) полипептид TCR усекается путем делеции V β .

На фиг. 3 представлена схематическая иллюстрация, демонстрирующая использование гибридных полипептидов Т-клеточного рецептора (TFP) по настоящему изобретению. Пример TFP содержит домен V $_H$ против мезотелина и полноразмерный полипептид CD3 эпсилон, слитые посредством $(G_4S)_3$ линкерной последовательности. Когда TFP вырабатывается Т-клеткой или вводится в Т-клетку, он связывается с другими полипептидами эндогенного Т-клеточного рецептора (TCR) (показан таким, который включает в себя два полипептида CD3 эпсилон, один полипептид CD3 гамма, один полипептид CD3 дельта, два полипептида CD3 дзета, одну субъединицу TCR альфа и одну субъединицу TCR бета, причем горизонтальный серый сегмент представляет плазматическую мембрану) для образования перепрограммированного TCR, в котором один или оба эндогенных полипептида CD3 эпсилон замещены TFP.

На фиг. 4 представлена серия схематических иллюстраций, демонстрирующих конструкции ДНК, кодирующие различные TFP.

На фиг. 5A изображен пример анализа поверхностной экспрессии TFP на активированных клетках МКПК (PBMC) и показаны клетки CD3 $^+$ (APC против CD3, гейт), активированные с помощью MSLN TFP и окрашенные в отношении CD8 (APCCy7 против CD8, ось y) и мезотелина ("MSLN") (меченные R-фикоэритрином hMSLN IgG Zenon®, ось x). Слева направо показаны клетки, которые либо не трансдуцировали, либо трансдуцировали с помощью конструкций анти-MSLN-CD3 ϵ TFP, анти-MSLN-CD28 ζ CAR и анти-MSLN-41BB ζ CAR.

На фиг. 5B изображен пример анализа поверхностной экспрессии TFP на активированных клетках PBMC и показаны клетки, активированные собственными однодоменными TFP, окрашенные в отношении MSLN Fc и проанализированные в отношении ЗФБ. В верхнем ряду (слева направо) показаны не-трансдуцированные клетки, а также клетки, трансдуцированные контрольным анти-MSLN-CD3 ϵ TFP

("SSI"). В рядах 2-4 показаны связующие антитела против MSLN SD1, SD4 и SD6, соответственно, в клетках, трансдуцированных конструкциями (слева направо) CD3ε TFP, CD3γ TFP, TCRβ TFP и CD28ζ CAR, меченными ЗФБ.

На фиг. 6А представлен пример графика, демонстрирующего уничтожение мезотелин (MSLN)-положительных клеток-мишеней HeLa (аденокарцинома шейки матки, ATCC® CCL-2™) конструкциями анти-MSLN-TFP с течением времени. Активированные PBMC были необработанными (след 1), нетрансдуцированными (след 2) или трансдуцированными пустым вектором (след 3), с помощью анти-MSLN-CD3ε TFP (след 4), анти-MSLN-CD28ζ CAR или анти-MSLN-41BBζ CAR и размножены в течение 8 дней перед инкубацией с 1×10^4 MSLN-положительных клеток-мишеней HeLa.

На фиг. 6В представлен пример графика, демонстрирующего уничтожение MSLN-отрицательных клеток-мишеней HeLa (аденокарцинома шейки матки, ATCC® CCL-2™) конструкциями анти-MSLN-TFP с течением времени. Активированные PBMC были необработанными (след 1), нетрансдуцированными (след 2) или трансдуцированными пустым вектором (след 3), с помощью анти-MSLN-CD3ε TFP (след 4), анти-MSLN-CD28ζ CAR или анти-MSLN-41BBζ CAR и размножены в течение 8 дней перед инкубацией с 1×10^4 MSLN-положительных клеток-мишеней HeLa.

На фиг. 6С показано уничтожение MSLN-положительных клеток в клеточных линиях с высокой экспрессией MSLN (клетки HeLa) с помощью Т-клеток, полученных от двух разных доноров-людей (вверху и внизу). Показаны следы уничтожения клеток для TFP-Т-клеток с собственными связующими антителами против MSLN SD1 (Фиг. 7А), SD4 (посередине) и SD6 (справа). Активированные PBMC были нетрансдуцированными (след 1) или трансдуцированными с помощью CD3ε TFP (след 2), CD3γ TFP (след 3), TCRβ TFP (след 4) или CD28ζ CAR. Нормализованный клеточный индекс, указывающий на цитотоксичность, устанавливали при помощи анализа на анализаторе клеток в режиме реального времени (real time cell analyzer -RTCA).

На фиг. 7 показана серия графиков, демонстрирующих активность связывания CAR-Т-клеток против MSLN и TFP-Т-клеток против линии клеток-мишеней, экспрессирующих высокие уровни мезотелина (HeLa-Luc^(MSLN^{high})). Показан % клеток, уничтоженных в образцах при отсутствии Т-клеток ("только клетки-мишени"), с Т-клетками, трансдуцированными пустым вектором ("NT"), Т-клетками против MSLN (положительный контроль) или TFP-Т-клетками против мезотелина с собственными связующими антителами против мезотелина SD1 (Фиг. 7А), SD4 (Фиг. 7В) и SD6 (Фиг. 7С), каждый из которых в формате CD3ε TFP, CD3γ TFP, TCRβ TFP и CD28ζ CAR. На каждом графике черные столбцы обозначают соотношение 1:1 Т-клеток к клеткам-мишеням, а серые столбцы - соотношение 1:5 Т-клеток к клеткам-мишеням. Аналогичные результаты наблюдали для второго донора Т-клеток.

На фиг. 8 показана серия графиков, демонстрирующих активность CAR- и TFP-Т-клеток против MSLN в отношении линии клеток-мишеней, экспрессирующих низкие уровни мезотелина (PC3-MSLN^(low)). Показан % клеток, уничтоженных в образцах при отсутствии Т-клеток ("только клетки-мишени"), с трансдуцированными пустым вектором ("NT"), против MSLN (положительный контроль, "SS1") или с собственными конструкциями против мезотелина SD1, SD4 и SD6 в форматах TFP CD3ε (Фиг. 8А), CD3γ (Фиг. 8В), TCRβ (Фиг. 8С) и CAR CD28ζ (Фиг. 8D). На каждом графике черные столбцы обозначают соотношение 1:1 Т-клеток к клеткам-мишеням, а серые столбцы - соотношение 1:5 Т-клеток к клеткам-мишеням. Аналогичные результаты наблюдали для второго донора Т-клеток.

На фиг. 9 показаны результаты анализа FACS, демонстрирующие активацию Т-клеток, экспрессирующих конструкции CAR и TFP против MSLN при совместном культивировании MSLN+ с клетками. Как показано на фиг. 9А, слева направо, Т-клетки были нетрансдуцированными, трансдуцированными пустым вектором, трансдуцированными с помощью анти-MSLN-CD3ε TFP, анти-MSLN-28ζ CAR или анти-MSLN-41BBζ CAR. Клетки, совместно культивируемые с MSLN- клетками, показаны в верхнем ряду, а клетки, совместно культивируемые с MSLN+ клетками-мишенями, показаны в нижнем ряду. Затем клетки окрашивали антителами, специфическими к маркерам активации поверхности CD69 и CD25 или гранзиму В компонента цитолитических гранул (GrB). Количество клеток, окрашенных антителами к CD69, соответствует оси х, а количество клеток, окрашенных антителами к CD25, соответствует оси у. Как показано, Т-клетки, экспрессирующие конструкции CAR и TFP против мезотелина, были активированы путем культивирования с MSLN+ клетками, как показано при помощи повышенных уровней экспрессии CD69 и CD25, относительно совместного культивирования с MSLN- клетками (Фиг. 9В). Показано процентное содержание CD25+ клеток для каждой конструкции в MSLN- (белые столбцы) и MSLN+ (черные столбцы) клетках. Аналогичный эксперимент был проведен с использованием MSLN-клеток K562 (круги) и MSLN+ клеток K562 (квадраты) в нетрансдуцированных Т-клетках либо Т-клетках, трансдуцированных положительными контрольными связующими антителами против MSLN ("510-SS1-CD3ε") (Фиг. 9С). Данные представляют сумму CD25⁺, CD69⁺ и CD25⁺/CD69⁺ клеток. На фиг. 9D представлены данные для собственных связующих антител против MSLN SD1 (квадраты), SD4 (круги) и SD6 (треугольники) в MSLN- клетках-мишенях K562 (левая панель) и MSLN+ клетках K562 (правая панель), объединенных с донорскими Т-клетками, имеющими форматы TFP CD3ε, CD3γ, TCRβ и

CD28 ζ CAR. Аналогичные результаты наблюдали при использовании клеток второго донора Т-клеток.

На фиг. 10 показаны результаты анализа FACS, демонстрирующие активацию Т-клеток, экспрессирующих конструкции CAR и TFP против MSLN при совместном культивировании MSLN⁺ с клетками. Клетки окрашивали в отношении поверхностных антигенов с помощью APC против CD3 (гейт) и APC-Су7 против CD8 (оси у) перед фиксацией, пермеабелизацией и окрашиванием с помощью Alexafluor700 против гранзима В (оси х). Как показано на фиг. 10А, слева направо, Т-клетки были нетрансдуцированными, трансдуцированными пустым вектором, трансдуцированными с помощью анти-MSLN-CD3 ϵ TFP, анти-MSLN-28 ζ CAR или анти-MSLN-41BB ζ CAR. Клетки, совместно культивируемые с MSLN⁻ клетками, показаны в верхнем ряду, а клетки, совместно культивируемые с MSLN⁺ клетками-мишенями, показаны в нижнем ряду. CD8 Т-клетки, экспрессирующие конструкции CAR и TFP против мезотелина, были активированы путем культивирования с MSLN⁺ клетками, как показано при помощи повышенных уровней внутриклеточного GrB, относительно совместного культивирования с MSLN⁻ клетками (Фиг. 10В). Показан процент клеток гранзима В ("GrB⁺") для каждой конструкции при совместном культивировании с MSLN⁻ (белые столбцы) или MSLN⁺ (черные столбцы) клетками. На фиг. 11 показаны результаты анализа ИФА выработки цитокинов в активированных Т-клетках, экспрессирующих конструкции CAR и TFP против MSLN при совместном культивировании с клетками K562, сверхэкспрессирующими MSLN. Клетки K562, сверхэкспрессирующие BCMA, использовали в качестве отрицательных контролей. Через 24 часа клетки проанализировали в отношении экспрессии IFN- γ (Фиг. 11А) и IL-2 (Фиг. 11В) методом ИФА. Как показано на каждой фиг. слева направо, Т-клетки были нетрансдуцированными, трансдуцированными пустым вектором, трансдуцированными с помощью анти-MSLN-CD3 ϵ TFP, анти-MSLN-28 ζ CAR или анти-MSLN-41BB ζ CAR. Клетки, совместно культивированные с MSLN⁻клетками, обозначены белыми столбцами, а клетки, совместно культивированные с MSLN⁺ клетками-мишенями, обозначены черными столбцами.

На фиг. 12 показана серия графиков, демонстрирующих эффективность TFP-Т-клеток специфического к MSLN sAb *in vivo* в мышинной ксенотрансплантатной модели мезотелиомы. Мышей инокулировали мечеными люциферазой MSTO-211H-FL-MSLN-Luc в количестве 1×10^6 клеток на мышь, опухоли выращивали до тех пор, пока объем опухоли не составлял приблизительно 300 мм^3 , и каждому животному внутривенно вводили 1×10^7 Т-клеток. На фиг. 12А показан объем опухоли после инъекции Т-клеток, включая слева направо контроль - отсутствие Т-клеток, SD1 CD3 ϵ -TFP, и SD4 CD3 ϵ -TFP. На фиг. 12В показаны CD3 γ - TFP со связующими антителами SD1 и SD4, а также SD1 CD28 ζ CAR. На фиг. 12С-Д показаны результаты выживших мышей из 12А-В, которым повторно вводили опухолевые клетки с целью определить, будут ли мыши сохранять свой иммунитет к MSLN без второй инъекции Т-клеток. Мышей, которым вводили SD1 CD3 ϵ -TFP-Т-клетки (12С) и SD1 CD3 γ - TFP-Т-клетки (12Д) и которые ранее избавились от опухолей, повторно инокулировали линиями MSLN⁺ (MSTO) или MSLN⁻ (Raji) опухолевых клеток. Объем опухоли измерили и отобразили на оси х.

На фиг. 13 показаны выработка и функциональный анализ MSLN-TFP-Т-клеток, полученных от пациентов с раком яичников. На фиг. 13А представлена схематическая диаграмма экспериментального дизайна. На фиг. 13В-С показано уничтожение *in vitro* опухолевых клеток MSTO-MSLN-Luc SD1 ϵ -TFP-Т-клетками пациента. Опухолевые клетки MSTO-MSLN-Luc (клетки-мишени) были подтверждены в отношении экспрессии мезотелина (13В); SD1 ϵ -TFP-Т-клетки (эффektorные клетки) и соответствующий нетрансдуцированный контроль добавляли в соотношениях эффektorных клеток к клеткам-мишеням, равных 5 к 1, 1 к 1 или 1 к 5, в течение 24 часов. Люминесценцию клеток-мишеней измерили в относительных люминесцентных единицах (relative luminescence unit - RLU) с помощью считывателя планшетов M5 SpectraMax[®] (Molecular devices). Каждая линия на фигуре представляет среднее значение для 3 повторностей (13С). На фиг. 13D-L показано измерение цитокинового профиля SD1 ϵ -TFP-Т-клеток, полученных от пациентов с раком яичников, включая IFN γ (13D), GM-CSF (13E), гранзим А (13F), гранзим В (13G), IL-2 (13H), MIP-1 α (13I), MIP-1 β (13J), TNF α (13K) и перфорин (13L). Опухолевые клетки MSTO-MSLN-Luc (клетки-мишени) помещали в концентрации 10 000 клеток/лунку на плоскодонный 96-луночный планшет. SD1 ϵ -TFP-Т-клетки (эффektorные клетки) и соответствующий нетрансдуцированный контроль добавляли в соотношении 1 к 1 в течение 24 часов. Собирали клеточные надосадочные жидкости и измеряли цитокины с помощью анализа Luminex[®]. На фиг. 14 показана эффективность *in vivo* полученных от пациентов SD1 CD3 ϵ -TFP-Т-клеток в мышинной ксенотрансплантатной опухолевой модели с высоким уровнем MSLN. Клетки MSTO-211H-FL MSLN-Luc подкожно инокулировали в количестве 1×10^6 клеток на мышь. Через десять дней после инъекции опухоли (объем опухоли $\sim 200\text{-}300 \text{ мм}^3$) каждому животному внутривенно вводили 5×10^6 Т-клеток. Каждая линия на фигуре обозначает одно животное. Данные показаны для Т-клеток от ND12 (14А), пациента 1 (14В), пациента 2 (14С), пациента 3 (14D) и пациента 4 (14Е). Круги обозначают размер опухоли у мышей, инокулированных нетрансдуцированными Т-клетками; квадраты обозначают размер опухоли у мышей, инокулированных TFP-Т-клетками.

Подробное описание изобретения

В одном аспекте в настоящем документе описываются выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR и домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий связывающий домен против мезотелина. В некоторых вариантах осуществления субъединица TCR содержит внеклеточный домен TCR. В других вариантах осуществления субъединица TCR содержит трансмембранный домен TCR. В еще одних вариантах осуществления субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR. В дополнительных вариантах осуществления субъединица TCR содержит (i) внеклеточный домен TCR, (ii) трансмембранный домен TCR и (iii) внутриклеточный домен TCR, причем по меньшей мере два из (i), (ii) и (iii) относятся к одной субъединице TCR. В других дополнительных вариантах осуществления субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен, выбранный из внутриклеточного сигнального домена CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, или аминокислотную последовательность, имеющую к тому же по меньшей мере одну, две или три модификации. В других дополнительных вариантах осуществления субъединица TCR содержит внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен, выбранный из функционального сигнального домена 4-1BB и/или функционального сигнального домена CD3 дзета, или аминокислотную последовательность, имеющую к тому же по меньшей мере одну, две или три модификации.

В некоторых вариантах осуществления выделенные молекулы нуклеиновой кислоты содержат (i) CDR1 легкой цепи (LC), LC CDR2 и LC CDR3 любой аминокислотной последовательности связывающего домена легкой цепи против мезотелина, представленной в настоящем документе, и/или (ii) CDR1 тяжелой цепи (HC), HC CDR2 и HC CDR3 любой аминокислотной последовательности связывающего домена тяжелой цепи против мезотелина, представленной в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 30, 20 или 10 модификаций аминокислотной последовательности вариабельного участка легкой цепи, представленной в настоящем документе, или последовательность с 95-99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в настоящем документе. В других вариантах осуществления вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 30, 20 или 10 модификаций аминокислотной последовательности вариабельного участка тяжелой цепи, представленной в настоящем документе, или последовательность с 95-99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления TFP включает в себя внеклеточный домен субъединицы TCR, который содержит внеклеточный домен или его часть белка, выбранного из группы, состоящей из альфа- или бета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3 дельта, CD3 эпсилон или CD3 гамма, или их функциональных фрагментов, или аминокислотной последовательности, имеющей к тому же по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций. В других вариантах осуществления кодируемый TFP включает в себя трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета-цепи TCR или субъединиц TCR CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, или их функционального фрагмента, или аминокислотной последовательности, имеющей к тому же по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций. В некоторых вариантах осуществления кодируемый TFP включает в себя трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи TCR или CD3 эпсилон, CD3 гамма и CD3 дельта CD45, CD2, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 and CD154, или их функционального фрагмента, или аминокислотной последовательности, имеющей к тому же по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций. В некоторых вариантах осуществления кодируемый связывающий домен против мезотелина соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В некоторых случаях кодируемая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 1 до 4. В некоторых случаях кодируемая линкерная последовательность содержит длинную линкерную (ДЛ) последовательность. В некоторых случаях кодируемая длинная линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 2 до 4. В некоторых случаях кодируемая линкерная последовательность содержит короткую линкерную (КЛ) последовательность. В некоторых случаях кодируемая короткая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 1 до 3.

В некоторых вариантах осуществления выделенные молекулы нуклеиновой кислоты дополнительно содержат последовательность, кодирующую костимулирующий домен. В некоторых случаях костимулирующий домен является функциональным сигнальным доменом, полученным из белка, выбранного из группы, которая состоит из DAP10, DAP12, CD30, LIGHT, OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD 18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137), или аминокислотной последовательности, имеющей к тому же по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций.

В некоторых вариантах осуществления выделенные молекулы нуклеиновой кислоты дополнитель-

но содержат лидерную последовательность.

Также в настоящем документе предлагаются выделенные полипептидные молекулы, кодируемые любой из описанных ранее молекул нуклеиновой кислоты.

Также в другом аспекте в настоящем документе предлагаются выделенные молекулы гибридного белка (TFP) Т-клеточного рецептора, которые содержат человеческий или гуманизированный связывающий домен против мезотелина, внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления выделенные молекулы TFP содержат антитело или фрагмент антитела, содержащий человеческий или гуманизированный связывающий домен против мезотелина, внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен и внутриклеточный домен.

В некоторых вариантах осуществления домен человеческого или гуманизованного антитела содержит фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления домен человеческого или гуманизованного антитела содержит scFv или домен V_H.

В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против мезотелина представляет собой scFv или домен V_H. В других вариантах осуществления связывающий домен против мезотелина содержит легкую цепь и тяжелую цепь аминокислотной последовательности, представленной в настоящем документе, или их функциональный фрагмент, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 30, 20 или 10 модификаций аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи, представленного в настоящем документе, или последовательность с 95-99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления выделенные молекулы TFP содержат внеклеточный домен TCR, который содержит внеклеточный домен или его часть белка, выбранного из группы, состоящей из альфа- или бета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3 дельта, CD3 эпсилон или CD3 гамма, или аминокислотной последовательности, имеющей к тому же по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций.

В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против мезотелина соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В некоторых случаях линкерная область содержит (G₄S)_n, где n = от 1 до 4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит длинную линкерную (ДЛ) последовательность. В некоторых случаях длинная линкерная последовательность содержит (G₄S)_n, где n = от 2 до 4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит короткую линкерную (КЛ) последовательность. В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит (G₄S)_n, где n = от 1 до 3. В некоторых вариантах осуществления выделенные молекулы TFP дополнительно содержат последовательность, кодирующую костимулирующий домен. В других вариантах осуществления выделенные молекулы TFP дополнительно содержат последовательность, кодирующую внутриклеточный сигнальный домен. В еще одних вариантах осуществления выделенные молекулы TFP дополнительно содержат лидерную последовательность.

Также в настоящем документе предлагаются векторы, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую любую из описанных ранее молекул TFP. В некоторых вариантах осуществления вектор выбирается из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора или ретровирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вектор дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой транскрибированный *in vitro* вектор. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность в векторе дополнительно содержит poly(A)-хвост. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит 3'UTR.

Также в настоящем документе предлагаются клетки, которые содержат любой из описанных векторов. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой человеческую Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетку. В других вариантах осуществления клетки дополнительно содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанной со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена. В некоторых случаях ингибирующая молекула содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть PD1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и домен первичной сигнализации.

В другом аспекте в настоящем документе предлагаются выделенные молекулы TFP, которые содержат человеческий или гуманизированный связывающий домен против мезотелина, внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR.

В другом аспекте в настоящем документе предлагаются выделенные молекулы TFP, которые содержат человеческий или гуманизированный связывающий домен против мезотелина, внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем молекула TFP способна к функциональной интеграции в эндогенный комплекс TCR. В другом аспекте в настоящем доку-

менте предлагаются человеческие CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетки, которые содержат по меньшей мере две молекулы TFP, содержащие человеческий или гуманизированный связывающий домен против мезотелина, внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR в человеческой CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетке, на ней и/или на ее поверхности.

В другом аспекте в настоящем документе предлагаются белковые комплексы, которые содержат i) молекулу TFP, содержащую человеческий или гуманизированный связывающий домен против мезотелина, внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен и внутриклеточный домен; и ii) по меньшей мере один эндогенный комплекс TCR.

В некоторых вариантах осуществления TCR содержит внеклеточный домен или его часть белка, выбранного из группы, состоящей из альфа- или бета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3 дельта, CD3 эпсилон или CD3 гамма. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен против мезотелина соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В некоторых случаях линкерная область содержит длинную линкерную (ДЛ) последовательность. В некоторых случаях длинная линкерная последовательность содержит (G₄S)_n, где n = от 1 до 4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит короткую линкерную (КЛ) последовательность. В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит (G₄S)_n, где n = от 1 до 3.

Также в настоящем документе предлагаются человеческие CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетки, которые содержат по меньшей мере два различных белка TFP на каждый из описанных белковых комплексов.

В другом аспекте в настоящем документе предлагается популяция человеческих CD8⁺ или CD4⁺ Т-клеток, причем Т-клетки популяции отдельно или в совокупности содержат по меньшей мере две молекулы TFP, содержащие человеческий или гуманизированный связывающий домен против мезотелина, внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, причем молекула TFP способна к функциональному взаимодействию с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR в человеческой CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетке, на ней и/или на ее поверхности.

В другом аспекте в настоящем документе предлагается популяция человеческих CD8⁺ или CD4⁺ Т-клеток, причем Т-клетки популяции отдельно или в совокупности содержат по меньшей мере две молекулы TFP, кодируемые выделенной молекулой нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе.

В другом аспекте в настоящем документе предлагаются способы создания клетки, включающие в себя трансдукцию Т-клетки с помощью любого из описанных векторов.

В другом аспекте в настоящем документе предлагаются способы получения популяции РНК-сконструированных клеток, включающие в себя введение транскрибированной *in vitro* РНК или синтетической РНК в клетку, причем РНК содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую любую из описанных молекул TFP.

В другом аспекте в настоящем документе предлагаются способы обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, включающие в себя введение млекопитающему эффективного количества клетки, экспрессирующей любую из описанных молекул TFP. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аутологическую Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аллогенную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения млекопитающее является человеком.

В другом аспекте в настоящем документе предлагаются способы лечения млекопитающего с заболеванием, связанным с экспрессией мезотелина, включающие в себя введение млекопитающему эффективного количества клетки, содержащей любую из описанных молекул TFP. В некоторых вариантах осуществления заболевание, связанное с экспрессией мезотелина, выбирается из пролиферативного заболевания, такого как рак или злокачественная опухоль, или предракового состояния, такого как рак поджелудочной железы, рак яичников, рак желудка, рак легких или рак эндометрия, либо оно представляет собой нераковое сходное показание, связанное с экспрессией мезотелина.

В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие любую из описанных молекул TFP, вводятся в комбинации с веществом, которое облегчает один или более побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей молекулу TFP. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие любую из описанных молекул TFP, вводятся в комбинации с веществом, которое лечит заболевание, связанное с мезотелином.

Также в настоящем документе для использования в качестве лекарственного препарата предлагаются любые из описанных выделенных молекул нуклеиновой кислоты, любые из описанных выделенных полипептидных молекул, любые из описанных выделенных TFP, любые из описанных белковых комплексов, любые из описанных векторов или любые из описанных клеток.

Определения.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем доку-

менте, имеют такое же значение, которое обычно понимается обычным специалистом в области техники, к которой относится изобретение.

Форма единственного числа используется для обозначения одного или более чем одного (т.е. по меньшей мере одного) грамматического объекта. В качестве примера, "элемент" означает один элемент или более одного элемента.

Как используется в настоящем документе, термин "около" может означать плюс или минус менее чем 1 или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, или более чем 30 процентов, что будет зависеть от ситуации и будет известно или понятно специалисту в данной области техники.

Как используется в настоящем описании, "субъект", или "субъекты", или "индивиды" могут включать в себя, помимо прочего, млекопитающих, таких как люди или млекопитающие, не относящиеся к человеку, например, одомашненные, сельскохозяйственные или дикие животные, а также птицы и водные животные. "Пациенты" - это субъекты, страдающие от заболевания, нарушения или состояния, подверженные риску их развития либо любым другим образом нуждающиеся в композициях и способах, представленных в настоящем документе. Как используется в настоящем документе, термины "лечить" или "лечение" относятся к любому признаку успеха при лечении или облегчении заболевания или состояния. Лечение может включать в себя, например, снижение, замедление или облегчение тяжести одного или более симптомов заболевания или состояния, или оно может включать в себя снижение частоты проявления симптомов заболевания, дефекта, нарушения, нежелательного состояния или т. п. у пациента. Как используется в настоящем документе, термин "лечить или предотвратить" иногда используется для обозначения способа, который дает в результате определенный уровень лечения или облегчения заболевания или состояния и предполагает ряд результатов, направленных для достижения этой цели, включая, помимо прочего, полное предотвращение состояния. Как используется в настоящем документе, термин "предотвращение" относится к предотвращению заболевания или состояния, например, образования опухоли, у пациента. Например, если индивид, подверженный риску развития опухоли или другой формы рака, получает лечение способами по настоящему изобретению, и у него впоследствии не будет развиваться опухоль или другая форма рака, в таком случае у этого индивида заболевание будет предотвращено, по крайней мере в течение определенного периода времени.

Как используется в настоящем документе, "терапевтически эффективное количество" представляет собой такое количество композиции или ее активного компонента, которого будет достаточно для обеспечения положительного эффекта или для сокращения любым другим образом пагубного влияния на индивида, которому вводят эту композицию. Под термином "терапевтически эффективная доза" в настоящем документе понимают дозу, которая обеспечивает один или более желаемых или предпочтительных (например, положительных) эффектов, для достижения которых ее вводят, при этом подобное введение происходит один или более раз в течение заданного периода времени. Точная доза будет зависеть от цели лечения и устанавливаться специалистом в данной области техники с использованием известных методик (см., например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); и Pickar, *Dosage Calculations* (1999)).

Как используется в настоящем документе, "гибридный белок Т-клеточного рецептора (TCR)" или "TFP" включает в себя рекомбинантный полипептид, полученный из различных полипептидов, содержащих TCR, который, как правило, способен i) связываться с поверхностным антигеном на клетках-мишенях и ii) взаимодействовать с другими полипептидными компонентами интактного комплекса TCR, как правило, при совместном размещении в Т-клетке или на ее поверхности. "TFP-Т-клетка" представляет собой Т-клетку, которая была трансдуцирована (например, в соответствии со способами, описанными в настоящем документе) и которая экспрессирует TFP, например, включенный в естественный TCR. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку или CD4⁺/CD8⁺ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления TFP-Т-клетка представляет собой НК-клетку. В некоторых вариантах осуществления TFP-Т-клетка представляет собой гамма-дельта Т-клетку. Как используется в настоящем документе, термин "мезотелин", также известный как MSLN, или антиген САК1, или пре-про-мегакариоцит-потенцирующий фактор, относится к белку, который у людей кодируется геном MSLN (или мегакариоцит-потенцирующий фактор (MPF)). Мезотелин - это белок с молекулярной массой 40 кДа, который присутствует на нормальных мезотелиальных клетках и сверхэкспрессируется в нескольких опухолях человека, включая мезотелиому и аденокарциному яичников и поджелудочной железы. Ген мезотелина кодирует белок-предшественник, который перерабатывается для получения мезотелина, который прикрепляется к клеточной мембране посредством гликофосфатидилинозитоловой связи и растворимого фрагмента с молекулярной массой 31 кДа под названием мегакариоцит-потенцирующий фактор (MPF). Мезотелин может принимать участие в адгезии клеток, однако его биологическая функция неизвестна. Мезотелин является дифференцировочным антигеном опухоли, который обычно присутствует на мезотелиальных клетках, выстилающих плевру, брюшную полость и перикард. Мезотелин - это антигенная детерминанта, обнаруживаемая на клетках мезотелиомы, клетках рака яичников, клетках аденокарциномы поджелудочной железы и некоторых плоскоклеточных карциномах (см., например, Kojima et al., *J. Biol. Chem.* 270:21984-21990(1995) и Onda et al., *Clin. Cancer Res.* 12:4225-4231(2006)). Мезотелин взаимодействует с CA125/MUC16 (см., например, Rump et al., *J. Biol. Chem.*

279:9190-9198(2004) и Ma et al., J. Biol. Chem. 287:33123-33131(2012)). Человеческие и мышинные аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот можно найти в общедоступных базах данных, таких как GenBank, UniProt и Swiss-Prot. Например, аминокислотную последовательность человеческого мезотелина можно найти под учетным номером UniProt/Swiss-Prot Q13421. Каноническую полипептидную последовательность человеческого мезотелина можно найти под учетным номером UniProt Q13421 (или Q13421-1): MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLGETGQE-AAPLDGVLNPPNISSLSRQLLGFPCAIEVSGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDADFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLPAALACWGVRSLLSEADVRA LGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVSCPGLDQDQEEAARAALQGGPPYPGPSTWSVSTMDALRGLL PVLGQPIIRSIPQGIVAAWRQRSSRDPSWRQPETILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWE LEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPEVVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVT SLETLKALLEVNKGHEMSPQAPRRPLPQVATLIDRFVKGGRGQLDKDTLDTLAFYPGYLCSLSPHEELSS VPPSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSM DLATFMKLRRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDDLTLGLGLGQGPINGY LVLDSLMEALSQTPCLLGPVLTVLALLASTLA (SEQ ID NO: 15). Нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант 1 транскрипта человеческого мезотелина, можно найти под учетным номером NM005823. Нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант 2 транскрипта человеческого мезотелина, можно найти под учетным номером NM013404. Нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант 3 транскрипта человеческого мезотелина, можно найти под учетным номером NM001177355. Мезотелин экспрессируется на клетках мезотелиомы, клетках рака яичников, клетках аденокарциномы поджелудочной железы и плоскоклеточных карциномах (см., например, Kojima et al., J. Biol. Chem. 270:21984-21990(1995) и Onda et al., Clin. Cancer Res. 12:4225-4231(2006)). Другие клетки, экспрессирующие мезотелин, представлены ниже в определении термина "заболевание, связанное с экспрессией мезотелина". Мезотелин также взаимодействует с CA125/MUC16 (см., например, Rump et al., J. Biol. Chem. 279:9190-9198(2004) и Ma et al., J. Biol. Chem. 287:33123-33131(2012)). В одном примере антигенсвязывающая часть TFP распознает и связывается с эпитопом в пределах внеклеточного домена белка мезотелина, который экспрессируется на нормальной или злокачественной клетке мезотелиомы, клетке рака яичников, клетке аденокарциномы поджелудочной железы или клетке плоскоклеточной карциномы.

Как используется в настоящем документе, термин "антитело" относится к белковым или полипептидным последовательностям, полученным из молекулы иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном. Антитела могут представлять собой интактные иммуноглобулины поликлонального или моноклонального происхождения или их фрагменты и могут быть получены из естественных или рекомбинантных источников.

Термины "фрагмент антитела" или "связывающий домен антитела" относятся к по меньшей мере одной части антитела или ее рекомбинантным вариантам, которые содержат антигенсвязывающий домен, т. е. антигенный определяющий вариabельный участок интактного антитела, которых будет достаточно для обеспечения распознавания и специфического связывания фрагмента антитела с мишенью, такой как антиген и его определенный эпитоп. К примерам фрагментов антител относятся, помимо прочего, Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты, одноцепочечные (sc) Fv-фрагменты антител ("scFv"), линейные антитела, однодоменные антитела (сокращенно "sdAb") (V_L либо V_H), верблюжьи домены V_{HH} и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Термин "scFv" относится к гибриднему белку, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий вариabельный участок легкой цепи, и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий вариabельный участок тяжелой цепи, причем вариabельные участки легкой и тяжелой цепи непрерывно соединены посредством короткого гибкого полипептидного линкера и способны быть экспрессированы как одна полипептидная цепь, и причем scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он был получен. "Вариabельный участок тяжелой цепи" или "V_H" (или в случае однодоменных антител, например, нанотел, - "V_{HH}") в отношении антитела относится к фрагменту тяжелой цепи, который содержит три CDR, перемежающихся фланкирующие участки, известные как каркасные области, эти каркасные области, как правило, более высоко консервативные, чем CDR, и образуют каркас для поддержки CDR.

Как используется в настоящем документе, если не указано иное, scFv может иметь вариabельные участки V_L и V_H в любом порядке, например, по отношению к N-терминальным или C-терминальным концам полипептида scFv может содержать V_L-линкер-V_H или V_H-линкер-V_L. Часть композиции TFP по настоящему изобретению, содержащая антитело или фрагмент этого антитела, может существовать в различных формах, где антигенсвязывающий домен экспрессируется как часть непрерывной полипептидной цепи, включая, например, фрагмент однодоменного антитела (sdAb) или антитело с тяжелыми цепями HCAb, одноцепочечное антитело (scFv), полученное из мышинового, гуманизированного или человеческого антитела (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). В од-

ном аспекте антигенсвязывающий домен композиции TFP по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В дополнительном аспекте TFP содержит фрагмент антитела, который содержит scFv или sdAb.

Термин "тяжелая цепь антитела" относится к большей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях, и которая обычно определяет класс, к которому принадлежит антитело.

Термин "легкая цепь антитела" относится к меньшей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях. Каппа ("κ") и лямбда ("λ") легкие цепи относятся к двум основным изотипам легких цепей антитела. Термин "рекомбинантное антитело" относится к антителу, которое получают с применением технологии рекомбинантной ДНК, такому как, например, антитело, экспрессируемое бактериофагом или экспрессирующей системой дрожжей. Термин также следует воспринимать как обозначающий антитело, которое было получено путем синтеза молекулы ДНК, кодирующей антитело, и которая экспрессирует белок антитела, или аминокислотной последовательности, определяющей антитело, причем ДНК или аминокислотная последовательность были получены с применением технологии рекомбинантной ДНК или аминокислотной последовательности, которая является доступной и хорошо известной в данной области техники.

Термин "антиген" или "Ag" относится к молекуле, которая способна специфически связываться антителом или которая провоцирует иммунный ответ каким-либо другим образом. Такой иммунный ответ может предполагать или выработку антител, или активацию специфических иммунокомпетентных клеток, или и то, и другое.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить в качестве антигена. Более того, антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность или часть нуклеотидной последовательности, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, таким образом кодирует "антиген" в том значении, в котором этот термин используется в настоящем документе. Более того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген не обязательно должен кодироваться исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Очевидно, что настоящее изобретение включает в себя, помимо прочего, использование частей нуклеотидных последовательностей более одного гена, и что эти нуклеотидные последовательности располагаются в различных комбинациях для того, чтобы кодировать полипептиды, которые вызывают желаемый иммунный ответ. Более того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген совсем не обязательно должен кодироваться "геном". Очевидно, что антиген может быть образован путем синтеза, или может быть получен из биологического образца, или может представлять собой макромолекулу, помимо полипептида. Подобный биологический образец может включать в себя, помимо прочего, образец тканей, образец опухоли, клетку или жидкость с другими биологическими компонентами.

Термин "противоопухолевый эффект" относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными способами, включая, помимо прочего, например, уменьшение объема опухоли, уменьшение количества опухолевых клеток, уменьшение количества метастаз, увеличение вероятной продолжительности жизни, снижение пролиферации опухолевых клеток, снижение выживаемости опухолевых клеток или облегчение различных физиологических симптомов, связанных с раковым состоянием. "Противоопухолевый эффект" также может проявляться в способности пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител по настоящему изобретению в первую очередь предотвращать появление опухоли.

Термин "аутологический" относится к любому материалу, полученному от того же индивида, которому впоследствии он будет вводиться.

Термин "аллогенный" относится к любому материалу, полученному от другого животного того же вида или другого пациента, отличных от того индивида, которому будет вводиться материал. Считается, что два или более индивидов являются аллогенными по отношению друг к другу, когда гены в одном или более локусов не являются идентичными. В некоторых аспектах аллогенный материал, полученный от индивидов одного и того же вида, может достаточно отличаться генетически для антигенного взаимодействия.

Термин "ксеногенный" относится к трансплантату, полученному от животного другого вида.

Термин "рак" относится к заболеванию, которое характеризуется быстрым и неконтролируемым ростом aberrantных клеток. Раковые клетки могут распространяться локально или через кровотоки и лимфатическую систему в другие части тела. Примеры различных раковых заболеваний описаны в настоящем документе, к ним относится, помимо прочего, рак молочных желез, рак предстательной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почек, рак печени, рак головного мозга, рак легких и т. п. Фраза "заболевание, связанное с экспрессией мезотелина" включает в себя, помимо прочего, заболевание, связанное с экспрессией мезотелина, или состояние, связанное с клетками, которые экспрессируют мезотелин, включая, например, пролиферативные заболевания, такие как рак, или злокачественная опухоль, или предраковое состояние. В одном аспекте рак представляет собой мезотелиому. В одном аспекте рак представляет собой рак поджелудочной желе-

зы. В одном аспекте рак представляет собой рак яичников. В одном аспекте рак представляет собой рак желудка. В одном аспекте рак представляет собой рак легких. В одном аспекте рак представляет собой рак эндометрия. К нераковым смежным показаниям, связанным с экспрессией мезотелина, относится, помимо прочего, например, аутоиммунное заболевание (например, волчанка, ревматоидный артрит, колит), воспалительные заболевания (аллергия и астма) и трансплантация.

Термин "консервативные модификации в последовательностях" относится к аминокислотным модификациям, которые в значительной степени не влияют и не изменяют характеристики связывания антитела или фрагмента антитела, содержащего аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают в себя аминокислотные замещения, вставки и делеции. Модификации могут быть внесены в антитело или фрагмент антитела по настоящему изобретению с помощью стандартных способов, известных в данной области техники, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замещения - это такие замещения, в которых аминокислотный остаток замещают аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники. Эти семейства включают в себя аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или более аминокислотных остатков в пределах TFP по настоящему изобретению могут быть замещены другими аминокислотными остатками из одного и того же семейства боковых цепей, а измененный TFP может быть протестирован с помощью функциональных анализов, описанных в настоящем документе.

Термин "стимуляция" относится к первичному ответу, индуцированному связыванием стимулирующего домена или стимулирующей молекулы (например, комплекс TCR/CD3) с их распознаваемым лигандом, опосредуя, таким образом, событие передачи сигналов, такое как, помимо прочего, передача сигналов через комплекс TCR/CD3. Стимуляция может опосредовать измененную экспрессию определенных молекул и/или реорганизацию цитоскелетных структур и т. п.

Термин "стимулирующая молекула" или "стимулирующий домен" относится к молекуле или ее части, экспрессируемой Т-клеткой, которая обеспечивает последовательности первичной цитоплазматической сигнализации, которые регулируют первичную активацию комплекса TCR стимулирующим путем для по меньшей мере некоторого аспекта сигнального пути Т-клетки. В одном аспекте первичный сигнал инициируется посредством, например, связывания комплекса TCR/CD3 с молекулой МНС, загруженной пептидом, что приводит к опосредованию Т-клеточного ответа, включая, помимо прочего, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т. п. Последовательность первичной цитоплазматической сигнализации (также называемая "домен первичной сигнализации"), которая действует стимулирующим путем, может содержать мотив сигнализации, который известен как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или "ITAM". К примерам последовательности первичной цитоплазматической сигнализации, содержащей ITAM, для конкретного применения в настоящем изобретении относятся, помимо прочего, производные от TCR дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также известный как "ICOS") и CD66d.

Термин "антигенпрезентирующая клетка" или "APC" относится к клетке иммунной системы, такой как вспомогательная клетка (например, В-клетка, дендритная клетка и т. п.), которая демонстрирует чужеродный антиген, входящий в состав основных комплексов гистосовместимости (МНС), на ее поверхности. Т-клетки могут распознавать такие комплексы с помощью Т-клеточных рецепторов (TCR). APC обрабатывают антигены и представляют их Т-клеткам. Как используется в настоящем документе, термин "внутриклеточный сигнальный домен" относится к внутриклеточной части молекулы. Внутриклеточный сигнальный домен генерирует сигнал, который вызывает иммунную эффекторную функцию клетки, содержащей TFP, например, TFP-экспрессирующей Т-клетки. К примерам иммунной эффекторной функции, например, в TFP-экспрессирующей Т-клетке, относится цитолитическая активность и активность хелперных Т-клеток, включая секрецию цитокинов. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать домен первичной внутриклеточной сигнализации. К примерам доменов первичной внутриклеточной сигнализации относятся домены, полученные от молекул, которые отвечают за первичную стимуляцию или стимуляцию, зависящую от антигена. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать костимулирующий внутриклеточный домен. К примерам костимулирующих внутриклеточных сигнальных доменов относятся домены, полученные из молекул, которые отвечают за костимулирующие сигналы или стимуляцию, зависящую от антигена.

Домен первичной внутриклеточной сигнализации может содержать ITAM ("иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив"). К примерам последовательностей первичной цитоплазматической сигнализации, содержащих ITAM, относятся, помимо прочего, производные CD3 дзета, FcR гамма, FcR

бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d DAP10 и DAP12.

Термин "костимулирующая молекула" относится к распознаваемому партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, опосредуя, таким образом, костимулирующий ответ Т-клетки, такой как, помимо прочего, пролиферация. Костимулирующие молекулы являются молекулами клеточной поверхности, отличными от рецепторов антигенов или их лигандов, которые необходимы для эффективного иммунного ответа. Костимулирующие молекулы включают в себя, помимо прочего, молекулу МНС класса I, BTLA и рецептор к Толл-лигандам, а также DAP10, DAP12, CD30, LIGHT, OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD 18) и 4-1BB (CD137). Костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может представлять собой внутриклеточную часть костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула может быть представлена в следующих семействах белков: TNF рецепторные белки, иммуноглобулиноподобные белки, рецепторы к цитокинам, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM) и активирующие рецепторы NK-клеток. К примерам подобных молекул относится CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83 и т. п. Внутриклеточный сигнальный домен может содержать всю внутриклеточную часть или весь нативный внутриклеточный сигнальный домен молекулы, из которой он был получен, или его функциональный фрагмент. Термин "4-1BB" относится к члену суперсемейства TNFR с аминокислотной последовательностью, предоставленной под учетным номером GenBank AAA62478.2, или эквивалентным остаткам отличных от человека видов, например, мышей, грызунов, мартышковых, человекообразных обезьян и т. п.; а "костимулирующий домен 4-1BB" определяется как аминокислотные остатки 214-255 учетного номера GenBank AAA62478.2 или эквивалентные остатки отличных от человека видов, например, мышей, грызунов, мартышковых, человекообразных обезьян и т. п.

Термин "кодирующий" относится к присущему свойству конкретных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих или определенную последовательность нуклеотидов (например, рРНК, тРНК и мРНК), или определенную последовательность аминокислот, а также к биологическим свойствам, полученным в результате этого. Таким образом, ген, кДНК или РНК кодируют белок, если в результате транскрипции и трансляции мРНК, соответствующей этому гену, вырабатывается белок в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно предоставляется в перечнях последовательностей, так и некодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут рассматриваться как кодирующие белок или другой продукт этого гена или кДНК.

Если не указано иное, "нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность" включает в себя все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза "нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок или РНК" также может включать в себя интроны в той мере, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в некоторых версиях содержать один или более интронов.

Термины "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к количеству соединения, состава, материала или композиции, как описано в настоящем документе, эффективному для достижения конкретного биологического или терапевтического результата.

Термин "эндогенный" относится к любому материалу, полученному от организма, клетки, ткани или системы либо произведенному внутри них.

Термин "экзогенный" относится к любому материалу, введенному из организма, клетки, ткани или системы либо произведенному за их пределами.

Термин "экспрессия" относится к транскрипции и/или трансляции конкретной нуклеотидной последовательности, управляемой промотором.

Термин "вектор переноса" относится к композиции вещества, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту и которая может использоваться для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. Многочисленные векторы известны в данной области техники, включая, помимо прочего, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин "вектор переноса" включает в себя способную к автономной репликации плазмиду или вирус. Термин также следует воспринимать как такой, который дополнительно включает в себя неплазмидные и невирусные соединения, которые способствуют переносу нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, полилизинное соединение, липосома и т. п. К примерам вирусных векторов переноса относятся, помимо прочего, аденовирусные векторы, векторы аденоассоциированного вируса, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и т. п.

Термин "вектор экспрессии" относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, который содержит регулирующие экспрессию последовательности, функционально соединенные с нуклеотидной последовательностью, которая подлежит экспрессии.

Вектор экспрессии содержит достаточно цис-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть обеспечены клеткой-хозяином или в *in vitro* системе экспрессии. Векторы экспрессии включают в себя все известные в данной области техники векторы, включая космиды, плазмиды (например, "голые" или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и адено-ассоциированные вирусы), которые содержат рекомбинантный полинуклеотид.

Термин "лентивирус" относится к роду семейства Retroviridae. Лентивирусы являются уникальными среди ретровирусов благодаря способности инфицировать неделящиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической информации в ДНК клетки-хозяина, таким образом, они являются одним из наиболее эффективных вариантов вектора доставки генов. ВИЧ, вирус иммунодефицита обезьян, вирус кошачьего иммунодефицита являются примерами лентивирусов.

Термин "лентивирусный вектор" относится к вектору, полученному из по меньшей мере части лентивирусного генома, включая, в особенности, самоинфицирующий лентивирусный вектор, как предлагается у Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). К другим примерам лентивирусных векторов, которые могут использоваться в клинической практике, относится, помимо прочего, например, технология доставки генов LENTIVECTOR™ от компании Oxford BioMedica, система векторов LENTIMAX™ от компании Lentigen и т. п. Неклинические типы лентивирусных векторов также доступны и известны специалисту в данной области техники. Термин "гомологичный" или "идентичность" относится к идентичности последовательности субъединицы между двумя полимерными молекулами, например, между двумя молекулами нуклеиновой кислоты, такими как две молекулы ДНК или две молекулы РНК, или между двумя полипептидными молекулами. Когда положение субъединицы в обеих молекулах занимает одна и та же мономерная субъединица, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занимает аденин, в таком случае они являются гомологичными или идентичными в этом положении. Гомология между двумя последовательностями прямо пропорциональна количеству совпадающих или гомологичных положений; например, если половина (например, пять положений в полимере длиной десять субъединиц) положений в двух последовательностях будет гомологичной, две последовательности являются на 50% гомологичными; если 90% положений (например, 9 из 10) будут совпадать или будут гомологичными, две последовательности являются на 90% гомологичными.

"Гуманизированные" формы антител нечеловеческого происхождения (например, мышинные) представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие последовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. В большинстве случаев гуманизированные антитела и фрагменты антител представляют собой иммуноглобулины человека (антитело-реципиент или фрагмент антитела), в которых остатки определяющей комплементарности области (CDR) реципиента замещены остатками CDR видов, отличных от человека (антитело-донор), таких как мышь, крыса или кролик, обладающими желаемой специфичностью, аффинностью и эффективностью. В некоторых примерах остатки Fv каркасного участка (FR) человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Более того, гуманизированное антитело/фрагмент антитела может содержать остатки, которые не обнаружены ни в реципиентном антителе, ни в импортированной CDR или каркасных последовательностях. Данные модификации могут дополнительно улучшать и оптимизировать эффективности антител или фрагментов антител. В целом, гуманизированное антитело или фрагмент антитела будут содержать практически все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или практически все области CDR соответствуют таким областям иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, а все или значительная часть областей FR являются областями последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело или фрагмент антитела также могут содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, из иммуноглобулина человека. Для получения дополнительной информации см. Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Opin. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992.

"Человеческий" или "полностью человеческий" относится к иммуноглобулину, такому как антитело или фрагмент антитела, где вся молекула будет человеческого происхождения или будет состоять из аминокислотной последовательности, идентичной человеческой форме антитела или иммуноглобулина.

Термин "выделенный" означает измененный или удаленный из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественно присутствующие в живом существе, не являются выделенными, однако эта же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сосуществующих материалов в естественном состоянии, будут выделенными. Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в по существу очищенной форме или могут существовать в чужеродной среде, такой как, например, клетка-хозяин. В контексте настоящего изобретения для часто встречающихся оснований нуклеиновых кислот используются следующие сокращения. "А" относится к аденозину, "С" относится к цитозину, "G" относится к гуанозину, "Т" относится к тимидину, а "U" относится к уридину. Термин "функционально соединенный" или "транскрипционный контроль" относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной нуклеотидной последова-

тельностью, которая приводит к экспрессии последней. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты является функционально соединенной со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты попадает в функциональную взаимосвязь со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор является функционально соединенным с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Функционально соединенные последовательности ДНК могут быть смежными друг с другом и, например, если необходимо соединить две кодирующие белок области, находиться в одной и той же рамке считывания.

Термин "парентеральное" введение иммуногенной композиции включает в себя, например, подкожную (п/к), внутривенную (в/в), внутримышечную (в/м) или внутривенную инъекцию, внутрипухоловое введение или методы инфузии.

Термин "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотид" относится к дезоксирибонуклеиновым кислотам (ДНК) или рибонуклеиновым кислотам (РНК) и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме. При отсутствии специальных ограничений данный термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, обладающие свойствами связывания, аналогичными свойствам эталонной нуклеиновой кислоты, и метаболизирующиеся аналогично нуклеотидам природного происхождения. Если не указано иное, то конкретная последовательность нуклеиновых кислот также неявно включает в себя их консервативно модифицированные варианты (например, вырожденные замещения кодонов), аллели, ортологи, ОНП (однонуклеотидный полиморфизм) и комплементарные последовательности, а также последовательность, указанную явно. Конкретно, вырожденные замещения кодонов можно получать, генерируя последовательности, в которых третье положение одного или более из выбранных (или всех) кодонов замещено остатками смешанных оснований и/или дезоксиинозина (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

Термины "пептид", "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяемо и относятся к соединению, содержащему аминокислотные остатки, ковалентно связанные пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и не ограничивается максимальным количеством аминокислот, которые может содержать последовательность белка или пептида. Полипептиды включают в себя любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Как используется в настоящем документе, этот термин относится как к коротким цепям, которые в данной области техники также часто называются пептидами, олигопептидами и олигомерами, например, так и к более длинным цепям, которые в данной области техники обычно называются белками, которых существует множество типов. К "полипептидам" относятся, например, биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, гибридные белки, среди прочих. Полипептид включает в себя природный пептид, рекомбинантный пептид или их комбинацию.

Термин "промотор" относится к последовательности ДНК, распознаваемой клеточным аппаратом транскрипции или введенным синтетическим аппаратом, необходимыми для инициации специфической транскрипции полинуклеотидной последовательности.

Термин "промоторная/регуляторная последовательность" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая необходима для экспрессии продукта гена, функционально соединенного с промоторной/регуляторной последовательностью. В некоторых случаях эта последовательность может являться коровой промоторной последовательностью, а в других случаях эта последовательность может также включать в себя энхансерную последовательность и другие регуляторные элементы, которые необходимы для экспрессии продукта гена. Промоторная/регуляторная последовательность может, например, быть такой, которая экспрессирует продукт гена тканеспецифическим способом.

Термин "конститутивный" промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, если она функционально соединена с полинуклеотидом, кодирующим или определяющим продукт гена, вызывает выработку продукта гена в клетке при большинстве или всех физиологических условиях клетки.

Термин "индуцибельный" промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, если она функционально соединена с полинуклеотидом, кодирующим или определяющим продукт гена, вызывает выработку продукта гена в клетке по существу только тогда, когда в клетке присутствует индуктор, который соответствует этому промотору.

Термин "тканеспецифический" промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, если она функционально соединена с полинуклеотидом, кодирующим ген или определяющимся геном, вызывает выработку продукта гена в клетке по существу только в том случае, если клетка представляет собой клетку такого типа ткани, который соответствует промотору.

Термины "линкер" и "гибкий полипептидный линкер", употребляемые в контексте scFv, относятся к пептидному линкеру, который состоит из аминокислот, таких как глициновые и/или сериновые остатки, используемые отдельно или в комбинации, для соединения вместе переменного участка тяжелой цепи и переменного участка легкой цепи. В одном варианте осуществления гибкий полипептидный линкер

представляет собой линкер Gly/Ser и содержит аминокислотную последовательность (Gly-Gly-Gly-Ser)_n, где n - это положительное целое число, которое равняется или больше 1. Например, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5, n=6, n=7, n=8, n=9 и n=10. В одном варианте осуществления гибкий полипептидный линкер включает в себя, помимо прочего, (Gly₄Ser)₄ или (Gly₄Ser)₃. В другом варианте осуществления линкеры включают в себя множество повторов (Gly₂Ser), (GlySer) или (Gly₃Ser). В объем настоящего изобретения также включены линкеры, описанные в WO2012/138475 (включен в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых случаях линкерная последовательность содержит длинную линкерную (ДЛ) последовательность. В некоторых случаях длинная линкерная последовательность содержит (G₄S)_n, где n = от 2 до 4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит короткую линкерную (КЛ) последовательность. В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит (G₄S)_n, где n = от 1 до 3.

Как используется в настоящем документе, 5'-кэп (также называемый кэп РНК, кэп РНК 7-метилгуанозин или кэп РНК m7G) представляет собой модифицированный гуаниновый нуклеотид, который добавили в "переднюю часть" или к 5-концу эукариотической матричной РНК вскоре после начала транскрипции. 5'-кэп состоит из концевой группы, которая связана с первым транскрибированным нуклеотидом. Его присутствие является критическим для распознавания рибосомой и защиты от РНКаз. Добавление кэпа связано с транскрипцией и происходит сотранскрипционно таким образом, что одно влияет на другое. Вскоре после начала транскрипции 5-конец синтезируемой мРНК связывается с синтезирующим кэп комплексом, связанным с РНК-полимеразой. Этот ферментный комплекс катализирует химические реакции, необходимые для кэпирования мРНК. Синтез протекает как многоступенчатая биохимическая реакция. Кэпирующий фрагмент может быть модифицирован для модуляции функциональности мРНК, такой как ее стабильность или эффективность трансляции.

Как используется в настоящем документе, термин "транскрибированная *in vitro* РНК" относится к РНК, предпочтительно мРНК, которая была синтезирована *in vitro*. В целом, транскрибированную *in vitro* РНК получают из *in vitro* транскрипционного вектора. *In vitro* транскрипционный вектор содержит матрицу, которая используется для получения транскрибированной *in vitro* РНК.

Как используется в настоящем документе, "poly(A)" представляет собой серию аденозинов, присоединенных путем полиаденилирования к мРНК. В предпочтительном варианте осуществления конструкции для временной экспрессии polyA находится между 50 и 5000, предпочтительно более чем 64, более предпочтительно более чем 100, наиболее предпочтительно более чем 300 или 400. Последовательности poly(A) могут быть модифицированы химически или ферментативно для модуляции функциональности мРНК, такой как локализация, стабильность или эффективность трансляции.

Как используется в настоящем документе, термин "полиаденилирование" относится к ковалентной связи полиаденилового фрагмента или его модифицированного варианта с молекулой матричной РНК. У эукариот большинство молекул матричной РНК (мРНК) являются полиаденилированными на 3'-конце. 3'-poly(A)-хвост представляет собой длинную последовательность адениновых нуклеотидов (часто несколько сотен), добавленных к пре-мРНК посредством действия фермента полиаденилат-полимеразы. У высших эукариот poly(A)-хвост добавляют на транскрипты, которые содержат конкретную последовательность, сигнал полиаденилирования. Poly(A)-хвост и связанный с ним белок способствуют защите мРНК от деградации экзонуклеазами. Полиаденилирование также является важным для терминации транскрипции, экспорта мРНК из ядра и трансляции. Полиаденилирование происходит в ядре непосредственно после транскрипции ДНК в РНК, однако может дополнительно происходить позже в цитоплазме. После окончания транскрипции цепь мРНК расщепляется действием комплекса эндонуклеазы, связанного с РНК-полимеразой. Участок расщепления, как правило, характеризуется присутствием последовательности оснований AAUAAA возле участка расщепления. После расщепления мРНК аденозиновые остатки добавляют к свободному 3'-концу на участке расщепления.

Как используется в настоящем документе, "временный" относится к экспрессии неинтегрированного трансгена в течение периода времени, выраженного в часах, днях или неделях, причем период времени экспрессии меньше, чем период времени для экспрессии гена, интегрированного в геном или содержащегося в стабильном репликоне плазмиды в клетке-хозяине. Термин "путь передачи сигнала" относится к биохимической взаимосвязи между различными молекулами передачи сигналов, которые играют роль в передаче сигнала от одной части клетки к другой части клетки. Фраза "рецептор клеточной поверхности" включает в себя молекулы и комплексы молекул, способные принимать сигнал и передавать его через мембрану клетки.

Термин "субъект" предназначен для включения в себя живых организмов, у которых может быть вызван иммунный ответ (например, млекопитающие, человек).

Термин "по существу очищенная" клетка относится к клетке, которая практически не содержит другие типы клеток. По существу очищенная клетка также относится к клетке, которая была отделена от других типов клеток, с которыми она обычно связана в своем естественном состоянии. В некоторых случаях популяция по существу очищенных клеток относится к гомогенной популяции клеток. В других случаях этот термин относится просто к клеткам, которые были отделены от клеток, с которыми они естественным образом связаны в своем естественном состоянии. В некоторых аспектах эти клетки культиви-

вируются *in vitro*. В других аспектах эти клетки не культивируются *in vitro*.

Как используется в настоящем документе, термин "терапевтический" означает лечение. Терапевтический эффект достигается путем уменьшения, подавления, ремиссии или устранения болезненного состояния.

Как используется в настоящем документе, термин "профилактика" означает предотвращение заболевания или болезненного состояния либо их профилактическое лечение. В контексте настоящего изобретения "опухолевый антиген", или "антиген гиперпролиферативного заболевания", или "антиген, связанный с гиперпролиферативным заболеванием" относится к антигенам, которые характерны для конкретных гиперпролиферативных заболеваний. В некоторых аспектах антигены гиперпролиферативных заболеваний по настоящему изобретению были получены из раковых заболеваний, включая, помимо прочего, первичную или метастатическую меланому мезотелиому, почечно-клеточную карциному, рак желудка, рак молочных желез, рак легких, рак яичников, рак предстательной железы, рак толстой кишки, рак шейки матки, рак головного мозга, рак печени, рак поджелудочной железы, рак почек, эндометрия и желудка. В некоторых случаях заболевание представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из мезотелиомы, папиллярной серозной аденокарциномы яичников, светлоклеточного рака яичников, смешанной карциномы яичников Мюллера, эндометриальной слизеобразующей карциномы яичников, злокачественного заболевания плевры, аденокарциномы поджелудочной железы, протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, серозной карциномы матки, аденокарциномы легких, карциномы внепеченочного желчного протока, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищевода, колоректальной аденокарциномы, аденокарциномы молочных желез, заболевания, связанного с экспрессией мезотелина, и их комбинаций, заболевания, связанного с экспрессией мезотелина, и их комбинаций.

Термин "трансфицированный", или "трансформированный", или "трансдуцированный" относится к процессу, посредством которого экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или вводят в клетку-хозяина. "Трансфицированная", или "трансформированная", или "трансдуцированная" клетка - это клетка, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована с помощью экзогенной нуклеиновой кислоты. Клетка включает в себя первичную клетку субъекта и свое потомство.

Термин "специфически связывается" относится к антителу, фрагменту антитела или конкретному лиганду, который распознает и связывается с распознаваемым партнером по связыванию (например, мезотелином), присутствующим в образце, однако который не будет обязательно и по существу распознавать и связываться с другими молекулами в этом образце.

Диапазоны: по всему тексту этого описания различные аспекты изобретения могут быть представлены в виде диапазонов. Следует понимать, что описание в виде диапазонов предоставляется исключительно для удобства и краткости, и его не следует воспринимать как негибкое ограничение объема настоящего изобретения. Соответствующим образом, описание диапазона следует считать таким, которое конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах этого диапазона. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, следует считать таким, которое конкретно раскрывает поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. п.; а также отдельные числа в пределах этого диапазона, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. В качестве другого примера диапазон, такой как 95-99% идентичности, включает в себя что-либо с 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности, а также включает в себя поддиапазоны, такие как 96-99%, 96-98%, 96-97%, 97-99%, 97-98% и 98-99% идентичности. Это применяется независимо от ширины диапазона.

Описание

В настоящем документе предлагаются композиции вещества и способы применения для лечения заболевания, такого как рак, используя гибридные белки Т-клеточного рецептора (TCR). Как используется в настоящем документе, "гибридный белок Т-клеточного рецептора (TCR)" или "TFP" включает в себя рекомбинантный полипептид, полученный из различных полипептидов, содержащих TCR, который, как правило, способен i) связываться с поверхностным антигеном на клетках-мишенях и ii) взаимодействовать с другими полипептидными компонентами интактного комплекса TCR, как правило, при совместном размещении в Т-клетке или на ее поверхности. Как предлагается в настоящем документе, TFP обеспечивают значительные преимущества по сравнению с химерными антигенными рецепторами. Термин "химерный антигенный рецептор" или альтернативно "CAR" относится к рекомбинантному полипептиду, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен в форме scFv, трансмембранный домен и домены цитоплазматической сигнализации (также называемые в настоящем документе как "внутриклеточные сигнальные домены"), содержащие функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы, как определено ниже. В целом, центральный внутриклеточный сигнальный домен CAR получают из дзета-цепи CD3, которая обычно связана с комплексом TCR. Сигнальный домен CD3 дзета может быть конденсирован с одним или более функциональных сигнальных доменов, полученных из по меньшей мере одной костимулирующей молекулы, такой как 4-1BB (т. е., CD137), CD27 и/или CD28.

Гибридные белки Т-клеточного рецептора (TCR) (TFP).

Настоящее изобретение охватывает конструкции рекомбинантной ДНК, кодирующие TFP, причем TFP содержит фрагмент антитела, который специфически связывается с мезотелином, например, челове-

ческим мезотелином, причем последовательность фрагмента антитела является смежной с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей субъединицу TCR или ее часть, и находится с ней в одной рамке считывания. TFP, представленные в настоящем документе, способны связываться с одной или более эндогенных (или альтернативно, с одной или более экзогенных или с комбинацией эндогенных и экзогенных) субъединиц TCR с целью образования функционального комплекса TCR.

В одном аспекте TFP по настоящему изобретению содержит мишень-специфический элемент связывания, иначе называемый антигенсвязывающим доменом. Выбор фрагмента зависит от типа и количества антигенов-мишеней, которые определяют поверхность клетки-мишени. Например, антигенсвязывающий домен может выбираться для распознавания антигена-мишени, который выступает в качестве маркера клеточной поверхности на клетках-мишенях, связанных с конкретным болезненным состоянием. Таким образом, примеры маркеров клеточной поверхности, которые могут выступать в качестве антигенов-мишеней для антигенсвязывающего домена в TFP по настоящему изобретению, включают в себя маркеры, связанные с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями; аутоиммунными заболеваниями и раковыми заболеваниями (например, злокачественными заболеваниями).

В одном аспекте TFP-опосредованный T-клеточный ответ может быть направлен на представляющий интерес антиген путем встраивания антигенсвязывающего домена в TFP, который специфически связывается с желаемым антигеном.

В одном аспекте часть TFP, содержащая антигенсвязывающий домен, содержит антигенсвязывающий домен, который нацелен на мезотелин. В одном аспекте антигенсвязывающий домен нацелен на человеческий мезотелин.

Антигенсвязывающий домен может представлять собой любой домен, который связывается с антигеном, включая, помимо прочего, моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело и их функциональные фрагменты, включая, помимо прочего, однодоменное антитело, такое как вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), вариабельный домен легкой цепи (V_L) и вариабельный домен (V_{HH}) нанотела верблюжьего происхождения, а также с альтернативным каркасом, известным в данной области техники, который функционирует в качестве антигенсвязывающего домена, таким как домен рекомбинантного фибронектина, антикалин, DARPIN и т. п. Аналогично, природный или синтетический лиганд, специфически распознающий и связывающийся с антигеном-мишенью, может использоваться в качестве антигенсвязывающего домена для TFP. В некоторых случаях было бы полезно, чтобы антигенсвязывающий домен был получен от того же вида, в котором TFP будет в конечном итоге использоваться. Например, для использования у людей было бы полезно, чтобы антигенсвязывающий домен TFP содержал человеческие или гуманизированные остатки для антигенсвязывающего домена антитела или фрагмента антитела.

Таким образом, в одном аспекте антигенсвязывающий домен содержит гуманизированное или человеческое антитело или фрагмент антитела, либо мышинное антитело или фрагмент антитела. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий связывающий домен против мезотелина содержит одну или более (например, все три) из определяющей комплементарность области 1 легкой цепи (CDR1 LC), определяющей комплементарность области 2 легкой цепи (CDR2 LC) и определяющей комплементарность области 3 легкой цепи (CDR3 LC) гуманизированного или человеческого связывающего домена против мезотелина, описанного в настоящем документе, и/или одну или более (например, все три) из определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющей комплементарность области 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и определяющей комплементарность области 3 тяжелой цепи (CDR3 HC) гуманизированного или человеческого связывающего домена против мезотелина, описанного в настоящем документе, например, гуманизированный или человеческий связывающий домен против мезотелина содержит одну или более, например, все три, CDR LC и одну или более, например, все три, CDRHC. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий связывающий домен против мезотелина содержит одну или более (например, все три) из определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (HC CDR1), определяющей комплементарность области 2 тяжелой цепи (HC CDR2) и определяющей комплементарность области 3 тяжелой цепи (HC CDR3) гуманизированного или человеческого связывающего домена против мезотелина, описанного в настоящем документе, например, гуманизированный или человеческий связывающий домен против мезотелина имеет два вариабельных участка тяжелой цепи, каждый из которых содержит HC CDR1, HC CDR2 и HC CDR3, описанные в настоящем документе. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий связывающий домен против мезотелина содержит гуманизированный или человеческий вариабельный участок легкой цепи, описанный в настоящем документе, и/или гуманизированный или человеческий вариабельный участок тяжелой цепи, описанный в настоящем документе. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий связывающий домен против мезотелина содержит гуманизированный вариабельный участок тяжелой цепи, описанный в настоящем документе, например, по меньшей мере два гуманизированных или человеческих вариабельных участка тяжелой цепи, описанных в настоящем документе. В одном варианте осуществления связывающий домен против мезотелина представляет собой scFv, содержащий легкую цепь и тяжелую цепь аминокислотной последовательности, представленной в настоящем документе. В одном варианте осуществления связывающий домен против

мезотелина (например, scFv) содержит: переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замещения), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замещений) аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи, представленной в настоящем документе, или последовательность с 95-99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в настоящем документе; и/или переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замещения), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замещений) аминокислотной последовательности переменного участка тяжелой цепи, представленной в настоящем документе, или последовательность с 95-99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в настоящем документе. В одном варианте осуществления гуманизованный или человеческий связывающий домен против мезотелина представляет собой scFv, а переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, описанную в настоящем документе, присоединен к переменному участку тяжелой цепи, содержащему аминокислотную последовательность, описанную в настоящем документе, посредством линкера, например, линкера, описанного в настоящем документе. В одном варианте осуществления гуманизованный связывающий домен против мезотелина включает в себя линкер $(Gly_4-Ser)_n$, где n равняется 1, 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно 3 или 4. Переменный участок легкой цепи и переменный участок тяжелой цепи scFv могут быть, например, в любой из следующих ориентации: переменный участок легкой цепи-линкер-переменный участок тяжелой цепи или переменный участок тяжелой цепи-линкер-переменный участок легкой цепи. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит длинную линкерную (ДЛ) последовательность. В некоторых случаях длинная линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где n = от 2 до 4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит короткую линкерную (КЛ) последовательность. В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где n = от 1 до 3.

В некоторых аспектах нечеловеческое антитело является гуманизованным, где конкретные последовательности или участки антитела модифицируют для повышения сходства с антителом, которое естественным образом вырабатывается у человека, или его фрагментом. В одном аспекте антигенсвязывающий домен является гуманизованным.

Гуманизованное антитело может быть получено с помощью различных методик, известных в данной области техники, включая, помимо прочего, CDR-прививки (см., например, Европейский патент № EP 239,400; международную публикацию № WO 91/09967 и патенты США №№ 5,225,539, 5,530,101 и 5,585,089, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки), маскировку поверхностных остатков или изменение поверхности (см., например, Европейские патенты №№ EP 592,106 и EP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814 и Roguska et al., 1994, *PNAS*, 91:969-973, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки), перестановку цепей (см., например, патент США № 5,565,332, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки), а также методики, описанные, например, в публикации заявки на патент США № US2005/0042664, публикации заявки на патент США № US2005/0048617, патенте США № 6,407,213, патенте США № 5,766,886, международной публикации № WO 9317105, Tan et al., *J. Immunol.*, 169:1119-25 (2002), Caldas et al., *Protein Eng.*, 13(5):353-60 (2000), Morea et al., *Methods*, 20(3):267-79 (2000), Baca et al., *J. Biol. Chem.*, 272(16): 10678-84 (1997), Roguska et al., *Protein Eng.*, 9(10):895-904 (1996), Couto et al., *Cancer Res.*, 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., *Cancer Res.*, 55(8): 1717-22 (1995), Sandhu J S, *Gene*, 150(2):409-10 (1994) и Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235(3):959-73 (1994), полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Часто каркасные остатки в каркасных областях будут замещены соответствующим остатком из антитела-донора CDR для изменения, например, улучшения связывания с антигеном. Эти каркасные замещения идентифицируются с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, например, путем моделирования взаимодействий CDR и каркасных остатков для определения каркасных остатков, важных для связывания с антигеном, и сравнения последовательностей для определения необычных каркасных остатков в конкретных положениях (см., например, Queen et al., патент США № 5,585,089 и Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки).

Гуманизованное антитело или фрагмент антитела имеет один или более аминокислотных остатков, оставшихся в нем из источника нечеловеческого происхождения. Такие аминокислотные остатки нечеловеческого происхождения часто называются "импортированными" остатками, которые обычно взяты из "импортированного" переменного домена. Как представлено в настоящем документе, гуманизованные антитела или фрагменты антител содержат одну или более CDR из молекул иммуноглобулина и каркасных областей нечеловеческого происхождения, причем аминокислотные остатки, содержащие каркас, получены полностью или в основном из зародышевой линии человека. Различные методики гуманизации антител или фрагментов антител хорошо известны в данной области техники и могут преимущественно осуществляться, следуя методу Винтера с сотрудниками (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), путем

замещения CDR или последовательностей CDR грызунов на соответствующие последовательности человеческого антитела, т. е., CDR-прививки (EP 239,400; публикация согласно PCT № WO 91/09967 и патент США №№ 4,816,567; 6,331,415; 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 6,548,640, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки). В таких гуманизированных антителах и фрагментах антител по существу менее чем интактный человеческий вариабельный домен был замещен соответствующей последовательностью отличного от человека вида. Гуманизированные антитела часто являются человеческими антителами, в которых некоторые остатки CDR и, вероятно, некоторые каркасные (FR) остатки замещены остатками аналогичных участков антител грызунов. Гуманизация антител и фрагментов антител также может достигаться путем маскировки поверхностных остатков, или изменения поверхности (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., *Protein Engineering*, 7(6):805-814 (1994) и Roguska et al., *PNAS*, 91:969-973 (1994)), или перестановки цепей (патент США № 5,565,332), полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Выбор человеческих вариабельных доменов, как легких, так и тяжелых, которые будут использоваться для создания гуманизированных антител, заключается в уменьшении антигенности. Согласно так называемому методу "наилучшего соответствия" проводится скрининг последовательности вариабельного домена антитела грызуна по всей библиотеке известных человеческих последовательностей вариабельного домена. Человеческая последовательность, которая будет ближайшей к последовательности грызуна, затем принимается за человеческий каркас (FR) для гуманизированного антитела (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987), полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Другой метод использует конкретный каркас, полученный из консенсусной последовательности всех человеческих антител конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Аналогичный каркас может использоваться для нескольких различных гуманизированных антител (см., например, Nicholson et al. *Mol. Immun.* 34 (16-17): 1157-1165 (1997); Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993), полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления каркасную область, например, все четыре каркасные области, вариабельного участка тяжелой цепи получают из последовательности зародышевой линии V_H4-4-59. В одном варианте осуществления каркасная область может содержать одну, две, три, четыре или пять модификаций, например, замещений, например, из аминокислоты в соответствующей мышинной последовательности. В одном варианте осуществления каркасная область, например, все четыре каркасные области вариабельного участка легкой цепи получают из последовательности зародышевой линии VK3-1.25. В одном варианте осуществления каркасная область может содержать одну, две, три, четыре или пять модификаций, например, замещений, например, из аминокислоты в соответствующей мышинной последовательности.

В некоторых аспектах часть композиции TFP по настоящему изобретению, которая содержит фрагмент антитела, является гуманизированной с сохранением высокой аффинности к антигену-мишени и других предпочтительных биологических свойств. В соответствии с одним аспектом изобретения гуманизированные антитела и фрагменты антител получают в процессе анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов, используя трехмерные модели исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулина являются общедоступными и известны специалистам в данной области техники. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают возможные трехмерные конформационные структуры выбранных потенциально пригодных последовательностей иммуноглобулина. Изучение таких отображений позволяет провести анализ вероятной роли остатков в функционировании потенциально пригодных последовательностей иммуноглобулина, например, анализ остатков, которые влияют на способность потенциально пригодного иммуноглобулина связываться с антигеном-мишенью. Следовательно, FR-остатки могут выбираться и объединяться из реципиентных и импортированных последовательностей, таким образом, что будет достигаться характеристика желаемого антитела или фрагмента антитела, такая как повышенная аффинность к антигену-мишени. В целом, остатки CDR непосредственно и в существенной степени вовлечены в воздействие на связывание с антигеном.

Гуманизированное антитело или фрагмент антитела может сохранять аналогичную антигенную специфичность, что и исходное антитело, например, в настоящем изобретении способность связываться с человеческим мезотелином. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело или фрагмент антитела может иметь улучшенную аффинность и/или специфичность связывания с человеческим мезотелином.

В одном аспекте связывающий домен против мезотелина характеризуется конкретными функциональными особенностями или свойствами антитела или фрагмента антитела. Например, в одном аспекте часть композиции TFP по настоящему изобретению, которая содержит антигенсвязывающий домен, специфически связывается с человеческим мезотелином. В одном аспекте антигенсвязывающий домен имеет такую же или схожую специфичность связывания с человеческим мезотелином, что и FMC63 scFv, описанный у Nicholson et al. *Mol. Immun.* 34 (16-17): 1157-1165 (1997). В одном аспекте изобретение относится к антигенсвязывающему домену, содержащему антитело или фрагмент антитела, причем антигенсвязывающий домен специфически связывается с белком мезотелином или его фрагментом, причем

антитело или фрагмент антитела содержит переменную легкую цепь и/или переменную тяжелую цепь, которая включает в себя аминокислотную последовательность, представленную в настоящем документе. В некоторых аспектах scFv является смежным с лидерной последовательностью и находится с ней в одной рамке считывания.

В одном аспекте связывающий домен против мезотелина представляет собой фрагмент, например, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). В одном аспекте связывающий домен против мезотелина представляет собой Fv, Fab, (Fab')₂ или бифункциональное (например, биспецифическое) гибридное антитело (например, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). В одном аспекте антитела и их фрагменты, описанные в настоящем документе, связываются с белком мезотелином с аффинностью дикого типа или повышенной аффинностью. Также в настоящем документе предлагаются способы получения антигенсвязывающего домена антитела, специфического к антигену-мишени (например, к мезотелину или любому антигену-мишени, описанному в другом месте настоящего документа, для нацеливания связывающих доменов гибридного фрагмента), при этом способ включает в себя обеспечение путем добавления, делеции, замещения или вставки одной или более аминокислот в аминокислотной последовательности домена V_H, указанного в настоящем документе, причем домен V_H, который является вариантом аминокислотной последовательности домена V_H, необязательно объединяет предоставленный таким образом домен V_H с одним или более доменов V_L, и тестирование домена V_H или комбинации или комбинаций V_H/V_L для выявления конкретного члена связывания или антигенсвязывающего домена антитела, специфического к представляющему интерес антигену-мишени (например, мезотелину) и необязательно имеющего одно или более желаемых свойств. В некоторых случаях домены V_H и scFv могут быть получены в соответствии со способом, известным в данной области техники (см., например, Bird et al., (1988) Science 242:423-426 and Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Молекулы scFv могут быть получены путем связывания вместе участков V_H и V_L, используя гибкие полипептидные линкеры. Молекулы scFv содержат линкер (например, линкер Ser-Gly) с оптимизированной длиной и/или аминокислотной композицией. Длина линкера может в значительной степени повлиять на то, каким образом будут складываться и взаимодействовать переменные участки. Фактически, если используется короткий полипептидный линкер (например, между 5 и 10 аминокислотами), предотвращается внутрицепочечное складывание. Внутрицепочечное складывание также требуется для того, чтобы соединить два переменных участка вместе для образования участка связывания функционального эпитопа. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит длинную линкерную (ДЛ) последовательность. В некоторых случаях длинная линкерная последовательность содержит (G₄S)_n, где n = от 2 до 4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит короткую линкерную (КЛ) последовательность. В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит (G₄S)_n, где n = от 1 до 3. Примеры ориентации и размеров линкера см., например, в Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, патенте США № 7,695,936, публикация заявки на патент США №№. 20050100543 и 20050175606, а также в публикациях согласно РСТ №№ WO2006/020258 и WO2007/024715, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

scFv может содержать линкер с около 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более чем 15 остатками между его участками V_L и V_H. Линкерная последовательность может содержать любую встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит аминокислоты глицин и серин. В другом варианте осуществления линкерная последовательность содержит наборы глициновых и сериновых повторов, таких как (Gly₄Ser)_n, где n - это положительное целое число, которое равняется или больше 1. В одном варианте осуществления линкер может представлять собой (Gly₄Ser)₄ или (Gly₄Ser)₃. Вариации длины линкера могут сохранять или повышать активность, обуславливая превосходную эффективность в исследованиях активности. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит длинную линкерную (ДЛ) последовательность. В некоторых случаях длинная линкерная последовательность содержит (G₄S)_n, где n = от 2 до 4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит короткую линкерную (КЛ) последовательность. В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит (G₄S)_n, где n = от 1 до 3.

Стабильность и мутации.

Стабильность связывающего домена против мезотелина, например, молекул scFv (например, растворимого scFv), можно оценивать по отношению к биофизическим свойствам (например, термической стабильности) традиционной контрольной молекулы scFv или полноразмерного антитела. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий scFv обладает термической стабильностью, которая составляет более чем около 0,1, около 0,25, около 0,5, около 0,75, около 1, около 1,25, около 1,5, около 1,75, около 2, около 2,5, около 3, около 3,5, около 4, около 4,5, около 5, около 5,5, около 6, около 6,5, около 7, около 7,5, около 8, около 8,5, около 9, около 9,5, около 10 градусов, около 11 градусов, около 12 градусов, около 13 градусов, около 14 градусов или около 15 градусов Цельсия по сравнению с родителем scFv в описанных анализах. Улучшенная термическая стабильность связывающего домена против мезотелина, например, scFv, впоследствии будет присуща всей конструкции мезотелин-TFP, что приведет к улучшению терапевтических свойств конструкции TFP против мезотелина. Термическую стабильность связывающего домена против мезотелина, например, scFv, можно улучшить на по меньшей

мере около 2°C или 3°C по сравнению с традиционным антителом. В одном варианте осуществления связывающий домен против мезотелина, например, scFv, имеет улучшенную на 1°C термическую стабильность по сравнению с традиционным антителом. В другом варианте осуществления связывающий домен против мезотелина, например, scFv, имеет улучшенную на 2°C термическую стабильность по сравнению с традиционным антителом. В другом варианте осуществления scFv имеет улучшенную на 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, 10°C, 11°C, 12°C, 13°C, 14°C или 15°C термическую стабильность по сравнению с традиционным антителом. Сравнения можно проводить, например, между молекулами scFv, описанными в настоящем документе, и молекулами scFv или Fab-фрагментами антитела, из которого были получены V_H и V_L scFv. Термическую стабильность можно измерить с помощью способов, известных в данной области техники. Например, в одном варианте осуществления можно измерить T_M . Способы измерения T_M и другие способы определения стабильности белка описаны далее. Мутации в scFv (возникающие вследствие гуманизации или мутагенеза растворимого scFv) изменяют стабильность scFv и улучшают общую стабильность scFv и конструкции TFP против мезотелина. Стабильность гуманизованного scFv сравнивают по отношению к мышиному scFv, используя измерения, такие как T_M , температурная денатурация и температурная агрегация. В одном варианте осуществления связывающий домен против мезотелина, например, scFv, содержит по меньшей мере одну мутацию, возникающую вследствие процесса гуманизации таким образом, что мутировавший scFv обеспечивает улучшенную стабильность в конструкции TFP против мезотелина. В другом варианте осуществления связывающий домен против мезотелина, например, scFv, содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 мутаций, возникающих вследствие процесса гуманизации таким образом, что мутировавший scFv обеспечивает улучшенную стабильность в конструкции мезотелин-TFP.

В одном аспекте антигенсвязывающий домен TFP содержит аминокислотную последовательность, которая является гомологичной с аминокислотной последовательностью антигенсвязывающего домена, описанной в настоящем документе, а антигенсвязывающий домен сохраняет желаемые функциональные свойства фрагментов антител к мезотелину, описанных в настоящем документе. В одном конкретном аспекте композиция TFP по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В дополнительном аспекте фрагмент антитела содержит scFv. В различных аспектах антигенсвязывающий домен TFP конструируется путем модификации одной или более аминокислот в пределах одного или обоих переменных участков (например, V_H и/или V_L), например, в пределах одной или более областей CDR и/или в пределах одной или более каркасных областей. В одном конкретном аспекте композиция TFP по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В дополнительном аспекте фрагмент антитела содержит scFv.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что антитело или фрагмент антитела по настоящему изобретению может дополнительно модифицироваться таким образом, что они будут отличаться в отношении аминокислотной последовательности (например, от дикого типа), однако не в отношении желаемой активности. Например, дополнительные нуклеотидные замещения, приводящие к аминокислотным замещениям в "заменимых" аминокислотных остатках, могут быть выполнены для белка. Например, заменимый аминокислотный остаток в молекуле может быть замещен другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. В другом варианте осуществления нить аминокислот может быть замещена структурно аналогичной нитью, которая отличается порядком и/или композицией членов семейства боковых цепей, например, может быть осуществлено консервативное замещение, в котором аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Процент идентичности в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относится к двум или более последовательностям, которые являются одинаковыми. Две последовательности являются "по существу идентичными", если две последовательности обладают указанным процентным содержанием аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (например, 60% идентичности, необязательно 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности в указанном участке или, если это не указано, во всей последовательности), при сравнении или выравнивании для максимального совпадения в окне сравнения или обозначенной области, как определено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей, либо путем выравнивания вручную и при визуальной проверке. Необязательно, идентичность существует в отношении области, составляющей в длину по меньшей мере около 50 нуклеотидов (или 10 аминокислот), или более предпочтительно в отношении области, составляющей в

длину от 100 до 500 или 1000 или более нуклеотидов (или 20, 50, 200 или более аминокислот). Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность служит эталонной последовательностью, с которой сравнивают исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей исследуемая и эталонная последовательности вводят в компьютер, при необходимости, обозначают координаты последовательности и указывают программные параметры алгоритма для работы с последовательностями. Можно использовать программные параметры по умолчанию или указать альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности последовательностей для исследуемых последовательностей по сравнению с эталонной последовательностью на основании программных параметров. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно выполнять, например, посредством алгоритма локальной гомологии согласно Smith and Waterman, (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, алгоритма гомологичного выравнивания согласно Needleman and Wunsch, (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, поиска по методу сходства согласно Pearson and Lipman, (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, путем компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., г. Мэдисон, штат Висконсин, США) или ручного выравнивания и визуального осмотра (см., например, Brent et al., (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*). Двумя примерами алгоритмов, подходящих для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в Altschul et al., (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 и Altschul et al., (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, соответственно. Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST является общедоступным через Национальный центр биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information). В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает модификации исходной аминокислотной последовательности антитела или фрагмента (например, scFv), которые образуют функционально эквивалентные молекулы. Например, V_H или V_L связывающего домена против мезотелина, например, scFv, содержащийся в TFP, можно модифицировать для сохранения по меньшей мере около 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности исходной каркасной области V_H или V_L связывающего домена против мезотелина, например, scFv. Настоящее изобретение предусматривает модификации всей конструкции TFP, например, модификации одной или более аминокислотных последовательностей различных доменов конструкции TFP, чтобы получить функционально эквивалентные молекулы. Конструкцию TFP можно модифицировать, чтобы сохранить по меньшей мере около 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности исходной конструкции TFP.

Внеклеточный домен.

Внеклеточный домен может быть получен либо из природного, либо из рекомбинантного источника. Если источник является природным, то домен может быть получен из любого белка, однако в частности из связанного с мембраной или трансмембранного белка. В одном аспекте внеклеточный домен способен связываться с трансмембранным доменом. Внеклеточный домен для конкретного применения в настоящем изобретении может включать в себя по меньшей мере внеклеточные области, например, альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора либо CD3 эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта, или в альтернативных вариантах осуществления CD28, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154.

Трансмембранный домен.

В целом, последовательность TFP содержит внеклеточный домен и трансмембранный домен, кодируемые одной геномной последовательностью. В альтернативных вариантах осуществления TFP может быть сконструирован с возможностью включения в себя трансмембранного домена, который является гетерологичным внеклеточному домену TFP. Трансмембранный домен может включать в себя одну или более дополнительных аминокислот, смежных с трансмембранной областью, например, одну или более аминокислот, связанных с внеклеточной областью белка, из которого был получен трансмембранный белок (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или до 15 аминокислот внеклеточной области), и/или одну или более дополнительных аминокислот, связанных с внутриклеточной областью белка, из которого был получен трансмембранный белок (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или до 15 аминокислот внутриклеточной области). В одном аспекте применяют трансмембранный домен, который связан с одним из доменов в TFP. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть выбран из или модифицирован посредством аминокислотного замещения во избежание связывания таких доменов с трансмембранными доменами аналогичных или различных белков поверхностной мембраны, например, для сведения к минимуму взаимодействий с другими членами комплекса рецепторов. В одном аспекте трансмембранный домен способен к гомодимеризации с другим TFP на поверхности TFP-Т-клетки. В другом аспекте аминокислотная последовательность трансмембранного домена может быть модифицирована или замещена таким образом, чтобы минимизировать взаимодействия со связывающими доменами нативного партнера по связыванию, который присутствует в том же TFP.

Трансмембранный домен может быть получен либо из природного, либо из рекомбинантного источника. Если источник является природным, то домен может быть образован из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. В одном аспекте трансмембранный домен способен к передаче сигналов внутриклеточным доменам каждый раз, когда TFP связался с мишенью. Трансмембранный домен для конкретного применения в настоящем изобретении может включать в себя по меньшей мере трансмембранные области, например, альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154.

В некоторых случаях трансмембранный домен может быть присоединен к внеклеточной области TFP, например, антигенсвязывающему домену TFP посредством шарнира, например, шарнира из человеческого белка. Например, в одном варианте осуществления шарнир может представлять собой шарнир человеческого иммуноглобулина (Ig), например, шарнир IgG4 или шарнир CD8a. Линкеры

Необязательно, короткий олиго- или полипептидный линкер длиной от 2 до 10 аминокислот может образовывать связь между трансмембранным доменом и цитоплазматической областью TFP. Глицин-сериновый дублет обеспечивает особенно подходящий линкер. Например, в одном аспекте линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 53). В некоторых вариантах осуществления линкер кодируется нуклеотидной последовательностью GGTGGCGGAGGTTCTG-GAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO. 54).

Цитоплазматический домен.

Цитоплазматический домен TFP может включать в себя внутриклеточный сигнальный домен, если TFP содержит полипептиды CD3 гамма, дельта или эпсилон; субъединицы TCR альфа и TCR бета, как правило, не содержат сигнальный домен. Внутриклеточный сигнальный домен, как правило, отвечает за активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки, в которую был введен TFP. Термин "эффекторная функция" относится к специализированной функции клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность или хелперную активность, включая секрецию цитокинов. Таким образом, термин "внутриклеточный сигнальный домен" относится к части белка, которая передает сигнал эффекторной функции и направляет Т-клетку на выполнение специализированной функции. Тогда как обычно может использоваться весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать всю цепь. В той мере, в которой используется усеченная часть внутриклеточного сигнального домена, такая усеченная часть может использоваться вместо интактной цепи до тех пор, пока она будет передавать сигнал эффекторной функции. Таким образом, подразумевается, что термин внутриклеточный сигнальный домен включает в себя любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для передачи сигнала эффекторной функции.

К примерам внутриклеточных сигнальных доменов для использования в TFP по настоящему изобретению относятся цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR) и корецепторы, которые действуют согласованно для инициации трансдукции сигнала после задействования рецепторов антигенов, а также любое производное или вариант этих последовательностей и любая рекомбинантная последовательность с такой же функциональной способностью.

Известно, что создаваемых только TCR сигналов недостаточно для полной активации интактных Т-клеток и что требуется вторичный и/или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация интактных Т-клеток может опосредоваться двумя различными классами цитоплазматических последовательностей сигнализации: теми, что иницируют антигензависимую первичную активацию посредством TCR (домены первичной внутриклеточной сигнализации), и теми, что действуют независимо от антигенов образом для обеспечения вторичного или костимулирующего сигнала (вторичный цитоплазматический домен, например, костимулирующий домен).

Домен первичной сигнализации регулирует первичную активацию комплекса TCR либо стимулирующим путем, либо ингибирующим путем. Домены первичной внутриклеточной сигнализации, действующие стимулирующим путем, могут содержать мотивы сигнализации, которые известны как иммуно-рецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM).

Примеры ITAM, содержащих домены первичной внутриклеточной сигнализации, которые предназначены для конкретного применения в настоящем изобретении, включают в себя ITAM CD3 дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В одном варианте осуществления TFP по настоящему изобретению содержит внутриклеточный сигнальный домен, например, домен первичной сигнализации CD3 эпсилон. В одном варианте осуществления домен первичной сигнализации содержит модифицированный домен ITAM, например, мутировавший домен ITAM, который изменил (например, повысил или снизил) активность по сравнению с нативным доменом ITAM. В одном варианте осуществления домен первичной сигнализации содержит модифицированный домен первичной внутриклеточной сигнализации, содержащий ITAM, например, оптимизированный и/или усеченный домен первичной внутриклеточной сигнализации, содержащий ITAM. В одном варианте осуществления домен первичной сигнализации содержит один, два, три, четыре или более мотивов ITAM. Внутриклеточный сигнальный домен TFP может содержать сигнальный домен CD3 дзета отдель-

но или в комбинации с любыми другими желаемыми внутриклеточными сигнальными доменами, пригодными в контексте TFP по настоящему изобретению. Например, внутриклеточный сигнальный домен TFP может содержать часть эpsilon-цепи CD3 и костимулирующий сигнальный домен. Костимулирующий сигнальный домен относится к части TFP, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности, отличающуюся от рецептора антигена или его лигандов, которая требуется для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. К примерам подобных молекул относится CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, DAP10, DAP12, CD30, CD40, PD1, ICOS, связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83, и т. п. Например, было показано, что костимуляция CD27 усиливает размножение, эффекторную функцию и выживаемость человеческих TFP-T-клеток *in vitro* и увеличивает стойкость и противоопухолевую активность человеческих T-клеток *in vivo* (Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706).

Внутриклеточные сигнальные последовательности в цитоплазматической части TFP по настоящему изобретению могут быть связаны между собой в случайном или определенном порядке. Необязательно, короткий олиго- или полипептидный линкер, например, длиной от 2 до 10 аминокислот (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 аминокислот) может образовать связь между внутриклеточными сигнальными последовательностями.

В одном варианте осуществления глицин-сериновый дублет может использоваться в качестве подходящего линкера. В одном варианте осуществления одна аминокислота, например, аланин, глицин, может использоваться в качестве подходящего линкера.

В одном аспекте TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, может дополнительно содержать второй TFP, например, второй TFP, который включает в себя другой антигенсвязывающий домен, например, для той же мишени (мезотелин) или для другой мишени (например, CD123). В одном варианте осуществления, когда TFP-экспрессирующая клетка содержит два или более различных TFP, антигенсвязывающие домены различных TFP могут быть такими, которые не будут взаимодействовать друг с другом. Например, клетка, экспрессирующая первый и второй TFP, может иметь антигенсвязывающий домен первого TFP, например, в качестве фрагмента, например, scFv, который не будет связываться с антигенсвязывающим доменом второго TFP, например, антигенсвязывающий домен второго TFP представляет собой V_{HH} . В другом аспекте TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, может дополнительно экспрессировать другое вещество, например, вещество, которое повышает активность TFP-экспрессирующей клетки. Например, в одном варианте осуществления вещество может быть таким, которое ингибирует ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, например, PD1, могут в некоторых вариантах осуществления снижать способность TFP-экспрессирующей клетки вызывать иммунный эффекторный ответ. К примерам ингибирующих молекул относится PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR бета. В одном варианте осуществления вещество, ингибирующее ингибирующую молекулу, содержит первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, связанный со вторым полипептидом, который обеспечивает положительный сигнал для клетки, например, внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем документе. В одном варианте осуществления вещество содержит первый полипептид, например, ингибирующей молекулы, такой как PD1, LAG3, CTLA4, CD160, BTLA, LAIR1, TIM3, 2B4 и TIGIT, или фрагмент любого из них (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена любого из них), и второй полипептид, который представляет собой внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем документе (например, содержащий костимулирующий домен (например, 4-1BB, CD27 или CD28, например, как было описано в настоящем документе) и/или домен первичной сигнализации (например, сигнальный домен CD3 дзета, описанный в настоящем документе). В одном варианте осуществления вещество содержит первый полипептид PD1 или его фрагмент (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена PD1) и второй полипептид внутриклеточного сигнального домена, описанного в настоящем документе (например, сигнальный домен CD28, описанный в настоящем документе, и/или сигнальный домен CD3 дзета, описанный в настоящем документе). PD1 представляет собой ингибирующий член семейства CD28 рецепторов, которое также включает в себя CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. PD-1 экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и миелоидных клетках (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75). Было продемонстрировано, что два лиганда для PD1, PD-L1 и PD-L2 снижают активацию Т-клеток при связывании с PD1 (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43). PD-L1 является распространенным в раковых заболеваниях человека (Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094). Иммуносупрессия может быть обратима путем ингибирования локального взаимодействия PD1 с PD-L1.

В одном варианте осуществления вещество содержит внеклеточный домен (ECD) ингибирующей молекулы, например, белок запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1) могут сливаться с трансмембранным доменом и необязательно внутриклеточным сигнальным доменом, таким как 41BB и CD3 дзета (также называемый в настоящем документе как PD1 TFP). В одном варианте осуществления PD1 TFP при использовании в комбинации с TFP против мезотелина, описанным в настоящем документе, улучша-

ет стойкость Т-клетки. В одном варианте осуществления TFP представляет собой PD1 TFP, содержащий внеклеточный домен PD 1. Альтернативно, предлагаются TFP, содержащие антитело или фрагмент антитела, такой как scFv, который специфически связывается с лигандом запрограммированной гибели клеток 1 (PD-L1) или лигандом запрограммированной гибели клеток 2 (PD-L2).

В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается популяция TFP-экспрессирующих Т-клеток, например, TFP-Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция TFP-экспрессирующих Т-клеток содержит смесь клеток, экспрессирующих различные TFP. Например, в одном варианте осуществления популяция TFP-Т-клеток может включать в себя первую клетку, экспрессирующую TFP, имеющий связывающий домен против мезотелина, описанный в настоящем документе, и вторую клетку, экспрессирующую TFP, имеющий другой связывающий домен против мезотелина, например, связывающий домен против мезотелина, описанный в настоящем документе, который отличается от связывающего домена против мезотелина в TFP, экспрессируемом первой клеткой. В качестве другого примера, популяция TFP-экспрессирующих клеток может включать в себя первую клетку, экспрессирующую TFP, который включает в себя связывающий домен против мезотелина, например, как описано в настоящем документе, и вторую клетку, экспрессирующую TFP, который включает в себя антиген-связывающий домен для мишени, отличной от мезотелина (например, другой ассоциированный с опухолью антиген).

В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается популяция клеток, причем по меньшей мере одна клетка в популяции экспрессирует TFP, имеющий домен против мезотелина, описанный в настоящем документе, а вторая клетка экспрессирует другое вещество, например, вещество, которое повышает активность TFP-экспрессирующих клеток. Например, в одном варианте осуществления вещество может быть таким, которое ингибирует ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, например, могут в некоторых вариантах осуществления снижать способность TFP-экспрессирующей клетки установить иммунный эффекторный ответ. К примерам ингибирующих молекул относится PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR бета. В одном варианте осуществления вещество, ингибирующее ингибирующую молекулу, содержит первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, связанный со вторым полипептидом, который обеспечивает положительный сигнал для клетки, например, внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем документе.

В настоящем документе описаны способы получения транскрибированной *in vitro* РНК, кодирующей TFP. Настоящее изобретение также включает в себя кодирующую TFP конструкцию РНК, которую можно непосредственно трансфицировать в клетку. Способ получения мРНК для применения при трансфекции может включать в себя *in vitro* транскрипцию (IVT) матрицы с помощью специально разработанных праймеров с последующим добавлением polyA для получения конструкции, содержащей 3' и 5' нетранслированную последовательность ("UTR"), 5'-кэп и/или участок внутренней посадки рибосомы (IRES), нуклеиновую кислоту, подлежащую экспрессии, и polyA-хвост, как правило, длиной 50-2000 оснований. Полученная таким образом РНК может эффективно трансфицировать различные типы клеток. В одном аспекте матрица включает в себя последовательности для TFP.

В одном аспекте TFP против мезотелина кодируется матричной РНК (мРНК). В одном аспекте мРНК, кодирующая TFP против мезотелина, вводится в Т-клетку для получения TFP-Т-клетки. В одном варианте осуществления транскрибированная *in vitro* РНК TFP может вводиться в клетку как форма временной трансфекции. РНК получают путем транскрипции *in vitro*, используя матрицу, созданную в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Представляющую интерес ДНК из любого источника можно непосредственно преобразовать методом ПЦР в матрицу для *in vitro* синтеза мРНК с помощью соответствующих праймеров и РНК-полимеразы. Источником ДНК может быть, например, геномная ДНК, плазмидная ДНК, фаговая ДНК, кДНК последовательность синтетической ДНК или любой другой подходящий источник ДНК. Желаемой матрицей для транскрипции *in vitro* является TFP по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления ДНК для использования в ПЦР содержит открытую рамку считывания. ДНК может быть получена из встречающейся в природе последовательности ДНК из генома организма. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота может включать в себя некоторые или все из 5' и/или 3' нетранслированных областей (UTR). Нуклеиновая кислота может включать в себя экзоны и интроны. В одном варианте осуществления ДНК для использования в ПЦР представляет собой человеческую последовательность нуклеиновой кислоты. В другом варианте осуществления ДНК для использования в ПЦР представляет собой человеческую последовательность нуклеиновой кислоты, включая 5' и 3' UTR. ДНК может альтернативно представлять собой последовательность искусственной ДНК, которая обычно не экспрессируется у встречающихся в природе организмов. Примером последовательности искусственной ДНК является последовательность, которая содержит часть генов, которые лигируются вместе для образования открытой рамки считывания, которая кодирует гибридный белок. Части ДНК, которые лигируются вместе, могут быть получены от одного организма или от более чем одного организма.

ПЦР применяется для создания матрицы для *in vitro* транскрипции мРНК, которая используется для трансфекции. Способы проведения ПЦР хорошо известны в данной области техники. Праймеры для ис-

пользования в ПЦР разработаны таким образом, чтобы они содержали области, по существу комплементарные областям ДНК, которые будут использоваться в качестве матрицы для ПЦР. Как используется в настоящем документе, "по существу комплементарный" относится к последовательностям нуклеотидов, в которых большинство или все основания в последовательности праймеров являются комплементарными, или одно или более оснований не являются комплементарными или не совпадают. По существу комплементарные последовательности способны к ренатурации или гибридизации с предполагаемой ДНК-мишенью в условиях ренатурации, используемых для ПЦР. Праймеры могут быть разработаны таким образом, чтобы быть по существу комплементарными любой части матрицы ДНК. Например, праймеры могут быть разработаны таким образом, чтобы усиливать часть нуклеиновой кислоты, которая обычно транскрибируется в клетках (открытая рамка считывания), включая 5' и 3' UTR. Праймеры также могут быть разработаны таким образом, чтобы усиливать часть нуклеиновой кислоты, которая кодирует конкретный домен, представляющий интерес. В одном варианте осуществления праймеры разработаны таким образом, чтобы усиливать кодирующий участок человеческой кДНК, включая все или часть 5' и 3' UTR. Праймеры, применяемые в ПЦР, могут быть получены способами синтеза, которые хорошо известны в данной области техники. "Прямые праймеры" - это праймеры, которые содержат участок нуклеотидов, которые по существу комплементарны нуклеотидам на матрице ДНК, которые расположены выше в последовательности ДНК, которая должна быть усилена. "Расположенный выше" используется в настоящем документе для обозначения места 5' в последовательности ДНК, которая должна быть усилена, по отношению к кодирующей цепи. "Обратные праймеры" - это праймеры, которые содержат участок нуклеотидов, которые по существу комплементарны матрице двухцепочечной ДНК, которые расположены ниже в последовательности ДНК, которая должна быть усилена. "Расположенный ниже" используется в настоящем документе для обозначения места 3' в последовательности ДНК, которая должна быть усилена, по отношению к кодирующей цепи.

Любая ДНК-полимераза, используемая в ПЦР, может применяться в способах, описанных в настоящем документе. Реагенты и полимеразы коммерчески доступны из различных источников. Также могут использоваться химические структуры, способные обеспечивать стабильность и/или эффективность трансляции. РНК предпочтительно имеет 5' и 3' UTR. В одном варианте осуществления 5' UTR имеет длину от одного до 3000 нуклеотидов. Длину последовательностей 5' и 3' UTR, которые будут добавлены к кодирующему участку, можно изменить различными способами, включая, помимо прочего, разработку праймеров для ПЦР, которые ренатурируются с различными участками UTR. Используя такой подход, специалист в данной области техники сможет модифицировать длину 5' и 3' UTR, необходимую для достижения оптимальной эффективности трансляции после трансфекции транскрибированной РНК.

5' и 3' UTR могут быть природными, эндогенными 5' и 3' UTR для представляющей интерес нуклеиновой кислоты. Альтернативно, последовательности UTR, которые не являются эндогенными по отношению к представляющей интерес нуклеиновой кислоте, могут быть добавлены путем введения последовательностей UTR в прямые и обратные праймеры либо с помощью любых других модификаций матрицы. Использование последовательностей UTR, которые не являются эндогенными по отношению к представляющей интерес нуклеиновой кислоте, может быть полезным при модификации стабильности и/или эффективности трансляции РНК. Например, известно, что богатые AU элементы в последовательностях 3'UTR могут снижать стабильность мРНК. Таким образом, 3' UTR могут выбираться или разрабатываться таким образом, чтобы повышать стабильность транскрибированной РНК, исходя из свойств UTR, которые хорошо известны в данной области техники.

В одном варианте осуществления 5' UTR может содержать последовательность Козак эндогенной нуклеиновой кислоты. Альтернативно, при добавлении 5' UTR, которая не является эндогенной по отношению к представляющей интерес нуклеиновой кислоте, путем ПЦР, как было описано выше, консенсусная последовательность Козак может быть переделана путем добавления последовательности 5' UTR. Последовательность Козак может повышать эффективность трансляции некоторых транскриптов РНК, однако, похоже, что она не требуется для всех РНК, чтобы обеспечить эффективную трансляцию. Необходимость последовательностей Козак для многих мРНК известна в данной области техники. В других вариантах осуществления 5' UTR может представлять собой 5' UTR РНК-вируса, чей геном РНК является стабильным в клетках. В других вариантах осуществления различные нуклеотидные аналоги могут использоваться в 3' или 5' UTR, чтобы воспрепятствовать деградации мРНК экзонуклеазами.

Чтобы обеспечить синтез РНК из матрицы ДНК без необходимости использовать клонирование генов, промотор транскрипции следует присоединить к матрице ДНК выше транскрибируемой последовательности. Когда последовательность, которая действует в качестве промотора для РНК-полимеразы, добавляется к 5'-концу прямого праймера, промотор РНК-полимеразы становится включенным в продукт ПЦР выше транскрибируемой открытой рамки считывания. В одном предпочтительном варианте осуществления промотор представляет собой промотор полимеразы T7, как описано в любом другом месте настоящего документа. К другим пригодным для использования промоторам относятся, помимо прочего, промоторы РНК-полимеразы T3 и SP6. Консенсусные нуклеотидные последовательности для промоторов T7, T3 и SP6 известны в данной области техники.

В предпочтительном варианте осуществления мРНК содержит кэп на 5-конце и 3'-poly(A)-хвост, которые определяют связывание рибосомы, инициацию трансляции и стабильность мРНК в клетке. На матрице кольцевой ДНК, например, плазмидной ДНК, РНК-полимераза вырабатывает длинный конкатемерный продукт, не пригодный для экспрессии в эукариотических клетках. Транскрипция плазмидной ДНК, линейризованной на конце 3' UTR, приводит к получению мРНК нормального размера, которая не является эффективной при эукариотической трансфекции, даже если после транскрипции она будет полиденитрирована.

На матрице линейной ДНК РНК-полимераза фага T7 может расширять 3'-конец транскрипта за пределы последнего основания матрицы (Schenborn and Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003).

Традиционным способом интеграции polyA/T-участков в матрицу ДНК является молекулярное клонирование. Однако polyA/T-последовательность, интегрированная в плазмидную ДНК, может привести к нестабильности плазмиды, что является причиной того, почему матрицы плазмидной ДНК, полученные из бактериальных клеток, часто в значительной степени загрязнены делециями и другими аберрациями. Это делает процедуры клонирования не только трудоемкими и занимающими много времени, но часто и ненадежными. Поэтому крайне желательным является способ, который позволяет конструировать матрицы ДНК с polyA/T 3'-участком без применения клонирования.

PolyA/T-сегмент транскрипционной матрицы ДНК может быть получен в процессе ПЦР, используя обратный праймер, содержащий polyT-хвост, такой как хвост 100 T (размер может составлять 50-5000 T), или после ПЦР с помощью любого другого способа, включая, помимо прочего, лигирование ДНК или рекомбинацию *in vitro*. Poly(A)-хвосты также обеспечивают стабильность РНК и снижают их деградацию. В целом, длина poly(A)-хвоста положительно коррелирует со стабильностью транскрибированной РНК. В одном варианте осуществления poly(A)-хвост составляет от 100 до 5000 аденозинов.

Poly(A)-хвосты РНК могут быть дополнительно расширены после транскрипции *in vitro*, используя poly(A)-полимеразу, такую как poly(A)-полимераза *E. Coli* (E-PAP). В одном варианте осуществления увеличение длины poly(A)-хвоста со 100 нуклеотидов до от 300 до 400 нуклеотидов приводит приблизительно к двукратному повышению эффективности трансляции РНК. Кроме того, присоединение различных химических групп к 3'-концу может увеличить стабильность мРНК. Такое присоединение может содержать модифицированные/искусственные нуклеотиды, аптамеры и другие соединения. Например, аналоги АТР могут быть включены в poly(A)-хвост с помощью poly(A)-полимеразы. Аналоги АТР могут дополнительно увеличивать стабильность РНК. 5'-кэпы также обеспечивают стабильность молекул РНК. В предпочтительном варианте осуществления РНК, полученные с помощью способов, описанных в настоящем документе, включают в себя 5'-кэп. 5'-кэп получают с помощью методик, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе (Cougot, et al., *Trends in Biochem. Sci.*, 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., *RNA*, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 330:958-966 (2005)).

РНК, полученные с помощью способов, описанных в настоящем документе, могут также содержать последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES). Последовательность IRES может представлять собой любую вирусную, хромосомную или искусственно созданную последовательность, которая иницирует кэп-независимое связывание рибосомы с мРНК и способствует инициации трансляции. Могут быть добавлены любые растворенные вещества для клеточной электропорации, которые могут содержать факторы, способствующие клеточной проницаемости и жизнеспособности, такие как сахара, пептиды, липиды, белки, антиоксиданты и поверхностно-активные вещества.

РНК могут вводить в клетки-мишени, используя любой из целого ряда различных способов, например, коммерчески доступные способы, которые включают в себя, помимо прочего, электропорацию (Amaha Nucleofector-II (Amaha Biosystems, Кельн, Германия)), (ECM 830 (VTX) (Harvard Instruments, Бостон, штат Массачусетс) или электропоратор Gene Pulser II (BioRad, Денвер, штат Колорадо), Multiporator (Eppendorf, Гамбург, Германия), опосредованную катионными липосомами трансфекцию с использованием липофекции, инкапсуляцию полимерами, опосредованную пептидами трансфекцию или биолитические системы доставки частиц, такие как "генные пушки" (см., например, Nishikawa, et al. *Hum Gene Ther.*, 12(8):861-70 (2001).

Конструкции нуклеиновых кислот, кодирующие TFP/

В настоящем изобретении также предлагаются молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие одну или более конструкций TFP, описанных в настоящем документе. В одном аспекте молекула нуклеиновой кислоты представлена в качестве транскрипта матричной РНК. В другом аспекте молекула нуклеиновой кислоты представлена в качестве конструкции ДНК.

Последовательности нуклеиновой кислоты, ориентированные на желаемые молекулы, могут быть получены с помощью рекомбинантных способов, известных в данной области техники, как, например, путем скрининга библиотек из клеток, экспрессирующих ген, путем получения гена из вектора, известного как содержащий этот ген, или путем непосредственного выделения из клеток и тканей, содержащих его, используя стандартные методики. Альтернативно, представляющий интерес ген может быть получен синтетическим путем, а не клонированием.

В настоящем изобретении также предлагаются векторы, в которые встраивается ДНК по настоящему изобретению. Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, являются пригодными инструментами для достижения длительного переноса генов, поскольку они обеспечивают длительную стабильную интеграцию трансгена и его распространение в дочерних клетках. Лентивирусные векторы обладают дополнительным преимуществом перед векторами, полученными из онкоретровирусов, таких как вирусы лейкоза мышей, в том отношении, что они могут трансдуцировать немножающиеся клетки, такие как гепатоциты. Они также обладают дополнительным преимуществом низкой иммуногенности.

В другом варианте осуществления вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую желаемый TFP по настоящему изобретению, представляет собой аденовирусный вектор (A5/35). В другом варианте осуществления экспрессия нуклеиновых кислот, кодирующих TFP, может быть осуществлена с помощью транспозонов, таких как "спящая красавица", "крипер", CAS9 и нуклеаза с цинковыми пальцами (см. June et al. 2009 Nature Reviews Immunol. 9.10: 704-716, включенный в настоящий документ посредством ссылки).

Экспрессирующие конструкции по настоящему изобретению также могут использоваться для иммунизации нуклеиновой кислотой и генной терапии, используя стандартные протоколы доставки генов. Способы доставки генов известны в данной области техники (см., например, патенты США №№ 5,399,346, 5,580,859, 5,589,466, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки). В другом варианте осуществления в изобретении предлагается вектор для генной терапии.

Нуклеиновая кислота может быть клонирована в целый ряд типов векторов. Например, нуклеиновая кислота может быть клонирована в вектор, включая, помимо прочего, плазмиду, фагмид, производное фага, вирус животного и космиду. Векторы, представляющие особый интерес, включают в себя векторы экспрессии, векторы репликации, векторы получения зондов и векторы секвенирования.

Более того, вектор экспрессии можно доставлять в клетку в форме вирусного вектора. Технологии вирусных векторов хорошо известны в данной области техники и описаны, например, у Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY), и в других справочниках по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, используемые в качестве векторов, включают, но не ограничиваются этим, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. В основном, подходящий вектор содержит сайт начала репликации, функциональный по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, подходящие участки узнавания рестрикционных эндонуклеаз и один или более селективируемых маркеров (например, WO 01/96584; WO 01/29058 и патент США № 6,326,193).

Был разработан целый ряд систем на основе вирусов для переноса генов в клетки млекопитающих. Например, ретровирусы обеспечивают удобную платформу для систем доставки генов. Выбранный ген может быть встроен в вектор и упакован в ретровирусные частицы, используя методики, известные в данной области техники. Рекомбинантный вирус затем может быть выделен и доставлен в клетки субъекта *in vivo* или *ex vivo*. Ряд ретровирусных систем известен в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления используются аденовирусные векторы. Ряд аденовирусных векторов известен в данной области техники. В одном варианте осуществления используются лентивирусные векторы.

Дополнительные элементы промотора, например, энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они расположены в области на 30-110 п. о. выше сайта начала, хотя было продемонстрировано, что ряд промоторов также содержит функциональные элементы ниже сайта начала. Часто интервал между элементами промотора является гибким, таким образом, промоторная функция сохраняется, когда элементы инвертируются или перемещаются относительно друг друга. В промоторе тимидинкиназы (ТК) интервал между элементами промотора можно увеличить до 50 п. о., прежде чем активность начнет снижаться. В зависимости от промотора оказывается, что отдельные элементы могут функционировать либо совместно, либо независимо для активации транскрипции.

Примером промотора, способного к экспрессии трансгена TFP в Т-клетке млекопитающего, является промотор EF1a. Нативный промотор EF1a стимулирует экспрессию альфа-субъединицы комплекса фактора элонгации-1, который отвечает за ферментную доставку аминоксил-тРНК в рибосому. Промотор EF1a широко используется в экспрессионных плаزمидных млекопитающих и продемонстрировал эффективность при стимуляции экспрессии TFP из трансгенов, клонированных в лентивирусный вектор (см., например, Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)). Другим примером промотора является последовательность немедленно раннего промотора цитомегаловируса (ЦМВ). Эта последовательность промотора является последовательностью сильного конститутивного промотора, способной стимулировать высокие уровни экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально с ней связанной. Однако могут также использоваться и другие последовательности конститутивного промотора, включая, помимо прочего, ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор длинных концевых повторов (ДКП) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, немедленно ранний промотор вируса Эпштейна-Барр, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы человеческого гена, такие как, помимо прочего, промотор актина, промотор миозина, промотор фактора элонгации-1, промотор гемогло-

бина и промотор креатинкиназы. Более того, настоящее изобретение не должно ограничиваться использованием конститутивных промоторов. Индуцибельные промоторы также рассматриваются как часть настоящего изобретения. Использование индуцибельных промоторов обеспечивает молекулярный переключатель, способный запускать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, когда подобная экспрессия является желаемой, или останавливать экспрессию, когда она не является желаемой. К примерам индуцибельных промоторов относится, помимо прочего, промотор металлотионина, промотор глюкокортикоидов, промотор прогестерона и регулируемый тетрациклином промотор. Чтобы оценить экспрессию полипептида TFP или его частей, вектор экспрессии, вводимый в клетку, может также содержать выбираемый маркерный ген, репортерный ген или и тот, и другой, чтобы способствовать идентификации и выбору экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые необходимо подвергнуть трансфекции или инфицировать вирусными векторами. В других аспектах селективный маркер может переноситься отдельным участком ДНК и использоваться в процедуре совместной трансфекции. Как селективные маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями, чтобы обеспечить экспрессию в клетке-хозяине. К пригодным для использования селективным маркерам относятся, например, устойчивые к антибиотикам гены, такие как нео и т. п.

Репортерные гены используются для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. В целом, репортерный ген представляет собой ген, который не присутствует или не экспрессируется в реципиентном организме или ткани и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется каким-либо легко определяемым свойством, например, ферментной активностью. Экспрессию репортерного гена анализируют в подходящее время после введения ДНК в реципиентные клетки. Подходящие репортерные гены могут включать в себя гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфеникол-ацетилтрансферазу, секретрируемую щелочную фосфатазу или ген зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Подходящие системы экспрессии хорошо известны и могут быть получены, используя известные методики, или приобретены на коммерческой основе. В целом, конструкция с минимальным 5' фланкирующим участком, демонстрирующая самый высокий уровень экспрессии репортерного гена, идентифицируется как промотор. Такие промоторные участки могут быть связаны с репортерным геном и использоваться для оценки способности веществ модулировать активированную промотором транскрипцию.

Способы введения и экспрессии генов в клетке известны в данной области техники. В контексте вектора экспрессии вектор может быть легко введен в клетку-хозяина, например, клетку млекопитающего, бактериальную, дрожжевую клетку или клетку насекомого с помощью любого способа в данной области техники. Например, вектор экспрессии может быть перенесен в клетку-хозяина физическим, химическим или биологическим путем.

К физическим способам введения полинуклеотида в клетку-хозяина относится осаждение фосфатом кальция, липофекция, бомбардировка частицами, микроинъекция, электропорация и т. п. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области техники (см., например, Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY). Одним способом введения полинуклеотида в клетку-хозяина является трансфекция фосфатом кальция.

К биологическим способам введения представляющего интерес полинуклеотида в клетку-хозяина относится использование векторов ДНК и РНК. Вирусные векторы и особенно ретровирусные векторы стали наиболее широко используемым способом внедрения генов в клетки млекопитающих, например, клетки человека. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивируса, поксвирусов, вируса простого герпеса I типа, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т. п. (см., например, патенты США №№ 5 350 674 и 5 585 362).

К химическим способам введения полинуклеотида в клетку-хозяина относятся системы коллоидной дисперсии, такие как комплексы макромолекул, нанокapsулы, микросферы, гранулы, и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Примером коллоидной системы, используемой в качестве средства доставки *in vitro* и *in vivo*, является липосома (например, искусственная мембранная везикула). Доступны другие способы направленной доставки нуклеиновых кислот существующего уровня техники, такие как доставка полинуклеотидов с нацеленными наночастицами или другая подходящая система доставки субмикронных элементов.

В случае использования невирусной системы доставки примером средства доставки является липосома. Предусмотрено использование липидных составов для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*). В другом аспекте нуклеиновая кислота может быть связана с липидом. Нуклеиновая кислота, связанная с липидом, может быть инкапсулирована в водном внутреннем пространстве липосомы, рассеяна по липидному бислою липосомы, присоединена к липосоме посредством линкерной молекулы, которая связана как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, заключена в липосоме, связана в комплекс с липосомой, диспергирована в растворе, содержащем липид, смешана с липидом, объединена с липидом, может содержаться в виде суспензии в липиде, содержатся или быть свя-

зана в комплекс с мицеллой или любым другим образом связана с липидом. Композиции, связанные с липидом, липидом/ДНК или липидом/вектором экспрессии, не ограничиваются какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут присутствовать в бислойной структуре, как мицеллы, или иметь "разрушенную" структуру. Также они могут просто быть рассеяны в растворе, предположительно образуя агрегаты, не имеющие одинаковых размера или формы. Липиды представляют собой жирные вещества, которые могут быть природными или синтетическими липидами. Например, липиды включают в себя жирные капли, которые встречаются естественным образом в цитоплазме, а также класс соединений, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминокислоты и альдегиды.

Подходящие для использования липиды можно получить из коммерческих источников. Например, димиристилфосфатидилхолин ("DMPC") можно получить от компании Sigma, Сент-Луис, штат Миссури; дицетилфосфат ("DCP") можно получить от компании K & K Laboratories (Плейнвью, штат Нью-Йорк); холестерин ("Choi") можно получить от компании Calbiochem-Behring; димиристилфосфатидилглицерин ("DMPG") и другие липиды можно получить от компании Avanti Polar Lipids, Inc. (Бирмингем, штат Алабама). Исходные растворы липидов в хлороформе или хлороформе/метаноле можно хранить приблизительно при температуре -20°C. Хлороформ используют в качестве единственного растворителя, поскольку он легче испаряется, чем метанол. "Липосома" представляет собой общий термин, охватывающий различные однослойные и многослойные липидные носители, получаемые посредством образования заключенных липидных бислоев или агрегатов. Липосомы можно охарактеризовать, как содержащие везикулярные структуры с фосфолипидной бислойной мембраной и внутренней водной средой. Многослойные липосомы содержат много липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются спонтанно, когда фосфолипиды суспендируют в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются самоперестройке до образования замкнутых структур и захватывают воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh et al., 1991, *Glycobiology* 5: 505-10). Однако также охватываются композиции, которые имеют структуры в растворе, отличные от нормальной везикулярной структуры. Например, липиды могут принимать мицеллярную структуру или существовать только в виде неоднородных агрегатов липидных молекул. Также предусмотрены комплексы липофектамин-нуклеиновая кислота. Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина или иным образом подвергания клетки воздействию ингибитора по настоящему изобретению, с целью подтверждения наличия последовательности рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине можно проводить ряд анализов. Такие анализы включают в себя, например, "молекулярно-биологические" анализы, хорошо известные специалистам в данной области техники, такие как саузерн- и нозерн-блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; "биохимические" анализы, такие как выявление наличия или отсутствия конкретного пептида, например, иммунологическими способами (ИФА и вестерн-блоттинги) или путем анализов, описываемых в настоящем документе, для идентификации веществ, входящих в объем настоящего изобретения.

В настоящем изобретении дополнительно предлагается вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP. В одном аспекте вектор TFP может быть непосредственно трансдуцирован в клетку, например, Т-клетку. В другом аспекте вектор представляет собой вектор клонирования или экспрессии, например, вектор, включающий в себя, помимо прочего, одну или более плазмид (например, экспрессионные плазмиды, векторы клонирования, мини-кольца, мини-векторы, двойные микрохромосомы), конструкции ретровирусных и лентивирусных векторов. В одном аспекте вектор способен экспрессировать конструкцию TFP в Т-клетках млекопитающих. В другом аспекте Т-клетка млекопитающего является Т-клеткой человека.

Источники Т-клеток/

Перед размножением и генетической модификацией у субъекта получают источник Т-клеток. Термин "субъект" предназначен для включения в себя живых организмов, у которых может быть вызван иммунный ответ (например, млекопитающие). К примерам субъектов относятся люди, собаки, кошки, мыши, крысы и их трансгенные виды. Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань вилочковой железы, ткань области инфекции, асциты, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В определенных аспектах настоящего изобретения можно использовать любое количество линий Т-клеток, доступных в данной области техники. В некоторых аспектах настоящего изобретения Т-клетки могут быть получены из единицы крови, собранной у субъекта с использованием ряда методик, известных специалисту в данной области техники, таких как отделение Ficoll™. В одном предпочтительном аспекте клетки из циркулирующей крови индивидуума получают посредством афереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядерные лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. В одном аспекте клетки, собранные посредством афереза, могут быть промыты для удаления фракции плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для дальнейших этапов обработки. В одном аспекте настоящего изобретения клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В альтернативном аспекте раствор для промывания не содержит

кальций и может не содержать магний или может не содержать многие, если не все, двухвалентные катионы. Начальные этапы активации при отсутствии кальция могут привести к усиленной активации. Как будет понятно специалистам в данной области техники, этап промывания можно осуществить способами, известными специалистам в данной области техники, такими как с использованием полуавтоматической "проточной" центрифуги (например, клеточного процессора Cobe 2991, Baxter CytoMate или Haemonetics Cell Saver 5) в соответствии с инструкциями производителя. После промывания клетки могут быть повторно суспендированы в различных биосовместимых буферах, таких как, например, не содержащий Ca, не содержащий Mg PBS, PlasmaLyte A, или другом солевом растворе с буфером или без него. Альтернативно, можно удалять нежелательные компоненты образца для афереза и непосредственно ресуспендировать клетки в культуральной среде.

В одном аспекте Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови посредством лизиса эритроцитов и деплеции моноцитов, например, посредством центрифугирования в градиенте PERCOLL™ или противоточной центрифужной элютриации. Конкретная субпопуляция Т-клеток, таких как CD3⁺, CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клетки, может быть дополнительно выделена посредством методик положительной или отрицательной селекции. Например, в одном аспекте Т-клетки выделяют посредством инкубации с гранулами, конъюгированными с антителами к CD3/CD28 (например, 3×28), такими как DYNABEADS™ M-450 CD3/CD28 T, в течение периода времени, достаточного для позитивной селекции желаемых Т-клеток. В одном аспекте период времени составляет около 30 минут. В дополнительном аспекте период времени находится в диапазоне от 30 минут до 36 часов или более для всех целых значений в этом диапазоне. В дополнительном аспекте период времени составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 часов. В еще одном предпочтительном аспекте период времени составляет от 10 до 24 часов. В одном аспекте время инкубации составляет 24 часа. Большее время инкубации можно использовать для выделения Т-клеток в любой ситуации, когда Т-клеток меньше по сравнению с другими типами клеток, как при выделении проникающих в опухоль лимфоцитов (TIL) из опухолевой ткани или у иммунокомпрометированных индивидов. Более того, использование большего времени инкубации может повышать эффективность захвата CD8⁺ Т-клеток. Таким образом, простым уменьшением или увеличением времени связывания Т-клеток с гранулами CD3/CD28 и/или увеличением или уменьшением соотношения гранул к Т-клеткам (как описано ниже в настоящем документе) можно предпочтительно проводить положительный или отрицательный отбор субпопуляций Т-клеток в начале культивирования или в другие моменты времени в течение процесса. Кроме того, повышая или понижая соотношение антител к CD3 и/или к CD28 на гранулах или другой поверхности, можно предпочтительно проводить положительный или отрицательный отбор субпопуляций Т-клеток в начале культивирования или в другие желаемые моменты времени. Специалисту в данной области техники будет понятно, что в контексте настоящего изобретения также можно использовать многочисленные этапы селекции. В определенных аспектах может быть желательным проведение процедуры селекции и использование "неотобранных" клеток в процессе активации и экспансии. "Неотобранные" клетки также можно подвергать дополнительным этапам селекции. Обогащение популяции Т-клеток посредством отрицательной селекции может быть достигнуто с комбинацией антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для отрицательно отобранных клеток. Один способ представляет собой сортировку и/или селекцию клеток посредством отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, в которых применяют смесь моноклональных антител, направленных на маркеры поверхности клетки, присутствующие на отрицательно отобранных клетках. Например, для обогащения CD4⁺ клеток посредством отрицательной селекции, смесь моноклональных антител обычно включает в себя антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В определенных аспектах может быть желательным обогащение или положительная селекция регуляторных Т-клеток, которые обычно экспрессируют CD4⁺, CD25⁺, CD62Lhi, GITR⁺ и FoxP3⁺. Альтернативно, в определенных аспектах регуляторные Т-клетки деплецируют посредством гранул, конъюгированных с антителом к CD25, или другим аналогичным способом селекции.

В одном варианте осуществления можно выбрать такую популяцию Т-клеток, которая экспрессирует один или более из IFN-γ, TNF-альфа, IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, гранзима В и перфорина, или другие соответствующие молекулы, например, другие цитокины. Способы скрининга на экспрессию клеток можно определить, например, с помощью способов, описанных в публикации согласно РСТ №: WO 2013/126712.

Для выделения желаемой популяции клеток посредством положительной или негативной селекции можно изменять концентрацию клеток и поверхность (например, частиц, таких как гранулы). В определенных аспектах может быть желательным существенное уменьшение объема, в котором гранулы и клетки смешивают друг с другом (например, увеличение концентрации клеток) для обеспечения максимального контактирования клеток и гранул. Например, в одном аспекте используют концентрацию 2 миллиарда клеток/мл. В одном аспекте используют концентрацию 1 миллиард клеток/мл. В дополнительном аспекте используют концентрацию более чем 100 миллионов клеток/мл. В дополнительном аспекте используют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В еще одном аспекте используют концентрацию клеток от 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В

дополнительных аспектах могут использовать концентрацию 125 или 150 миллионов клеток/мл. Использование высоких концентраций может приводить к увеличенному выходу клеток, активации клеток и экспансии клеток. Более того, использование высоких концентраций клеток обеспечивает более эффективный захват клеток, которые могут слабо экспрессировать представляющие интерес антигены-мишени, такие как CD28-отрицательные Т-клетки, или из образцов, где содержится много опухолевых клеток (например, кровь больного лейкозом, опухолевая ткань и т. д.). Такие популяции клеток могут иметь терапевтическое значение, и их получение является желательным. Например, использование высокой концентрации клеток обеспечивает более эффективную селекцию CD8⁺ Т-клеток, которые обычно слабо экспрессируют CD28.

В родственном аспекте может быть желательным использование более низких концентраций клеток. Значительным разведением смеси Т-клеток и поверхности (например, частиц, таких как гранулы) сводят к минимуму взаимодействия между частицами и клетками. Это позволяет отбирать клетки, которые экспрессируют высокие количества желаемых антигенов, которые должны связываться с частицами. Например, CD4⁺ Т-клетки экспрессируют высокие уровни CD28, и их можно более эффективно захватывать по сравнению с CD8⁺ Т-клетками в разведенных концентрациях. В одном аспекте используемая концентрация клеток составляет 5×10^6 /мл. В других аспектах используемая концентрация может составлять от около 1×10^5 /мл до 1×10^6 /мл и любое целое значение в этом диапазоне. В других аспектах клетки можно инкубировать на ротационном шейкере в течение периодов времени различной продолжительности при различных скоростях при температуре 2-10°C или при комнатной температуре.

Т-клетки для стимуляции также можно замораживать после этапа промывания. Не желая быть связанными теорией, этап замораживания и последующего размораживания обеспечивает более однородный продукт в результате удаления гранулоцитов и до некоторой степени моноцитов в популяции клеток. После этапа промывания, на котором удаляют плазму и тромбоциты, клетки можно суспендировать в замораживающем растворе. Несмотря на то, что многие замораживающие растворы и параметры известны в данной области техники и будут являться пригодными в этом контексте, один из способов включает в себя использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% сывороточного альбумина человека, или культуральной среды, содержащей 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% сывороточного альбумина человека и 7,5% DMSO, или 31,25% Plasmalyte-A, 31,25% декстрозы 5%, 0,45% NaCl, 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% сывороточного альбумина человека и 7,5% DMSO, или других подходящих для замораживания клеток сред, содержащих, например, Hespan и PlasmaLyte A, затем клетки замораживают до -80°C при скорости 1 в минуту и хранят в газовой фазе в резервуаре для хранения жидкого азота. Можно использовать другие способы контролируемого замораживания, а также неконтролируемого замораживания непосредственно при температуре -20°C или в жидком азоте. В определенных аспектах криоконсервированные клетки размораживают и промывают, как описано в настоящем документе, и оставляют отстаиваться в течение одного часа при комнатной температуре перед активацией способами по настоящему изобретению.

В контексте настоящего изобретения также предусмотрен сбор образцов крови или продукта афереза у субъекта в течение периода времени перед тем, когда могут потребоваться размноженные клетки, как описано в настоящем документе. В связи с этим, источник клеток, подлежащих размножению, можно собирать в любой необходимый момент времени, и желаемые клетки, такие как Т-клетки, можно выделять и замораживать для дальнейшего использования в Т-клеточной терапии для любого количества заболеваний или состояний, для которых Т-клеточная терапия будет эффективной, таких как заболевания, описанные в настоящем документе. В одном аспекте образец крови или продукт афереза получают, как правило, у здорового субъекта. В определенных аспектах образец крови или продукт афереза получают, как правило, у здорового субъекта, который подвержен риску развития заболевания, но у которого еще не развилось заболевание, и представляющие интерес клетки выделяют и замораживают для дальнейшего использования. В определенных аспектах Т-клетки можно подвергать размножению, замораживать и использовать позже. В определенных аспектах образцы собирают у пациента сразу же после диагностики конкретного заболевания, как описано в настоящем документе, но до начала какого-либо лечения. В дополнительном аспекте клетки выделяют из образца крови или продукта афереза у субъекта до начала проведения любого количества подходящих способов лечения, включая, помимо прочего, лечение средствами, такими как натализумаб, эфализумаб, противовирусные средства, химиотерапию, облучение, иммунодепрессивные средства, такие как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антитела или другие иммунодеструктивные средства, такие как алемтузумаб, антитела к CD3, цитоксан, флударабин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, FR901228 и облучение.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения Т-клетки получают у пациента непосредственно после лечения, в результате которого у субъекта остаются функциональные Т-клетки. В связи с этим наблюдали, что после определенных видов лечения раковых заболеваний, в частности, видов лечения с использованием лекарственных средств, которые повреждают иммунную систему, вскоре после лечения в течение периода, когда пациенты обычно восстанавливаются после лечения, качество получаемых Т-

клеток может являться оптимальным или улучшенным в отношении их способности к размножению *ex vivo*. Аналогичным образом, после манипуляций *ex vivo* с использованием способов, описываемых в настоящем документе, эти клетки могут находиться в предпочтительном состоянии для повышенного прививания и размножения *in vivo*. Таким образом, в контексте настоящего изобретения предусмотрен сбор клеток крови, включая Т-клетки, дендритные клетки или другие клетки гемопоэтической линии, во время этой фазы восстановления. Более того, в определенных аспектах можно использовать мобилизацию (например, мобилизацию с GM-CSF) и схемы симптоматического лечения для создания состояния у субъекта, при котором благоприятной является репопуляция, рециркуляция, регенерация и/или размножение конкретных типов клеток, особенно в течение определенного временного окна после терапии. Иллюстративные типы клеток включают в себя Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки и другие клетки иммунной системы. Активация и размножение Т-клетки можно активировать и подвергать размножению, как правило, используя способы, как описано, например, в патентах США №№ 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041 и 7,572,631.

Как правило, Т-клетки по настоящему изобретению можно подвергать размножению путем приведения в контакт с поверхностью, содержащей прикрепленное к ней вещество, которое стимулирует ассоциированный с комплексом CD3/TCR сигнал, и лиганд, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В частности, популяции Т-клеток могут быть стимулированы, как описано в настоящем документе, таким образом, как приведение в контакт с антителом к CD3, или его антигенсвязывающим фрагментом, или антителом к CD2, иммобилизованным на поверхности, или приведение в контакт с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в сочетании с кальциевым ионофором. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток используют лиганд, который связывается со вспомогательной молекулой. Например, популяцию Т-клеток можно приводить в контакт с антителом к CD3 и антителом к CD28 в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации Т-клеток. Для стимуляции пролиферации CD4⁺ Т-клеток или CD8⁺ Т-клеток можно использовать антитело к CD3 и антитело к CD28. Можно использовать примеры антитела к CD28, включающие в себя 9.3, BT3, XR-CD28 (Diacclone, Besangon, Франция), как и другие способы, общеизвестные в данной области техники (Berg et al., *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, 1998; Naanen et al., *J. Exp. Med.* 190(9):13191328, 1999; Garland et al., *J. Immunol. Meth.* 227(1-2):53-63, 1999).

Т-клетки, которые подвергали стимуляции в течение различных периодов времени, могут обладать различными характеристиками. Например, типичные продукты мононуклеарных клеток крови или продукты мононуклеарных клеток периферической крови после афереза содержат популяцию хелперных Т-клеток (ТН, CD4⁺), которая больше, чем популяция цитотоксических или супрессорных Т-клеток (ТС, CD8⁺). Размножение Т-клеток *ex vivo* посредством стимуляции рецепторов CD3 и CD28 приводит к получению популяции Т-клеток, которая до приблизительно 8-9 суток состоит преимущественно из ТН-клеток, тогда как приблизительно через 8-9 суток популяция Т-клеток содержит возрастающую популяцию ТС-клеток. Соответствующим образом, в зависимости от цели лечения предпочтительной может являться инфузия субъекту популяции Т-клеток, содержащей преимущественно ТН-клетки. Аналогично, если была выделена антиген-специфическая субпопуляция ТС-клеток, может быть полезно размножение этой субпопуляции до большего количества.

Более того, в дополнение к маркерам CD4 и CD8 во время процесса размножения клеток значительно изменяются другие фенотипические маркеры, но в значительной степени воспроизводимо. Таким образом, такая воспроизводимость обеспечивает возможность адаптации продукта активированных Т-клеток к конкретным целям.

После создания TFP против мезотелина можно использовать различные анализы для оценки активности молекулы, такой как, помимо прочего, способность к размножению Т-клеток после стимуляции антигеном, сохранению размножения Т-клеток в отсутствие рестимуляции, а также противораковой активности в соответствующих моделях *in vitro* и животных моделях. Анализы для оценки эффектов TFP против мезотелина описаны более подробно далее.

Анализ вестерн-блоттинга экспрессии TFP в первичных Т-клетках может быть использован для выявления присутствия мономеров и димеров (см., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). Если описывать очень кратко, Т-клетки (смесь 1:1 CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток), экспрессирующие TFP, размножаются *in vitro* в течение более чем 10 дней с последующим лизисом и ДСН-ПААГ-электрофорезом в восстанавливающих условиях. TFP выявляют с помощью вестерн-блоттинга, используя антитело к цепи TCR. Аналогичные субпопуляции Т-клеток используют для анализа ДСН-ПААГ-электрофореза в невосстанавливающих условиях, чтобы обеспечить оценку формирования ковалентного димера.

Размножение TFP⁺ Т-клеток *in vitro* после стимуляции антигеном может быть измерено с помощью проточной цитометрии. Например, смесь CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток стимулируют с помощью альфаCD3/альфаCD28 и APC с последующей трансдукцией лентивирусными векторами, экспрессирующими ЗФБ, под контролем промоторов, подлежащих анализу. К примерам промоторов относятся промоторы гена CMV IE, EF-1 альфа, убиквитина С или фосфоглицерокиназы (ФГК). Флуоресценцию ЗФБ оце-

нивают на 6 день культивирования в субпопуляциях CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток с помощью проточной цитометрии (см., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). Альтернативно, смесь CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток стимулируют с помощью магнитных гранул, покрытых альфаCD3/альфаCD28, на день 0 и трансдуцируют с помощью TFP на день 1, используя бицистронный лентивирусный вектор, экспрессирующий TFP, вместе с УЗФБ с помощью последовательности ухода с рибосомы 2A. Культуры повторно стимулируют мезотелин⁺ клетками K562 (K562-мезотелин), клетками K562 дикого типа (K562 дикого типа) или клетками K562, экспрессирующими hCD32 и 4-1BBL, в присутствии антитела к CD3 и CD28 (K562-BBL-3/28) после промывания. Экзогенный IL-2 добавляют к культурам через день в концентрации 100 МЕ/мл. ЗФБ⁺ Т-клетки подсчитывают с помощью проточной цитометрии, используя подсчет на основе гранул (см., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). Устойчивое размножение TFP⁺ Т-клеток в отсутствие повторной стимуляции также может быть измерено (см., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). Вкратце, средний объем Т-клеток (fl) измеряют на день 8 культивирования, используя счетчик частиц Coulter Multisizer III, после стимуляции с помощью магнитных гранул, покрытых альфаCD3/альфаCD28, на день 0 и трансдукции с помощью указанного TFP на день 1.

Для измерения активности TFP-Т также можно использовать животные модели. Например, ксенотрансплантатная модель с использованием человеческих TFP⁺ Т-клеток, специфических к мезотелину, для лечения рака у мышей с иммунодефицитом (см., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). Если описывать очень кратко, после установления рака мышей рандомизируют в группы лечения. Различное количество сконструированных Т-клеток совместно инъецируют в соотношении 1:1 мышам NOD/SCID/ γ -/- с раковым заболеванием. Количество копий каждого вектора в ДНК селезенки, полученное у мышей, оценивают в различные моменты времени после инъекции Т-клеток. Животных оценивают на предмет ракового заболевания с еженедельными интервалами. Значения числа мезотелин⁺ раковых клеток периферической крови измеряют у мышей, которым инъецируют альфамезотелин-дзета TFP⁺ Т-клетки или ложнотрансдуцированные Т-клетки. Кривые выживаемости в группах сравнивают посредством логарифмического рангового теста. Кроме того, также можно проанализировать абсолютные значения CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток периферической крови через 4 недели после инъекции Т-клеток мышам NOD/SCID/ γ -/-. Мышам инъецируют раковые клетки, а через 3 недели инъецируют Т-клетки, сконструированные с возможностью экспрессии TFP с помощью бицистронного лентивирусного вектора, который кодирует TFP, связанный с УЗФБ. Т-клетки нормализуют к 45-50% введенных ЗФБ⁺ Т-клеток путем смешивания с ложнотрансдуцированными клетками перед инъекцией и подтверждают с помощью проточной цитометрии. Животных оценивают на предмет ракового заболевания с еженедельными интервалами. Кривые выживаемости в группах TFP⁺ Т-клеток сравнивают посредством логарифмического рангового теста.

Можно оценить дозозависимый ответ на лечение TFP (см., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). Например, периферическую кровь получают через 35-70 дней после установления рака у мышей, инъецированных на 21 день TFP-Т-клетками, эквивалентным количеством ложнотрансдуцированных Т-клеток или неинъецированных Т-клетками. У мышей из каждой группы случайным образом берут кровь для определения числа мезотелин⁺ раковых клеток периферической крови, а затем животных умерщвляют на 35 и 49 день. Оставшихся животных оценивают на 57 и 70 день.

Оценка пролиферации клеток и выработки цитокинов была описана ранее, например, у Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). Вкратце, оценка TFP-опосредованной пролиферации осуществляется на планшетах для микротитрования путем смешивания промытых Т-клеток с клетками, экспрессирующими мезотелин, или CD32 и CD137 (KT32-BBL) для получения конечного соотношения Т-клеток с клетками, экспрессирующими мезотелин, равного 2:1. Клетки, экспрессирующие мезотелин, перед использованием облучают гамма-излучением. Моноклональные антитела к CD3 (клон ОКТ3) и CD28 (клон 9.3) добавляют к культурам с клетками KT32-BBL в качестве положительного контроля для стимуляции пролиферации Т-клеток, поскольку эти сигналы поддерживают длительное размножение CD8⁺ Т-клеток *ex vivo*. Т-клетки в культурах подсчитывают с помощью флуоресцирующих гранул CountBright™ (Invitrogen) и проточной цитометрии, как описано у производителя. TFP⁺ Т-клетки идентифицируют путем экспрессии ЗФБ, используя Т-клетки, которые были сконструированы с помощью экспрессирующих TFP лентивирусных векторов, связанных с УЗФБ-2A. В случае TFP⁺ Т-клеток, которые не экспрессируют ЗФБ, TFP⁺ Т-клетки определяют с помощью биотинилированного рекомбинантного белка мезотелина и вторичного конъюгата авидин-PE. Экспрессию CD4⁺ и CD8⁺ на Т-клетках также одновременно определяют с помощью специфических моноклональных антител (BD Biosciences). Измерения цитокинов выполняют на надосадочных жидкостях, собранных через 24 часа после повторной стимуляции, используя набор для количественного определения растворимых форм цитокинов human TN1/TN2 cytokine cytometric bead array kit (BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя. Флуоресценцию оценивают с помощью проточного цитометра FACScalibur, а данные анализируют в соответствии с инструкциями производителя. Цитотоксичность могут оценивать с помощью стандартного анализа высвобождения ⁵¹Cr (см., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). Вкратце, клетки-

мишени загружают ^{51}Cr (в качестве NaCrO_4 , New England Nuclear) при температуре 37°C в течение 2 часов с частым перемешиванием, дважды промывают в полной среде RPMI и высевают на планшеты для микротитрования. Эффекторные Т-клетки смешивают с клетками-мишенями в лунках в полной среде RPMI в различных соотношениях эффекторных клеток с клетками-мишенями (Е:Т). Готовят также дополнительные лунки, содержащие только среду (спонтанное высвобождение, СВ) или 1% раствор детергента тритон-Х 100 (полное высвобождение, ПВ). Через 4 часа инкубации при температуре 37°C собирают надосадочную жидкость из каждой лунки. Затем измеряют высвобожденный ^{51}Cr с помощью счетчика гамма-частиц (Packard Instrument Co., Уолтем, штат Массачусетс). Каждое условие выполняют по меньшей мере в трех повторностях, а процентное содержание лизиса подсчитывают, используя следующую формулу: $\% \text{ лизиса} = (\text{ЭВ}-\text{СВ})/(\text{ПВ}-\text{СВ})$, где ЭВ представляет среднее значение высвобожденного ^{51}Cr для каждого экспериментального условия.

Технологии визуализации могут использоваться для оценки специфической миграции и пролиферации TFP в животных моделях опухоленосителей. Такие анализы были описаны, например, у Barrett et al., Human Gene Therapy 22:1575-1586 (2011). Вкратце, мышам NOD/SCID/ $\gamma\text{c}/-$ (NSG) в/в инъецируют раковые клетки, затем через 7 дней - Т-клетки через 4 часа после электропорации конструкциями TFP. Т-клетки стабильно трансфицируют лентивирусной конструкцией, чтобы экспрессировать люциферазу светлячка, и мышей визуализируют на предмет биолуминесценции. Альтернативно, терапевтическую эффективность и специфичность одной инъекции TFP+ Т-клеток в раковой ксенотрансплантатной модели можно измерить следующим образом: мышам NSG инъецируют раковые клетки, трансдуцированные с возможностью стабильно экспрессировать люциферазу светлячка, с последующей одной инъекцией в хвостовую вену Т-клеток, электропорированных TFP мезотелина через 7 дней. Животных визуализируют в различные моменты времени после инъекции. Например, можно получить тепловые карты плотности фотонов ракового заболевания, положительного на люциферазу светлячка, у репрезентативных мышей на 5 день (за 2 дня до лечения) и на 8 день (через 24 часа после TFP+ лейкоцитов периферической крови). Для оценки конструкций TFP против мезотелина по настоящему изобретению также могут применяться другие анализы, включая анализы, описанные в разделе "Примеры" настоящего документа, а также анализы, известные в данной области техники.

Терапевтическое применение.

Заболевания и/или нарушения, связанные с мезотелином.

В одном аспекте в настоящем изобретении предлагаются способы лечения заболевания, связанного с экспрессией мезотелина. В одном аспекте в настоящем изобретении предлагаются способы лечения заболевания, причем часть опухоли является мезотелин-отрицательной, а часть опухоли - мезотелин-положительной. Например, TFP по настоящему изобретению пригоден для лечения субъектов, которые получили лечение заболевания, связанного с повышенной экспрессией мезотелина, причем субъект, который получил лечение повышенных уровней мезотелина, демонстрирует заболевание, связанное с повышенными уровнями мезотелина. В одном аспекте в настоящем изобретении предлагается вектор, содержащий TFP против мезотелина, функционально связанный с промотором для экспрессии в Т-клетках млекопитающего. В одном аспекте в настоящем изобретении предлагается рекомбинантная Т-клетка, экспрессирующая TFP мезотелина для использования при лечении мезотелин-экспрессирующих опухолей, причем рекомбинантная Т-клетка, экспрессирующая TFP мезотелина, называется TFP-Т мезотелина. В одном аспекте TFP-Т мезотелина по настоящему изобретению способна вступать в контакт с опухолевой клеткой с по меньшей мере одним TFP мезотелина по настоящему изобретению, экспрессирующимся на ее поверхности, таким образом, что TFP-Т нацеливается на опухолевую клетку, и рост опухоли ингибируется.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста мезотелин-экспрессирующей опухолевой клетки, включающему в себя контактирование опухолевой клетки с TFP-Т-клеткой мезотелина по настоящему изобретению таким образом, что TFP-Т активируется в ответ на антиген и нацеливается на раковую клетку, при этом рост опухоли ингибируется.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения ракового заболевания у субъекта. Способ включает в себя введение субъекту TFP-Т-клетки мезотелина по настоящему изобретению таким образом, что раковое заболевание лечится у субъекта. Примером ракового заболевания, подлежащего лечению TFP-Т-клеткой мезотелина по настоящему изобретению, является рак, связанный с экспрессией мезотелина. В одном аспекте рак представляет собой мезотелиому. В одном аспекте рак представляет собой рак поджелудочной железы. В одном аспекте рак представляет собой рак яичников. В одном аспекте рак представляет собой рак желудка. В одном аспекте рак представляет собой рак легких. В одном аспекте рак представляет собой рак эндометрия. В некоторых вариантах осуществления терапия с помощью TFP мезотелина может применяться в комбинации с одним или более дополнительных видов лечения. Настоящее изобретение включает в себя тип клеточной терапии, при которой Т-клетки генетически модифицируют для экспрессии TFP, и TFP-экспрессирующую Т-клетку вводят нуждающемуся в этом реципиенту. Вводимая клетка способна уничтожать опухолевые клетки у реципиента. В отличие от терапии антителами, TFP-экспрессирующие Т-клетки способны к репликации *in vivo*, что приводит к

длительной стойкости, что может привести к устойчивому контролю над опухолью. В различных аспектах вводимые пациенту Т-клетки или их потомство сохраняются у пациента в течение по меньшей мере одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, одиннадцати месяцев, двенадцати месяцев, тринадцати месяцев, четырнадцати месяцев, пятнадцати месяцев, шестнадцати месяцев, семнадцати месяцев, восемнадцати месяцев, девятнадцати месяцев, двадцати месяцев, двадцати одного месяца, двадцати двух месяцев, двадцати трех месяцев, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет после введения Т-клетки пациенту. Настоящее изобретение также включает в себя тип клеточной терапии, при которой Т-клетки модифицируют, например, с помощью транскрибированной *in vitro* РНК, для временной экспрессии TFP, и TFP-экспрессирующую Т-клетку вводят нуждающемуся в этом реципиенту. Вводимая клетка способна уничтожать опухолевые клетки у реципиента. Таким образом, в различных аспектах вводимые пациенту Т-клетки сохраняются в течение менее чем одного месяца, например, в течение трех недель, двух недель или одной недели, после введения Т-клетки пациенту. Без привязки к какой-либо конкретной теории противоопухолевый иммунный ответ, вызываемый TFP-экспрессирующими Т-клетками, может представлять собой активный или пассивный иммунный ответ или, альтернативно, может быть обусловлен прямым или непрямым иммунным ответом. В одном аспекте TFP-трансдуцированные Т-клетки демонстрируют специфическую секрецию провоспалительных цитокинов и сильную цитолитическую активность в ответ на человеческие раковые клетки, экспрессирующие антиген мезотелин, противостоят ингибированию растворимым мезотелином, опосредуют неспецифический цитолиз и/или опосредуют регрессию установленной опухоли человека. Например, не содержащие антиген опухолевые клетки в пределах неоднородного поля мезотелин-экспрессирующей опухоли могут быть подвержены непрямому разрушению мезотелин-перенаправленными Т-клетками, которые ранее оказывали противодействие смежным антиген-положительным раковым клеткам. В одном аспекте человеческие TFP-модифицированные Т-клетки по настоящему изобретению могут представлять собой вид вакцины для иммунизации *ex vivo* и/или терапии *in vivo* у млекопитающего. В одном аспекте млекопитающее является человеком.

В отношении иммунизации *ex vivo* перед введением клетки млекопитающему происходит *in vitro* по меньшей мере одно из следующего: i) размножение клеток; ii) введение в клетки нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP, или iii) криоконсервация клеток.

Процедуры *ex vivo* хорошо известны в данной области техники и более подробно описываются ниже. Вкратце, клетки выделяют у млекопитающего (например, у человека) и генетически модифицируют (т. е. трансдуцируют или трансфицируют *in vitro*) с помощью вектора, экспрессирующего TFP, описанного в настоящем документе. TFP-модифицированную клетку могут вводить млекопитающему-реципиенту для обеспечения терапевтической пользы. Млекопитающее-реципиент может быть человеком, а TFP-модифицированная клетка может быть аутологической по отношению к реципиенту. Альтернативно, клетки могут быть аллогенными, сингенными или ксеногенными по отношению к реципиенту.

Процедура размножения *ex vivo* гемопоэтических стволовых клеток и прогениторных клеток описана в патенте США № 5 199 942, включенном в настоящий документ посредством ссылки, и может применяться к клеткам по настоящему изобретению. Другие подходящие способы известны в данной области техники, таким образом, настоящее изобретение не ограничивается каким-либо конкретным способом размножения клеток *ex vivo*. Вкратце, культивирование и размножение Т-клеток *ex vivo* включает в себя: (1) выделение CD34⁺ гемопоэтических стволовых клеток и прогениторных клеток у млекопитающего из отбора периферической крови или эксплантатов костного мозга; и (2) размножение таких клеток *ex vivo*. Помимо клеточных факторов роста, описанных в патенте США № 5,199,942, для культивирования и размножения клеток можно использовать другие факторы, такие как flt3-L, IL-1, IL-3 и лиганд c-kit.

Помимо использования вакцины на основе клеток с точки зрения иммунизации *ex vivo*, в настоящем изобретении также предлагаются композиции и способы иммунизации *in vivo* с целью вызвать иммунный ответ, направленный против антигена у пациента.

В целом, клетки, активированные и размноженные так, как описано в настоящем документе, могут использоваться для лечения и предотвращения заболеваний, которые возникают у иммунокомпрометированных индивидов. В частности, TFP-модифицированные Т-клетки по настоящему изобретению используются для лечения заболеваний, нарушений и состояний, связанных с экспрессией мезотелина. В некоторых аспектах Т-клетки по настоящему изобретению используются для лечения пациентов, подверженных риску развития заболеваний, нарушений и состояний, связанных с экспрессией мезотелина. Таким образом, в настоящем изобретении предлагаются способы для лечения или предотвращения заболеваний, нарушений и состояний, связанных с экспрессией мезотелина, включающие в себя введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества TFP-модифицированных Т-клеток по настоящему изобретению.

В одном аспекте TFP-Т-клетки по настоящему изобретению могут использоваться для лечения пролиферативного заболевания, такого как рак, или злокачественная опухоль, или предраковое состояние. В одном аспекте рак представляет собой мезотелиому. В одном аспекте рак представляет собой рак поджелудочной железы. В одном аспекте рак представляет собой рак яичников. В одном аспекте рак представ-

ляет собой рак желудка. В одном аспекте рак представляет собой рак легких. В одном аспекте рак представляет собой рак эндометрия. Более того, заболевание, связанное с экспрессией мезотелина, включает в себя, помимо прочего, например, атипичные и/или неклассические раковые заболевания, злокачественные опухоли, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, экспрессирующие мезотелин. К нераковым смежным показателям, связанным с экспрессией мезотелина, относятся, помимо прочего, например, аутоиммунное заболевание (например, волчанка), воспалительные заболевания (аллергия и астма) и трансплантация.

TFR-модифицированные T-клетки по настоящему изобретению можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или другими компонентами, такими как IL-2, или другими цитокинами, или популяциями клеток. В настоящем изобретении также предлагаются способы ингибирования пролиферации или сокращения популяции клеток, экспрессирующих мезотелин, при этом способы включают в себя контактирование популяции клеток, содержащей экспрессирующие мезотелин клетки, с TFR-T-клеткой против мезотелина по настоящему изобретению, которая связывается с мезотелин-экспрессирующей клеткой. В конкретном аспекте в настоящем изобретении предлагаются способы ингибирования пролиферации или сокращения популяции раковых клеток, экспрессирующих мезотелин, при этом способы включают в себя контактирование популяции раковых клеток, экспрессирующих мезотелин, с TFR-T-клеткой против мезотелина по настоящему изобретению, которая связывается с мезотелин-экспрессирующей клеткой. В одном аспекте в настоящем изобретении предлагаются способы ингибирования пролиферации или сокращения популяции раковых клеток, экспрессирующих мезотелин, при этом способы включают в себя контактирование популяции раковых клеток, экспрессирующих мезотелин, с TFR-T-клеткой против мезотелина по настоящему изобретению, которая связывается с мезотелин-экспрессирующей клеткой. В некоторых аспектах TFR-T-клетка против мезотелина по настоящему изобретению сокращает численность, число, количество или процентное содержание клеток и/или раковых клеток на по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% у субъекта или в животной модели с раковым заболеванием, связанным с мезотелин-экспрессирующими клетками, по отношению к отрицательному контролю. В одном аспекте субъект является человеком.

В настоящем изобретении также предлагаются способы предотвращения, лечения и/или сдерживания заболевания, связанного с мезотелин-экспрессирующими клетками (например, рака, экспрессирующего мезотелин), при этом способы включают в себя введение нуждающемуся субъекту TFR-T-клетки против мезотелина по настоящему изобретению, которая связывается с мезотелин-экспрессирующей клеткой. В одном аспекте субъект является человеком. К неограничивающим примерам нарушений, связанных с мезотелин-экспрессирующими клетками, относятся аутоиммунные заболевания (такие как волчанка), воспалительные заболевания (такие как аллергии и астма) и раковые заболевания (такие как рак поджелудочной железы, рак яичников, рак желудка, рак легких или рак эндометрия, или атипичные раковые заболевания, экспрессирующие мезотелин).

В настоящем изобретении также предлагаются способы предотвращения, лечения и/или сдерживания заболевания, связанного с мезотелин-экспрессирующими клетками, при этом способы включают в себя введение нуждающемуся субъекту TFR-T-клетки против мезотелина по настоящему изобретению, которая связывается с мезотелин-экспрессирующей клеткой. В одном аспекте субъект является человеком.

В настоящем изобретении предлагаются способы предотвращения рецидива ракового заболевания, связанного с мезотелин-экспрессирующими клетками, при этом способы включают в себя введение нуждающемуся в этом субъекту TFR-T-клетки против мезотелина по настоящему изобретению, которая связывается с мезотелин-экспрессирующей клеткой. В одном аспекте способы включают в себя введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества TFR-T-клетки против мезотелина, описанной в настоящем документе, которая связывается с мезотелин-bmsa-экспрессирующей клеткой, в комбинации с эффективным количеством другого лечения. Комбинированная терапия TFR-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, может использоваться в комбинации с другими известными веществами и методами лечения. Введение "в комбинации", как используется в настоящем документе, означает, что два (или более) различных средства лечения доставляют субъекту в ходе заболевания, например, два или более средств лечения доставляют после того, как у субъекта диагностировали нарушение, и перед тем, как нарушение было вылечено, или устранено, или лечение было прекращено по другим причинам. В некоторых вариантах осуществления доставка одного средства лечения все еще происходит, когда начинается доставка второго средства лечения, таким образом, существует перекрытие с точки зрения введения. Иногда в настоящем документе это называется как "одновременная" или "сопутствующая доставка". В других вариантах осуществления доставка одного средства лечения заканчивается до начала доставки другого средства лечения. В некоторых вариантах осуществления в любом из случаев лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, второе средство лечения является более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдается при меньшей дозе второго средства лечения, или же второе средство лечения снижает симптомы в большей степени, чем наблюда-

лось бы в том случае, если бы второе средство лечения вводили в отсутствие первого средства лечения, или же аналогичная ситуация наблюдается для первого средства лечения. В некоторых вариантах осуществления доставка осуществляется таким образом, что снижение симптома или другого параметра, связанного с заболеванием, является более значительным, чем наблюдалось бы в том случае, если бы одно средство лечения доставляли в отсутствие другого. Эффект двух средств лечения может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или большим чем аддитивный. Доставка может осуществляться таким образом, что эффект первого вводимого средства лечения все еще будет определяться во время доставки второго средства.

В некоторых вариантах осуществления "по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое вещество" включает в себя TFP-экспрессирующую клетку. Также предлагаются Т-клетки, которые экспрессируют множество TFP, которые связываются с одними и теми же или различными антигенами-мишенями либо с одними и теми же или различными эпитопами на одном и том же антигене-мишени. Также предлагаются популяции Т-клеток, в которых первая субпопуляция Т-клеток экспрессирует первый TFP, а вторая субпопуляция Т-клеток экспрессирует второй TFP.

TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое вещество могут вводиться одновременно в одной или в отдельных композициях либо вводиться последовательно. В случае последовательного введения TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, может вводиться первой, а дополнительное вещество может вводиться вторым, либо же порядок введения может быть противоположным.

В дополнительных аспектах TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, может использоваться в схеме лечения в комбинации с оперативным вмешательством, химиотерапией, облучением, иммунодепрессивными средствами, такими как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антителами или другими иммунодеструктивными средствами, такими как алемтузумаб, антитела к CD3 или другие виды терапии антителами, цитоксан, флударабин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, FR901228, цитокины, и облучением. TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, также может использоваться в комбинации с пептидной вакциной, такой как описанная у Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971. В дополнительном аспекте TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, также может использоваться в комбинации с промотором дифференцировки миелоидных клеток (например, полностью транс-ретиноевая кислота), ингибитором размножения супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC) (например, ингибиторы рецептора c-kit или ингибитор VEGF), ингибированием функции MDSC (например, ингибиторы COX2 или ингибиторы фосфодиэстеразы-5) или терапевтическим устранением MDSC (например, с помощью химиотерапевтических схем, таких как лечение доксорубицином и циклофосфамидом). К другим терапевтическим веществам, которые могут предотвращать размножение MDSC, относятся аминокислоты, бисфосфонат, силденафил и тадалафил, нитроаспирин, витамин D3 и гемцитабин. (См., например, Gabrilovich and Nagaraj, Nat. Rev. Immunol, (2009) v9(3): 162-174).

В одном варианте осуществления субъекту могут вводить вещество, которое снижает или облегчает побочный эффект, связанный с введением TFP-экспрессирующей клетки. Побочные эффекты, связанные с введением TFP-экспрессирующей клетки, включают в себя, помимо прочего, синдром высвобождения цитокинов (СВЦ) и гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (ГЛГ), также называемый синдромом активации макрофагов (САМ). К симптомам СВЦ относится высокая температура, тошнота, преходящая гипотензия, гипоксия и т. п. Соответствующим образом, способы, описанные в настоящем документе, могут включать в себя введение TFP-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем документе, субъекту и дополнительное введение вещества для сдерживания повышенных уровней растворимого фактора, возникающих вследствие лечения TFP-экспрессирующей клеткой. В одном варианте осуществления растворимый фактор, повышенный у субъекта, представляет собой один или более из IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-6 и IL-8. Таким образом, вещество, вводимое для лечения этого побочного эффекта, может представлять собой вещество, которое нейтрализует один или более из этих растворимых факторов. К таким веществам относится, помимо прочего, стероид, ингибитор TNF α и ингибитор IL-6. Примером ингибитора TNF α является энтанерсепт. Примером ингибитора IL-6 является тоцилизумаб (toc). В одном варианте осуществления субъекту могут вводить вещество, которое повышает активность TFP-экспрессирующей клетки. Например, в одном варианте осуществления вещество может быть таким, которое ингибирует ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, например, белок запрограммированной гибели клеток 1 (PD1), могут в некоторых вариантах осуществления снижать способность TFP-экспрессирующей клетки установить иммунный эффекторный ответ. К примерам ингибирующих молекул относится PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR бета. Ингибирование ингибирующей молекулы, например, путем ингибирования ДНК, РНК или уровня белка, может оптимизировать эффективность TFP-экспрессирующей клетки. В вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота, например, ингибирующая нуклеиновая кислота, например, дсРНК, например, миРНК или мшРНК, может использоваться для ингибирования экспрессии ингибирующей молекулы в TFP-экспрессирующей клетке. В одном варианте осуществления ингибитор представляет собой мшРНК. В

одном варианте осуществления ингибирующая молекула ингибируется внутри TFP-экспрессирующей клетки. В этих вариантах осуществления молекула дсРНК, которая ингибирует экспрессию ингибирующей молекулы, соединена с нуклеиновой кислотой, которая кодирует компонент, например, все компоненты, TFP. В одном варианте осуществления ингибитор ингибирующего сигнала может представлять собой, например, антитело или фрагмент антитела, который связывается с ингибирующей молекулой. Например, вещество может представлять собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с PD1, PD-L1, PD-L2 или CTLA4 (например, ипилимумаб (также называемый MDX-010 и MDX-101 и представленный на рынке как Yervoy™; Bristol-Myers Squibb; тремелимуаб (моноклональное антитело IgG2, доступное от компании Pfizer, ранее известный как тицилимумаб, CP-675,206)). В одном варианте осуществления вещество представляет собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с TIM3. В одном варианте осуществления вещество представляет собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с LAG3.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут быть изменены (например, путем генного переноса) *in vivo* с помощью лентивируса, например, лентивируса, специфически нацеленного на CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетку. (См., например, Zhou et al., J. Immunol. (2015) 195:2493-2501).

В некоторых вариантах осуществления вещество, которое повышает активность TFP-экспрессирующей клетки, может представлять собой, например, гибридный белок, содержащий первый домен и второй домен, причем первый домен представляет собой ингибирующую молекулу или ее фрагмент, а второй домен представляет собой полипептид, который связан с положительным сигналом, например, полипептид, содержащий внутриклеточный сигнальный домен, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид, который связан с положительным сигналом, может включать в себя костимулирующий домен CD28, CD27, ICOS, например, внутриклеточный сигнальный домен CD28, CD27 и/или ICOS и/или домен первичной сигнализации, например, CD3 дзета, например, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления гибридный белок экспрессируется той же клеткой, которая экспрессирует TFP. В другом варианте осуществления гибридный белок экспрессируется клеткой, например, Т-клеткой, которая не экспрессирует TFP против мезотелина.

В некоторых вариантах осуществления домен человеческого или гуманизированного антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, который представляет собой связывающий домен против мезотелина, кодируемый нуклеиновой кислотой, или антитело, содержащее связывающий домен против мезотелина, или клетку, экспрессирующую связывающий домен против мезотелина, кодируемый нуклеиновой кислотой, имеет значение аффинности как максимум около 200 нМ, 100 нМ, 75 нМ, 50 нМ, 25 нМ, 20 нМ, 15 нМ, 14 нМ, 13 нМ, 12 нМ, 11 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0.9 нМ, 0.8 нМ, 0.7 нМ, 0.6 нМ, 0.5 нМ, 0.4 нМ, 0.3 нМ, 0.2 нМ, 0.1 нМ, 0.09 нМ, 0.08 нМ, 0.07 нМ, 0.06 нМ, 0.05 нМ, 0.04 нМ, 0.03 нМ, 0.02 нМ или 0.01 пМ; и/или по меньшей мере около 100 нМ, 75 нМ, 50 нМ, 25 нМ, 20 нМ, 15 нМ, 14 нМ, 13 нМ, 12 нМ, 11 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0.9 нМ, 0.8 нМ, 0.7 нМ, 0.6 нМ, 0.5 нМ, 0.4 нМ, 0.3 нМ, 0.2 нМ, 0.1 нМ, 0.09 нМ, 0.08 нМ, 0.07 нМ, 0.06 нМ, 0.05 нМ, 0.04 нМ, 0.03 нМ, 0.02 нМ или 0.01 нМ; и/или около 200 нМ, 100 нМ, 75 нМ, а 50 нМ, 25 нМ, 20 нМ, 15 нМ, 14 нМ, 13 нМ, 12 нМ, 11 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0.9 нМ, 0.8 нМ, 0.7 нМ, 0.6 нМ, 0.5 нМ, 0.4 нМ, 0.3 нМ, 0.2 нМ, 0.1 нМ, 0.09 нМ, 0.08 нМ, 0.07 нМ, 0.06 нМ, 0.05 нМ, 0.04 нМ, 0.03 нМ, 0.02 нМ или 0.01 нМ.

Фармацевтические композиции.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать TFP-экспрессирующую клетку, например, множество TFP-экспрессирующих клеток, как описано в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер и т. п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Композиции по настоящему изобретению в одном аспекте составлены для внутривенного введения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут вводиться таким способом, который соответствует заболеванию, подлежащему лечению (или предотвращению). Количество и частота введения будут определяться такими факторами, как состояние пациента, а также тип и степень тяжести заболевания пациента, хотя соответствующие дозы могут быть установлены в клинических исследованиях.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по существу не содержит, например, отсутствуют определяемые уровни загрязняющего вещества, например, выбранного из группы, состоящей из эндотоксина, микоплазмы, компетентного по репликации лентивируса (RCL), р24, нуклеиновой кислоты VSV-G, ВИЧ gag, остаточных гранул, покрытых антителами к CD3/CD28, мышинных антител, смешанной сыворотки человека, бычьего сывороточного альбумина, бычьей сыворотки, компонентов культуральной среды, упаковывающей вектор клетки или плазмидных компонентов, а также бактерии и грибка. В одном варианте осуществления бактерия представляет собой по меньшей мере одну, вы-

бранную из группы, состоящей из *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes* группы А. Когда указывается "иммунологически эффективное количество", "противоопухолевое эффективное количество", "ингибирующее опухоль эффективное количество" или "терапевтическое количество", точное количество композиции по настоящему изобретению, подлежащее введению, может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий по возрасту, весу, размеру опухоли, степени инфекции или метастазирования, а также состояния пациента (субъекта). В целом, можно отметить, что фармацевтическая композиция, содержащая Т-клетки, описанные в настоящем документе, может вводиться в дозах от 10^4 до 10^9 клеток/кг массы тела, в некоторых случаях - от 10^5 до 10^6 клеток/кг массы тела, включая все целые значения в этих диапазонах. Композиции Т-клеток также могут вводиться несколько раз в этих дозах. Клетки могут вводиться с помощью методов инфузии, которые широко известны в области иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988).

В некоторых аспектах может быть необходимым введение активированных Т-клеток субъекту, затем повторное взятие крови впоследствии (или осуществление афереза), активация полученных Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением и повторная инфузия пациенту этих активированных и размноженных Т-клеток. Этот процесс может выполняться несколько раз каждые несколько недель. В некоторых аспектах Т-клетки могут быть активированы во взятой крови объемом от 10 куб. см до 400 куб. см. В некоторых аспектах Т-клетки активируют во взятой крови объемом 20 куб. см, 30 куб. см, 40 куб. см, 50 куб. см, 60 куб. см, 70 куб. см, 80 куб. см, 90 куб. см или 100 куб. см.

Ведение субъекту композиций может осуществляться любым удобным способом, включая ингаляцию аэрозолем, инъекцию, пероральное поступление, трансфузию, имплантацию или трансплантацию. Композиции, описанные в настоящем документе, могут вводиться пациенту трансартериально, подкожно, внутривенно, внутривенно, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной (в/в) инъекции или внутривенно. В одном аспекте композиции Т-клеток по настоящему изобретению вводят пациенту путем внутривенной или подкожной инъекции. В одном аспекте композиции Т-клеток по настоящему изобретению вводят путем в/в инъекции. Композиции Т-клеток могут инъектировать непосредственно в опухоль, лимфатический узел или в область инфекции.

В конкретном иллюстративном аспекте субъект может подвергаться лейкоферезу, при этом лейкоциты собирают, обогащают или деплецируют *ex vivo*, чтобы отобрать и/или выделить представляющие интерес клетки, например, Т-клетки. Такие Т-клеточные изоляты могут быть размножены известными в данной области техники способами и обработаны таким образом, что может быть введена одна или более конструкций ТФР по настоящему изобретению, таким образом, создавая ТФР-экспрессирующую Т-клетку по настоящему изобретению. Нуждающиеся в этом субъекты могут впоследствии подвергаться стандартному лечению высокодозной химиотерапией с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В некоторых аспектах после трансплантации или одновременно с ней субъектам выполняют инфузию размноженных ТФР-Т-клеток по настоящему изобретению. В дополнительном аспекте размноженные клетки вводят до операции или после нее.

Дозировка вышеприведенных требующих введения пациенту видов лечения будет варьироваться в зависимости от точной природы состояния, подлежащего лечению, и реципиента лечения. Масштабирование доз для введения человеку можно выполнять в соответствии с принятыми в данной области практиками. Доза алемтузумаба, например, обычно будет варьироваться в диапазоне от 1 до около 100 мг для взрослых пациентов, как правило, ее вводят ежедневно в течение периода времени от 1 до 30 дней. Предпочтительная дневная доза составляет от 1 до 10 мг в день, хотя в некоторых случаях могут использоваться большие дозы до 40 мг в день (описано в патенте США № 6 120 766).

В одном варианте осуществления ТФР вводят в Т-клетки, например, используя транскрипцию *in vitro*, а субъекту (например, человеку) выполняют первоначальное введение ТФР-Т-клеток по настоящему изобретению, а также одно или более последующих введений ТФР-Т-клеток по настоящему изобретению, причем одно или более последующих введений выполняют менее чем через 15 дней, например, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, или 2 дня после предыдущего введения. В одном варианте осуществления субъекту (например, человеку) выполняют более одного введения ТФР-Т-клеток по настоящему изобретению в неделю, например, выполняют 2, 3 или 4 введения ТФР-Т-клеток по настоящему изобретению в неделю. В одном варианте осуществления субъекту (например, человеку) выполняют более одного введения ТФР-Т-клеток в неделю (например, 2, 3 или 4 введения в неделю) (также называется в настоящем документе как цикл) с последующим перерывом введения ТФР-Т-клеток на одну неделю, а затем субъекту выполняют одно или более дополнительных введений ТФР-Т-клеток (например, более одного введения ТФР-Т-клеток в неделю). В другом варианте осуществления субъекту (например, человеку) выполняют более одного цикла ТФР-Т-клеток, а период времени между каждым циклом составляет менее чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 дня. В одном варианте осуществления ТФР-Т-клетки вводят через день за 3 введения в неделю. В одном варианте осуществления ТФР-Т-клетки по настоящему изобретению вводят в течение по меньшей мере двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или более недель. В одном аспекте ТФР-Т-клетки против мезотелина получают с помощью лентивирусных вирусных векторов, таких как

лентивирус. Полученные таким образом TFP-T-клетки будут иметь устойчивую экспрессию TFP.

В одном аспекте TFP-T-клетки временно экспрессируют векторы TFP в течение 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 дней после трансдукции. Временная экспрессия TFP может быть осуществлена путем доставки вектора TFP РНК. В одном аспекте РНК TFP трансдуцируют в Т-клетку путем электропорации.

Потенциальной проблемой, которая может возникнуть у пациентов, получающих лечение с помощью Т-клеток, временно экспрессирующих TFP (в частности с помощью мышиных TFP-T-клеток, несущих scFv), является анафилаксия после нескольких лечений.

Не ограничиваясь данной теорией, считается, что подобный анафилактический ответ может быть вызван развивающимся гуморальным ответом против TFP у пациента, т. е. антителами к TFP, имеющими изотип против IgE. Полагают, что клетки пациента, вырабатывающие антитела, подвергаются переключению класса с изотипа IgG (который не вызывает анафилаксию) на изотип IgE, когда существует перерыв в воздействии антигеном, составляющий от десяти до четырнадцати дней.

Если пациент подвержен высокому риску развития ответа на антитела к TFP в ходе лечения временной терапией TFP (например, полученные путем трансдукции РНК), перерывы в инфузии TFP-T-клеток не должны длиться более чем от десяти до четырнадцати дней.

Примеры

Далее будет подробно описано изобретение со ссылкой на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры предоставлены только в целях иллюстрации, и их не следует интерпретировать как ограничивающие, если не указано иное. Таким образом, изобретение не должно восприниматься как такое, которое ограничивается следующими примерами, оно должно восприниматься скорее как такое, которое охватывает любые и все варианты, которые станут очевидными в результате идей, представленных в настоящем документе. Без дополнительного описания, полагают, что с использованием предшествующего описания и следующих ниже иллюстративных примеров специалист в данной области техники может получать и использовать соединения по настоящему изобретению и осуществлять на практике заявленные способы. Следующие демонстрационные примеры конкретно указывают различные аспекты настоящего изобретения, и их не следует интерпретировать как ограничивающие каким-либо образом остальную часть описания.

Пример 1: Конструкции TFP.

Конструкции TFP против мезотелина создают путем клонирования ДНК-фрагмента scFv против мезотелина, связанного с ДНК-фрагментом CD3 или TCR посредством последовательности ДНК, кодирующей короткий линкер (КЛ): AAAGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:2) или длинный линкер (ДЛ): AAAIEVMYPPPYLGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:3), в вектор p510 ((System Biosciences (SBI)) по сайтах XbaI и EcoRI.

Полученные конструкции TFP против мезотелина являются следующими: p510_antimesothelin_LL_TCR α (scFv против мезотелина - длинный линкер - человеческая полноразмерная α -цепь Т-клеточного рецептора), p510_antimesothelin_LL_TCR α C (scFv против мезотелина - длинный линкер - человеческая α -цепь константного домена Т-клеточного рецептора), p510_antimesothelin_LL_TCR β (scFv против мезотелина - длинный линкер -человеческая полноразмерная β -цепь Т-клеточного рецептора), p510_antimesothelin_LL_TCR β C (scFv против мезотелина - длинный линкер - человеческая β -цепь константного домена Т-клеточного рецептора), p510_antimesothelin_LL_CD3 γ (scFv против мезотелина - длинный линкер - человеческая цепь CD3 γ), p510_antimesothelin_LL_CD35 (scFv против мезотелина - длинный линкер - человеческая цепь CD35), p510_antimesothelin_LL_CD3 ϵ (scFv против мезотелина - длинный линкер - человеческая цепь CD3 ϵ), p510_antimesothelin_SL_TCR β (scFv против мезотелина - короткий линкер - человеческая полноразмерная β -цепь Т-клеточного рецептора), p510_antimesothelin_SL_CD3 γ (scFv против мезотелина - короткий линкер - человеческая цепь CD3 γ), p510_antimesothelin_SL_CD35 (scFv против мезотелина - короткий линкер - человеческая цепь CD35), p510_antimesothelin_SL_CD3 ϵ (scFv против мезотелина - короткий линкер -человеческая цепь CD3 ϵ).

Конструкцию CAR против мезотелина p510_antimesothelin_28 ζ получают путем клонирования синтетизированной ДНК, кодирующей анти-мезотелин, частичного внеклеточного домена CD28, трансмембранного домена CD28, внутриклеточного домена CD28 и CD3 дзета в вектор p510 по сайтах XbaI и EcoRI.

Пример 2: Последовательности антител. Получение последовательностей антител.

Каноническую полипептидную последовательность человеческого мезотелина можно найти под учетным номером UniProt Q13421 (или Q13421-1). Предлагаются полипептиды антител, которые способны специфически связываться с человеческим полипептидом мезотелина, а также его фрагментами или доменами. Антитела к мезотелину могут быть получены с помощью различных методов (см., например, Nicholson et al, 1997). Когда мышиные антитела к мезотелину используются в качестве исходного материала, гуманизация мышиных антител к мезотелину является желаемой в клинических условиях, когда мышиные специфические остатки могут индуцировать ответ человеческого антимышиного антигена (НАМА) у субъектов, которые получают лечение гибридным белком (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), т. е. лечение Т-клетками, трансдуцированными конструкциями TFP.мезотелин. Гуманизацию

осуществляют путем прививки областей CDR мышиноного антитела к мезотелину на соответствующие акцепторные каркасы человеческой зародышевой линии, необязательно включая другие модификации областей CDR и/или каркасных областей. Как представлено в настоящем документе, нумерация остатков антитела или фрагмента антитела осуществляется согласно Kabat (Kabat E. A. et al, 1991; Chothia et al, 1987).

Получение scFv.

Человеческие или гуманизированные IgG против мезотелина используются для получения scFv-последовательностей для конструкций TFP. Получают последовательности ДНК, кодирующие человеческие или гуманизированные домены V_L и V_H , а кодоны для конструкций необязательно оптимизируют для экспрессии в клетках *Нomo sapiens*. Порядок, в котором домены V_L и V_H появляются в scFv, различен (т. е. ориентация V_L - V_H или V_H - V_L), а три копии субъединицы "G₄S" или "G₄S" (G₄S)₃ соединяют переменные домены для создания scFv-домена. Плазмидные конструкции scFv против мезотелина могут иметь необязательные метки аффинности Flag, His или другие, конструкции электропорированы в HEK293 или другие подходящие клеточные линии человека или млекопитающего и очищаются. Валидационные анализы включают в себя анализ связывания методом FACS, кинетический анализ с использованием Proteon и окрашивание мезотелин-экспрессирующих клеток.

Примерами доменов V_L и V_H против мезотелина, CDR и нуклеотидных последовательностей, кодирующих их, могут являться описанные в патентах США №№: 9,272,002; 8,206,710; 9,023,351; 7,081,518; 8,911,732; 9,115,197 и 9,416,190; а также в публикации патента США № 20090047211. Другими примерами доменов V_L и V_H против мезотелина, CDR и нуклеотидных последовательностей, кодирующих их, соответственно, могут являться домены, CDR и последовательности следующих моноклональных антител: крысиное антитело к мезотелину 420411, крысиное антитело к мезотелину 420404, мышиноное антитело к мезотелину MN-1, мышиноное антитело к мезотелину MB-G10, мышиноное антитело к мезотелину ABIN233753, кроличье антитело к мезотелину FQS3796(3), кроличье антитело к мезотелину TQ85, мышиноное антитело к мезотелину TA307799, крысиное антитело к мезотелину 295D, крысиное антитело к мезотелину B35, мышиноное антитело к мезотелину 5G157, мышиноное антитело к мезотелину 129588, кроличье антитело к мезотелину 11C187, мышиноное антитело к мезотелину 5B2, кроличье антитело к мезотелину SP74, кроличье антитело к мезотелину D4X7M, мышиноное антитело к мезотелину C-2, мышиноное антитело к мезотелину C-3, мышиноное антитело к мезотелину G-1, мышиноное антитело к мезотелину G-4, мышиноное антитело к мезотелину K1, мышиноное антитело к мезотелину B-3, мышиноное антитело к мезотелину 200-301-A87, мышиноное антитело к мезотелину 200-301-A88, кроличье антитело к мезотелину EPR2685(2), кроличье антитело к мезотелину EPR4509 или кроличье антитело к мезотелину PPI-2e(ИНС).

В некоторых вариантах осуществления используются однодоменные (V_{Hn}) связывающие антитела, такие как приведены в SEQ ID NO 58, 59 и 55 (SD1, SD4 и SD6, соответственно). Источники субъединиц TCR

Все субъединицы комплекса человеческого Т-клеточного рецептора (TCR) содержат внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Комплекс человеческого TCR содержит полипептид CD3-эпсилон, полипептид CD3-гамма, полипептид CD3-дельта, полипептид CD3-дзета, полипептид альфа-цепи TCR и полипептид бета-цепи TCR. Каноническую полипептидную последовательность CD3-эпсилон человека можно найти под учетным номером Uniprot P07766. Каноническую полипептидную последовательность CD3-гамма человека можно найти под учетным номером Uniprot P09693. Каноническую полипептидную последовательность CD3-дельта человека можно найти под учетным номером Uniprot P043234. Каноническую полипептидную последовательность CD3-дзета человека можно найти под учетным номером Uniprot P20963. Каноническую последовательность альфа-цепи TCR человека можно найти под учетным номером Uniprot Q6ISU1. Каноническую последовательность С-области бета-цепи TCR человека можно найти под учетным номером Uniprot P01850, последовательность V-области бета-цепи TCR человека - под номером P04435.

Каноническая полипептидная последовательность CD3-эпсилон человека:
MQSGTHWRVVLGLCLLSVGVWGDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDK
NIGGDEDDKNIGSDEHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDV
MSVATIVIVDICITGGLLLL VYYWSKNRKA KAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPVPNPDIYEP
KGQRDLYSGLNQRR (SEQ ID NO:4).

Каноническая полипептидная последовательность CD3-гамма человека:
MEQGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGMIGF
LTEDKKKWNLGNSNAKDPRGMYQCKGSKQKSKPLQVYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFV
LAVGVYFIAGQDQVRSRASKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN (SEQ ID NO:5).

Каноническая полипептидная последовательность CD3-дельта человека:
MEHSTFSLGLVLAATLLSQVSPFKPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLSDITRLDLGKRILDP
RGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHETGR
LSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNS (SEQ ID NO:6). Каноническая полипептидная последовательность CD3-дзета человека:

MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQ

GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM
KGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:7).

Каноническая последовательность альфа-цепи TCR человека:

MAGTWLLLLLALGCPALPTGVGGTFFPSLAPPIMLLVDGKQMVVVCLVLDVAPPGLDSPWF
AGNGSALDAFTYGPSPATDGTWTNLAHLSLPSEELASWEPLVCHTGPGAEGHSRSTQPMHLSGE AS-
TARTCPQEPLRGTGGALWGLVLRLLLLFKLLFDLLTCSCLCDPAGPLPSPATTTLRALGSH
RLHPATETGGREATSSPRPQPRDRRWGDTPPGRKPGSPVWGEYSYPTCPAQAWCSRSALR
APSSSLGAFFAGDLPPPLQAGAA (SEQ ID NO:8).

Каноническая последовательность С-области альфа-цепи TCR человека:

PNIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAV
AWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGF
NLLMTRLWSS (SEQ ID NO:9).

Каноническая последовательность V-области альфа-цепи TCR человека CTL-L17:

MAMLLGASVLLWLQPDWVNSQKNDQVQKQNSPLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYK
KYP AEGPTFLISSIKDKNEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAAKGAGTASKLTF
GTGTRLQVTL (SEQ ID NO: 10).

Каноническая последовательность С-области бета-цепи TCR человека:

EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQPLK
EQPALNDSRYCLSSRLRVSAFTWQNP RNHFRCVQVQFYLSENDEWTQDRAKPVTVIVSAEAWG
RADCGFTSVSYQQGVL SATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF (SEQ ID NO: 11).

Каноническая последовательность V-области бета-цепи TCR человека CTL-L17:

MGTSLLCWMALCLL GADHADTGVSQNP RNHNTKRGQNVTFRCDPIS EHNRLY-
WYRQTLGQGPEFLTYFQNEAQLEKSRLSDRFS AERP KGSFSTLEIQRTEQGD-
SAMYLCASSLAGLNQPQHFGDGRLSIL (SEQ ID NO:12).

Каноническая последовательность V-области бета-цепи TCR человека YT35:

MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHNSLFWYRQTM MR-
GLELLIYFN NNVPIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSFSTCSA-
NYGYTFGSGTRLTVV (SEQ ID NO: 13).

Получение TFP из доменов TCR и scFv.

scFv мезотелина рекомбинантно связаны с CD3-эпсилон или другими субъединицами TCR (см. 1С) посредством линкерной последовательности, такой как G_4S , $(G_4S)_2$, $(G_4S)_3$ или $(G_4S)_4$. Используются различные линкеры и конфигурации scFv. Альфа- и бета-цепи TCR использовались для получения TFP в качестве полноразмерных полипептидов или только их константных доменов. Любая переменная последовательность альфа- и бета-цепи TCR может использоваться для создания TFP. Векторы экспрессии TFP

Предлагаются векторы экспрессии, которые включают в себя: промотор (промотор с энхансером цитомегаловируса (CMV)), сигнальную последовательность для осуществления секреции, сигнал полиаденилирования и терминатор транскрипции (ген бычьего гормона роста (BGH)), элемент, обеспечивающий эписомальную репликацию и репликацию у прокариот (например, с происхождением SV40 и ColE1 или другие, известные в данной области техники), и элементы для обеспечения селекции (ген сопротивления к ампициллину и маркер зеоцина). Предпочтительно, конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP, клонируют в лентивирусный вектор экспрессии, и экспрессию подтверждают на основании количества и качества эффекторного ответа TFP. мезотелин-трансдуцированных Т-клеток ("мезотелин.TFP", или "Т-клетки мезотелин.TFP", или "TFP.мезотелин", или "Т-клетки TFP.мезотелин") в ответ на мезотелин+ клетки-мишени. Эффекторные ответы Т-клеток включают в себя, помимо прочего, размножение клеток, пролиферацию, удвоение, выработку цитокинов и лизис клеток-мишеней или цитолитическую активность (т. е. дегрануляцию).

Лентивирусные векторы переноса TFP.мезотелин используются для выработки геномного материала, упакованного в псевдотипированные лентивирусные частицы VSV-G. ДНК лентивирусного вектора переноса смешивают с тремя упаковывающими компонентами VSV-G, gag/pol и rev в комбинации с реагентом Lipofectamine® для трансфицирования их вместе в клетки HEK-293 (почки эмбриона, TCC® CRL-1573™). Через 24 и 48 часов среду собирают, фильтруют и концентрируют ультрацентрифугированием. Полученный вирусный препарат хранят при температуре -80°C. Количество трансдуцированных единиц определяют титрованием на клетках Sup-T1 (Т-клеточная лимфобластная лимфома, ATCC® CRL-1942™). Перенаправленные Т-клетки TFP.мезотелин получают путем активации свежих интактных Т-клеток, например, с помощью гранул против CD3 и CD28 в течение 24 часов, а затем добавления соответствующего количества трансдуцированных единиц для получения желаемого процентного содержания трансдуцированных Т-клеток. Эти модифицированные Т-клетки оставляют размножаться, пока они не отстоятся и не уменьшатся в размере, после чего их криоконсервируют для последующего анализа. Количество и размеры клеток измеряют с помощью Coulter Multisizer™ III. Перед криоконсервацией определяют процентное содержание трансдуцированных клеток (экспрессирующих TFP.мезотелин на кле-

точной поверхности) и относительную интенсивность флуоресценции такой экспрессии с помощью анализа методом проточной цитометрии. На гистограмме изучают относительные уровни экспрессии TFP путем сравнения процентного содержания трансдуцированных клеток с их относительной интенсивностью флуоресценции. В некоторых вариантах осуществления вводят множество TFP путем Т-клеточной трансдукции при помощи множества вирусных векторов.

Оценка цитолитической активности, возможностей пролиферации и секреции цитокинов гуманизированных перенаправленных TFP-Т-клеток.

Функциональные возможности Т-клеток TFP. мезотелин по выработке экспрессируемых на клеточной поверхности TFP, а также по уничтожению опухолевых клеток-мишеней, пролиферации и секреции цитокинов определяют с помощью анализов, известных в данной области техники. Человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC, например, кровь нормального донора после афереза, чьи интактные Т-клетки были получены путем отрицательной селекции Т-клеток, CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов) обрабатывают человеческим интерлейкином-2 (IL-2), затем активируют с помощью гранул против CD3 и CD28, например, в 10% RPMI при температуре 37°C, 5% CO₂ перед трансдукцией лентивирусными векторами, кодирующими TFP. Анализы методом проточной цитометрии используют для подтверждения присутствия на клеточной поверхности TFP, например, с помощью антитела к FLAG или антимышиного антитела с вариабельным доменом. Выработка цитокинов (например, IFN- γ) измеряется с помощью ИФА или других анализов.

Пример 3: Эффективность человеческих TFP-Т-клеток в мышинной модели человеческого ОЛЛ.

Первичные клетки человеческого ОЛЛ можно вырастить у мышей с пониженным иммунитетом (например, NSG или NOD) без необходимости их культивирования *in vitro*.

Аналогичным образом, культивируемые линии клеток человеческого ОЛЛ могут вызвать лейкоз у таких мышей. Мыши с ОЛЛ могут быть использованы для проверки эффективности человеческих Т-клеток TFP. мезотелин, например, в модели HALLX5447. Регистрируемой величиной этой модели является выживаемость мышей после внутривенной (в/в) инфузии клеток ОЛЛ в отсутствие и в присутствии вводимых в/в человеческих Т-клеток TFP. мезотелин.

Пример 4: Демонстрация мультиплексных полипептидов TFP и использование мультиплексных гуманизированных перенаправленных TFP-Т-клеток.

Полипептиды TFP, представленные в настоящем документе, способны функционально связываться с эндогенными полипептидами субъединиц TCR для образования функциональных комплексов TCR. В данном случае используется множество TFP в лентивирусных векторах для трансдукции Т-клеток с целью создания функционального мультиплексного комплекса рекомбинантного TCR. Например, предлагается Т-клетка, содержащая: i) первый TFP, имеющий внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен из полипептида CD3-дельта и мезотелин-специфического scFv-фрагмента антитела, и ii) второй TFP, имеющий внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен из полипептида CD3-гамма и мезотелин-специфического фрагмента антитела. Первый TFP и второй TFP способны к взаимодействию друг с другом, а также с эндогенными полипептидами субъединицы TCR, формируя, таким образом, функциональный комплекс TCR.

Использование этих мультиплексных гуманизированных Т-клеток TFP. мезотелин может быть продемонстрировано на опухолях жидких тканей и солидных опухолях, как представлено в примерах 2 и 3 выше.

Пример 5: Подготовка Т-клеток, трансдуцированных с помощью TFP.

Получение лентивирусов.

Лентивирусы, кодирующие соответствующие конструкции, готовят следующим образом.

Высевают 5×10^6 Т-клеток НЕК-293F на 100 мм чашку и оставляют на ночь для достижения 70-90% конфлюентности. 2,5 мкг указанных ДНК-плазмид и 20 мкл лентивирусной упаковывающей смеси Lenti-virus Packaging Mix (ALSTEM, № по кат. VP100) разбавляют в 0,5 мл DMEM или среды Opti-MEM® I без сыворотки и осторожно перемешивают. В отдельной пробирке 30 мкл реагента для трансфекции NanoFect® (ALSTEM, № по кат. NF100) разводят в 0,5 мл DMEM или среды Opti-MEM® I без сыворотки и осторожно перемешивают. Затем растворы NanoFect/DMEM и ДНК/DMEM смешивают вместе и перемешивают вихревым способом в течение 10-15 секунд перед инкубацией смеси DMEM-плазмиды-NanoFect при комнатной температуре в течение 15 минут. Весь комплекс трансфекции из предыдущего этапа добавляют по каплям на планшет с клетками и покачивают для равномерного диспергирования комплекса трансфекции по планшету. Затем планшет инкубируют в течение ночи при температуре 37°C в увлажненном инкубаторе при 5% CO₂. На следующий день надосадочную жидкость заменяют 10 мл свежей среды и добавляют 20 мкл ViralBoost (500x, ALSTEM, № по кат. VB100). Затем планшеты инкубируют при температуре 37°C в течение дополнительных 24 часов. Затем лентивирус, содержащий надосадочную жидкость, собирают в стерильную коническую центрифужную пробирку с крышкой объемом 50 мл и помещают на лед. После центрифугирования со скоростью 3000 об./мин в течение 15 минут при температуре 4°C высвобожденную надосадочную жидкость фильтруют с помощью стерильного фильтра с низким связыванием белков и диаметром пор 0,45 мкм, а вирус впоследствии выделяют ультрацентри-

фугованием со скоростью 25 000 об./мин (Beckmann, L8-70M) в течение 1,5 часов при температуре 4°C. Осадок удаляют и повторно суспендируют в среде DMEM, а концентрации/титры лентивируса определяют методом количественной ОТ-ПЦР, используя набор для титрования Lenti-X qRT-PCR Titration kit (Clontech; номер по каталогу 631235). Любую остаточную плазмидную ДНК удаляют путем обработки DNaseI. Исходный препарат вируса сразу же используют для инфицирования либо разделяют на аликвоты и хранят при температуре -80°C для использования в будущем.

Выделение PBMC.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) готовят из цельной крови или лейкоцитарной пленки. Цельную кровь собирают в вакуумные пробирки с гепарином объемом 10 мл и либо сразу же обрабатывают, либо хранят в течение ночи при температуре 4°C. Приблизительно 10 мл цельной антикоагулированной крови смешивают со стерильным фосфатно-солевым буфером (PBS) для получения общего объема 20 мл в конической центрифужной пробирке объемом 50 мл (PBS, pH 7,4, без Ca^{2+}/Mg^{2+}). Затем 20 мл этой смеси кровь/PBS осторожно накладывают на поверхность 15 мл Ficoll-Paque® PLUS (GE Healthcare, 17-1440-03) перед центрифугированием при 400g в течение 30-40 минут при комнатной температуре без торможения. Лейкоцитарную пленку приобретают у Research Blood Components (Бостон, штат Массачусетс). Пробирки LeucoSep® (Greiner bio-one) готовят путем добавления 15 мл Ficoll-Paque® (GE Health Care) и центрифугирования при 1000g в течение 1 минуты. Лейкоцитарную пленку разводят в соотношении 1:3 в PBS (pH 7,4, без Ca^{2+} или Mg^{2+}). Разведенную лейкоцитарную пленку переносят в пробирку Leucoser и центрифугируют при 1000g в течение 15 минут без торможения. Слой клеток, содержащий PBMC, который наблюдается на границе разведенной плазмы/ficoll, осторожно удаляют, чтобы минимизировать загрязнение фикоаллом. Затем остаточный фикоалл, тромбоциты и белки плазмы удаляют трехкратным промыванием PBMC с помощью 40 мл PBS путем центрифугирования при 200g в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем клетки подсчитывают на гемоцитометре. Промытые PBMC промывают один раз в среде CAR-T (AIM V-AlbuMAX® (BSA) (Life Technologies), в 5% сыворотке АВ и 1,25 мкг/мл амфотерицина В (Gemini Bioproducts, Вудленд, штат Калифорния), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина). Альтернативно, промытые PBMC переносят в изолированные флаконы и замораживают при температуре -80°C в течение 24 часов перед хранением в жидком азоте для последующего применения. Активация Т-клеток PBMC, полученные из цельной крови или лейкоцитарной пленки, стимулируют магнитными гранулами, конъюгированными с антителами к человеческим CD28 и CD3, в течение 24 часов перед вирусной трансдукцией. Свежевыделенные PBMC промывают один раз в среде CAR-T (AIM V-AlbuMAX (BSA) (Life Technologies), в 5% сыворотке АВ и 1,25 мкг/мл амфотерицина В (Gemini Bioproducts), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) без huIL-2 перед повторным суспендированием в конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде CAR-T с 300 МЕ/мл человеческого IL-2 (из исходного раствора 1000x; Invitrogen). Если PBMC перед этим замораживали, их размораживают и повторно суспендируют в концентрации 1×10^7 клеток/мл в 9 мл предварительно нагретой (37°C) среды cDMEM (Life Technologies) в присутствии 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, в концентрации 1×10^6 клеток/мл перед промыванием один раз в среде CAR-T, повторном суспендировании в концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде CAR-T и добавлением IL-2, как описано выше.

Перед активацией магнитные гранулы, конъюгированные с антителами к человеческим CD28 и CD3 (доступны, например, от Invitrogen, Life Technologies), трижды промывают в 1 мл стерильного 1x PBS (pH 7,4), используя магнитную подставку для выделения гранул из раствора, перед повторным суспендированием в среде CAR-T с 300 МЕ/мл человеческого IL-2 для получения конечной концентрации 4×10^7 гранул/мл. Затем PBMC и гранулы смешивают в соотношении гранул к клеткам 1:1 путем переноса 25 мкл (1×10^6 гранул) гранул в 1 мл PBMC. Затем желаемое количество аликвот дозируют в единичные лунки 12-луночного планшета для культивирования клеток с низким приклеиванием или необработанных клеток и инкубируют при температуре 37°C с 5% CO₂ в течение 24 часов перед вирусной трансдукцией.

Трансдукция/трансфекция и размножение Т-клеток.

После инкубации PBMC клетки инкубируют в течение 48 часов при температуре 37°C и 5% CO₂. Лентивирус размораживают на льду и добавляют 5×10^6 лентивируса вместе с 2 мкл TransPlus™ (Alstem) на мл среды (конечное разведение 1:500) в каждую лунку с 1×10^6 клеток. Клетки инкубируют в течение дополнительных 24 часов перед повторным добавлением вируса. Альтернативно, лентивирус размораживают на льду и добавляют соответствующий вирус при 5 или 50 MOI в присутствии 5 мкг/мл полибрана (Sigma). Клетки подвергают центрифужной инокуляции при 100g в течение 100 минут при комнатной температуре. Затем клетки выращивают в непрерывном присутствии 300 МЕ/мл человеческого IL-2 в течение 6-14 дней (общее время инкубации зависит от конечного количества требуемых CAR-T-клеток). Концентрации клеток анализируют каждые 2-3 дня, добавляя в этот момент среду для поддержания клеточной суспензии в концентрации 1×10^6 клеток/мл.

В некоторых случаях активированные PBMC электропорируют с помощью транскрибированной in

vitro (IVT) РНК. В одном варианте осуществления человеческие РВМС стимулируют с помощью Dyna-beads® (ThermoFisher) в соотношении 1 к 1 в течение 3 дней в присутствии 300 МЕ/мл рекомбинантного человеческого IL-2 (R&D Systems) (могут использоваться другие стимулирующие реагенты, такие как реагент TransAct T Cell Reagent от Milyeni Pharmaceuticals). Перед электропорацией гранулы удаляют. Клетки промывают и повторно суспендируют в среде OPTI-MEM (ThermoFisher) в концентрации $2,5 \times 10^7$ клеток/мл. 200 мкл клеточной суспензии (5×10^6 клеток) переносят в кюветы для электропорации со щелью 2 мм Electroporation Cuvettes Plus™ (Harvard Apparatus BVTX) и предварительно охлаждают на льду. 10 мкг FVT мРНК TFP добавляют в клеточную суспензию. Затем смесь мРНК/клеток электропорировывают при 200 В в течение 20 миллисекунд, используя ECM830 Electro Square Wave Porator (Harvard Apparatus BVTX). Сразу же после электропорации клетки переносят в свежую клеточную культуральную среду (среда AIM V AlbuMAX (BSA), не содержащая сыворотку, + 5% человеческая сыворотка АВ + 300 МЕ/мл IL-2) и инкубируют при температуре 37°C.

Верификация экспрессии TFP методом окрашивания клеток.

После лентивирусной трансдукции или электропорации мРНК экспрессию TFP против мезотелина подтверждают методом проточной цитометрии, используя антимышиное Fab-антитело для выявления мышиного scFv против мезотелина. Т-клетки трижды промывают в 3 мл буфера для окрашивания (PBS, 4% BSA) и повторно суспендируют в PBS в концентрации 1×10^6 клеток на лунку. Для исключения мертвых клеток клетки инкубируют с красителем для мертвых клеток LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain (Invitrogen) в течение 30 минут на льду. Клетки дважды промывают в PBS и повторно суспендируют в 50 мкл буфера для окрашивания. Для блокирования Fc-рецепторов 1 мкл разведенное 1:100 нормального козьего IgG (BD Bioscience) добавляют в каждую пробирку и инкубируют на льду в течение 10 минут. 1,0 мл буфера FACS добавляют в каждую пробирку, хорошо перемешивают, и клетки осаждают центрифугированием при 300g в течение 5 минут. Поверхностную экспрессию scFv TFP определяют с помощью меченого R-фикоэритрином человеческого MSLN IgG1 Fc Zenon® или изотипического контроля человеческого IgG1. 1 мкг антител добавляют в соответствующие образцы и инкубируют в течение 30 минут на льду. Затем клетки дважды промывают и окрашивают в отношении поверхностных маркеров, используя APC к CD3 (клон, UCHT1), Pacific blue против CD4 (клон RPA-T4), APCCy7 против CD8 (клон SK1) от BD bioscience. Проточную цитометрию выполняют, используя LSRFortessa™ X20 (BD Biosciences), данные получают с помощью программного обеспечения FACS diva и анализируют с помощью FlowJo® (Treestar, Inc. Ашленд, штат Орегон).

Иллюстративные результаты показаны на фиг. 5А, где изображен анализ экспрессии поверхности активированных клеток РВМС, окрашенных в отношении CD8 (APCCy7 против CD8, ось у) и мезотелина ("MSLN") (меченные R-фикоэритрином hMSLN IgG Zenon®, ось х). Слева направо показаны клетки, которые либо не трансдуцировали, либо трансдуцировали с помощью конструкций анти-MSLN-CD3ε, анти-MSLN-CD28ζ, и анти-MSLN-41BBζ. Пропорция CD8⁺, MSLN⁺ клеток показана в верхнем правом углу каждой панели.

На фиг. 5В показаны аналогичные результаты активированных клеток РВМС, окрашенные в отношении MSLN и ЗФБ, которые были трансдуцированы конструкциями TFP, содержащими собственные однодоменные ("SD") связывающие антитела к мезотелину. В верхнем ряду (слева направо) показаны не трансдуцированные клетки, а также клетки, трансдуцированные положительным контрольным анти-MSLN-CD3ε TFP ("SSI"). В рядах 2-4 показаны связывающие антитела против MSLN SD1, SD4 и SD6, соответственно, в клетках, трансдуцированных конструкциями (слева направо) CD3ε TFP, CD3γTFP, TCRβ TFP и CD28ζ CAR, мечеными ЗФБ. Пропорция ЗФБ⁺, MSLN⁺ клеток показана в верхнем правом углу каждой панели.

Пример 6: Анализ цитотоксичности методом проточной цитометрии.

Клетки-мишени, которые являются мезотелин-положительными или мезотелин-отрицательными, метят флуоресцентным красителем карбоксифлуоресцеина диацетат-N-сукцинимидильным эфиром (CFSE). Эти клетки-мишени смешивают с эффекторными Т-клетками, которые либо не трансдуцировали, либо трансдуцировали с помощью контрольных конструкций CAR-T, либо трансдуцировали с помощью TFP. По истечении указанного времени инкубации процентное содержание мертвых и живых меченных CFSE клеток-мишеней и клеток-мишеней отрицательного контроля определяют для каждой культуры эффекторных клеток/клеток-мишеней методом проточной цитометрии. Процент выживаемости клеток-мишеней в каждой положительной к Т-клеткам культуре клеток-мишеней рассчитывается по отношению к лункам, содержащим только клетки-мишени.

Цитотоксическая активность эффекторных Т-клеток измеряется путем сравнения количества выживших клеток-мишеней без эффекторных Т-клеток или с ними после совместной инкубации эффекторных клеток и клеток-мишеней методом проточной цитометрии. В экспериментах с TFP против мезотелина или CAR-T-клетками клетки-мишени представляют собой мезотелин-положительные клетки, тогда как клетки, используемые в качестве отрицательного контроля, являются мезотелин-отрицательными клетками.

Клетки-мишени промывают один раз и повторно суспендируют в PBS при концентрации 1×10^6 кле-

ток/мл. Флуоресцентный краситель карбоксифлуоресцеина диацетат-N-сукцинимидильный эфир (CFSE) (ThermoFisher) добавляют в клеточную суспензию в концентрации 0,03 мкМ, и клетки инкубируют в течение 20 минут при комнатной температуре. Реакцию мечения останавливают путем добавления в клеточную суспензию полной клеточной культуральной среды (RPMI-1640 + 10% HI-FBS) в 5-кратном объеме от реакционного объема, и клетки инкубируют в течение дополнительных двух минут при комнатной температуре. Клетки осаждают центрифугированием и повторно суспендируют в цитотоксичной среде (RPMI1640 без фенолового красного (Invitrogen) плюс 5% сыворотка АВ (Gemini Bioproducts) в концентрации 2×10^5 клеток/мл.

Пятьдесят микролитров суспензии меченных CFSE клеток-мишеней (эквивалент 10 000 клеток) добавляют в каждую лунку 96-луночного планшета с U-образным дном (Corning). Эффекторные Т-клетки, трансдуцированные конструкциями TFP против мезотелина, вместе с нетрансдуцированными Т-клетками в качестве отрицательных контролен промывают и суспендируют в концентрации 2×10^6 клеток/мл или 1×10^6 клеток/мл в цитотоксичной среде. 50 мкл суспензии эффекторных Т-клеток (эквивалент 100 000 или 50 000 клеток) добавляют к помещенным на планшете клеткам-мишеням для достижения соотношения эффекторных клеток к клеткам-мишеням равного 10 к 1 или 5 к 1, соответственно, при общем объеме 100 мкл. Культуры затем смешивают, центрифугируют и инкубируют в течение четырех часов при температуре 37°C и при 5% CO₂. Сразу же после инкубации 7AAD (7-аминоактиномицин D) (BioLegend) добавляют к культивированным клеткам, как рекомендует производитель, и выполняют проточную цитометрию с помощью BD LSRFortessa™ X-20 (BD Biosciences). Анализ данных проточной цитометрии выполняют с использованием программного обеспечения FlowJo® (TreeStar, Inc.). Процент выживаемости клеток-мишеней рассчитывают путем деления количества живых клеток-мишеней (CFSE+7-AAD-) в образце с эффекторными Т-клетками и клетками-мишенями на количество живых (CFSE+7-AAD-) клеток в образце исключительно с клетками-мишенями. Цитотоксичность эффекторных клеток рассчитывают как процент уничтожения клеток-мишеней = 100% - процент выживаемости клеток.

Т-клетки, трансдуцированные конструкцией анти-MSLN 28ζ CAR, могут демонстрировать цитотоксичность в отношении мезотелин-экспрессирующих клеток при сравнении с Т-клетками, которые являются либо нетрансдуцированными, либо трансдуцированными с помощью контроля неспецифического к мезотелину CAR. Однако Т-клетки, трансдуцированные CD3ε против мезотелина, могут индуцировать более эффективную цитотоксичность в отношении мишеней, чем контроль неспецифического к мезотелину CAR. TFP CD3γ против мезотелина также могут опосредовать устойчивую цитотоксичность, которая будет больше, чем цитотоксичность, наблюдаемая для CAR против мезотелина в соотношениях эффекторных клеток к клеткам-мишеням, равным между 5 и 10:1. Некоторая цитотоксичность может наблюдаться в отношении TCRα против мезотелина и TFP TCRβ против мезотелина. Аналогичные результаты могут быть получены для TFP против мезотелина, сконструированных с альтернативной шарнирной областью. Опять таки, цитотоксичность в отношении мезотелин-экспрессирующих клеток-мишеней может быть больше с TFP-трансдуцированными Т-клетками CD3ε против мезотелина или CD3γ против мезотелина, чем с CAR-трансдуцированными Т-клетками против мезотелина. Т-клетки, электропорлируемые мРНК, кодирующими TFP, специфическими к мезотелину, могут также демонстрировать устойчивую цитотоксичность в отношении мезотелин-экспрессирующих клеток. Поскольку не наблюдается значительного уничтожения мезотелин-отрицательных клеток контрольными конструкциями или конструкциями TFP против мезотелина, мезотелин-специфическое уничтожение мезотелин-экспрессирующих клеток может наблюдаться для Т-клеток, трансдуцированных КЛ CD3ε против мезотелина или TFP КЛ CD3γ против мезотелина.

Пример 8: Определение цитотоксичности с помощью анализа цитотоксичности в режиме реального времени TFP против мезотелина могут также демонстрировать превосходящую цитотоксичность по сравнению с CAR против мезотелина в формате анализа цитотоксичности в режиме реального времени (RTCA). Анализ RTCA измеряет электрический импеданс монослоя адгезивных клеток-мишеней в каждой лунке в специализированном 96-луночном планшете в режиме реального времени и представляет конечную регистрируемую величину как значение, называемое клеточным индексом. Изменения клеточного индекса указывают на нарушение монослоя клеток-мишеней в результате уничтожения клеток-мишеней совместно инкубируемыми Т-клеточными эффекторами. Таким образом, цитотоксичность эффекторных Т-клеток можно оценить как изменение клеточного индекса в лунках как с клетками-мишенями, так и с эффекторными Т-клетками по сравнению с клеточным индексом в лунках исключительно с клетками-мишенями.

Адгезивные клетки-мишени культивируют в DMEM, 10% FBS, 1% антибиотик-антигрибковом растворе (Life Technologies). Для подготовки RTCA 50 мкл, например, среды DMEM добавляют в соответствующие лунки Е-планшета (ACEA Biosciences, Inc, № по каталогу: JL-10-156010-1A). Затем планшет помещают в прибор RTCA MP (ACEA Biosciences, Inc.) в соответствующее положение планшета и задают график анализа в программном обеспечении RTCA 2.0, как описано в инструкции производителя. Измерения на исходном уровне выполняют каждые 15 минут общим количеством 100 измерений. Затем

1×10^4 клеток-мишеней в объеме 100 мкл добавляют в каждую лунку для анализа и дают Т-клеткам осесть в течение 15 минут. Планшет возвращают в считыватель и продолжают выполнять считывания.

На следующий день эффекторные Т-клетки промывают и повторно суспендируют в цитотоксичной среде (RPMI1640 без фенолового красного (Invitrogen) плюс 5% сыворотка АВ (Gemini Bioproducts; 100-318)). Затем планшет вынимают из прибора, а эффекторные Т-клетки, суспендированные в цитотоксичной среде (RPMI1640 без фенолового красного + 5% сыворотка АВ), добавляют в каждую лунку в количестве 100 000 клеток или 50 000 клеток для достижения соотношения эффекторных клеток к клеткам-мишеням равного 10 к 1 или 5 к 1, соответственно. Затем планшет помещают обратно в прибор. Измерение выполняют каждые 2 минуты общим количеством 100 измерений, а затем каждые 15 минут общим количеством 1000 измерений. В анализе RTCA уничтожение мезотелин-трансдуцированных клеток может наблюдаться Т-клетками, трансдуцированными CAR-трансдуцированными Т-клетками 28 ζ против мезотелина, как показано зависимым от времени снижением клеточного индекса после добавления эффекторных клеток по сравнению с отдельно клетками или клетками, совместно инкубированными с Т-клетками, трансдуцированными контрольной конструкцией CAR. Однако уничтожение клеток-мишеней TFP-экспрессирующими Т-клетками CD3 ϵ против мезотелина может быть более сильным и более быстрым, чем наблюдаемое для CAR против мезотелина. Например, через 4 часа после добавления Т-клеток, трансдуцированных TFP CD3 ϵ против мезотелина, уничтожение мезотелин-экспрессирующих клеток-мишеней может быть по существу закончено. Незначительное уничтожение или его отсутствие может наблюдаться для Т-клеток, трансдуцированных рядом конструкций TFP, содержащих другие конструкции CD3 и TCR. Аналогичные результаты могут быть получены для TFP против мезотелина, сконструированных с альтернативной шарнирной областью. Цитотоксичность в отношении мезотелин-трансдуцированных клеток-мишеней может быть больше с TFP-трансдуцированными Т-клетками CD3 ϵ против мезотелина или CD3 γ против мезотелина, чем с CAR-трансдуцированными Т-клетками против мезотелина.

Цитотоксическая активность TFP-трансдуцированных Т-клеток может зависеть от дозы относительно количества вируса (МОИ), используемого для трансдукции. Повышенное уничтожение мезотелин-положительных клеток может наблюдаться при повышении МОИ лентивируса TFP CD3 ϵ против мезотелина, дополнительно усиливая взаимоотношение между трансдукцией TFP и цитотоксической активностью.

Иллюстративные результаты анализа RTCA показаны на фиг. 6. Конструкцию TFP против MSLN создавали путем клонирования ДНК-фрагмента scFv против MSLN, связанного с ДНК-фрагментом CD3 ϵ посредством последовательности ДНК, кодирующей линкер: GGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:1), в вектор p510 (от SBI) по сайтах XbaI и EcoRI. Полученная конструкция TFP против MSLN представляла собой p510_antiMSLN_SS1_CD3 ϵ (SS1 scFv против MSLN - линкер - человеческая цепь CD3 ϵ).

Полноразмерный мезотелин (NM005823) подвергали ПЦР-амплификации из pCMV6_XL4_Mesothelin (Origene) и клонировали в расщепленный рестрикционными XbaI и EcoRI p527a (pCDH-EF1-MCS-T2A-Puro) (SBI) посредством реакции рекомбинации Гибсона. Клетки-мишени для RTCA были мезотелин-положительными клетками HeLa (аденокарцинома шейки матки, ATCC® CCL-2™), а мезотелин-отрицательные клетки PC-3 (аденокарцинома предстательной железы, ATCC® CRL-1435™) использовали в качестве отрицательных контролей. Адгезивные клетки-мишени культивировали в DMEM с 10% FBS и 1% антибиотик-антигрибковым растворе (Life Technologies).

Устанавливали нормализованный клеточный индекс, указывающий на цитотоксичность. Активированные PBMC были необработанными (след 1), нетрансдуцированными (след 2) или трансдуцированными пустым вектором (след 3), анти-MSLN TFP ("анти-MSLN-CD3 ζ TRuC", след 4), анти-MSLN CAR с сигнальным доменом CD28 ζ (след 5) или 41BB ζ (след 6) ("анти-MSLN-28 ζ CAR" и "анти-MSLN-41BB ζ CAR", соответственно).

Как показано на фиг. 6А, MSLN-положительные клетки-мишени HeLa эффективно уничтожались TFP-трансдуцированными Т-клетками против MSLN по сравнению с отрицательными контролями. Напротив, MSLN-отрицательные клетки PC-3 эффективно не уничтожались какой-либо из конструкций (Фиг. 6В).

Аналогичный эксперимент проводили с использованием собственных конструкций TFP с однодоменными связующими антителами против мезотелина. На фиг. 6С показано уничтожение MSLN-положительных клеток в клеточной линии с высокой плотностью мишени (HeLa-(MSLN^{high})) с помощью Т-клеток, полученных от двух разных доноров-людей (вверху и внизу). Показаны следы уничтожения клеток для TFP-Т-клеток со связующими антителами против MSLN SD1 (слева), SD4 (посередине) и SD6 (справа). Активированные PBMC были нетрансдуцированными (след 1) или трансдуцированными с помощью CD3 ϵ TFP (след 2), CD3 γ TFP (след 3), TCR β TFP (след 4) или CD28 ζ CAR (след 5). Нормализованный клеточный индекс, указывающий на цитотоксичность, устанавливали при помощи анализа на анализаторе клеток в режиме реального времени (real time cell analyzer - RTCA). Как показано на фигуре, все Т-клетки, кроме нетрансдуцированных, были способны уничтожать раковые клетки.

Пример 7: Анализ цитотоксичности на основе люциферазы в клетках с высокой или низкой плотно-

стью мишени.

Анализ цитотоксичности на основе люциферазы (анализ "Luc-Cyto") оценивает цитотоксичность TFP-T- и CAR-T-клеток путем косвенного измерения ферментной активности люциферазы в остаточных живых клетках-мишенях после совместного культивирования. Клетки с высокой плотностью мишени, используемые в анализе Luc-Cyto, представляли собой клетки HeLa-MSLN^{high}, а используемыми клетками с низкой плотностью мишени были клетки PC3, экспрессирующие низкие уровни мезотелина (PC3-MSLN^{low}), всех их стабильно трансдуцировали для экспрессии люциферазы светлячка. ДНК, кодирующую люциферазу светлячка, синтезировали с помощью GeneArt® (Thermo Fisher®) и вставляли во множество участков клонирования лентивирусного вектора с одним промотором pCDH527A-1 (System Bioscience). Лентивирус, несущий люциферазу светлячка, упаковывали в соответствии с тем, как описано выше. Затем клетки HeLa-MSLN^{high} или PC3-MSLN^{low} трансдуцировали конструкцией люциферазы светлячка, несущей лентивирус, в течение 24 часов, а затем отбирали с помощью пуромицина (5 мкг/мл). Получение клеток HeLa-luc-MSLN^{high}- и PC3-luc-MSLN^{low}-люцифераза подтверждали путем измерения ферментной активности люциферазы в клетках с помощью системы для анализа люциферазы Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega).

Отдельные популяции, полученные от двух разных доноров-людей, трансдуцировали пустым вектором экспрессии ("NT") или с помощью следующих TFP или CAR: анти-MSLN (положительный контроль, "SS1", аффинность 11 нМ), анти-MSLN-SD1 (аффинность 25 нМ), анти-MSLN-SD4 (аффинность 6 нМ) или анти-MSLN SD6 (аффинность 0,59 нМ), каждый в формате CD3ε TFP, CD3γ TFP, TCRβ TFP и CD28ζ CAR. Две популяции трансдуцированных T-клеток инкубировали с HeLa-MSLN^{high} (Фиг. 7) или PC3-MSLN^{low} (Фиг. 8).

Клетки-мишени высевали в количестве 5000 клеток на лунку на 96-луночный планшет. TFP-T-, CAR-T- или контрольные клетки добавляли к клеткам-мишеням в соотношениях эффекторных клеток к клеткам-мишеням равных 1:1 (черные столбцы) или 1:5 (серые столбцы). Затем смесь клеток культивировали в течение 24 часов при температуре 37°C с 5 % CO₂ перед измерением ферментной активности люциферазы в живых клетках-мишенях с помощью системы Bright-Glo® Luciferase Assay System. Клетки центрифугировали в осадок и повторно суспендировали в среде, содержащей субстрат люциферазы. Люцифераза высвобождается при клеточном лизисе, таким образом, высокая активность люциферазы соответствует более высокому проценту смертности клеток.

Результаты с использованием клеток, экспрессирующих высокие уровни MSLN, показаны на фиг. 7. Показан % клеток, уничтоженных в образцах при отсутствии T-клеток ("только клетки-мишени"), трансдуцированных пустым вектором ("NT"), против MSLN (положительный контроль, "SS1") или с TFP-T-клетками против мезотелина с собственными связывающими антителами против мезотелина SD1 (Фиг. 7A), SD4 (Фиг. 7B) и SD6 (Фиг. 7C), каждый из которых в формате CD3ε TFP, CD3γ TFP, TCRβ TFP и CD28ζ CAR. На каждом графике черные столбцы обозначают соотношение 1:1 T-клеток к клеткам-мишеням, а серые столбцы - соотношение 1:5 T-клеток к клеткам-мишеням. Как можно увидеть на фигуре, все TFP-T-клетки, CAR-T-клетки и положительный контроль SS1 продемонстрировали эффективность при уничтожении MSLN. На фиг. 8 показана серия графиков, демонстрирующих активность CAR-T-клеток против MSLN и TFP-T-клеток против целевой клеточной линии, экспрессирующей низкие уровни мезотелина (PC3-MSLN^{low}). Показан % клеток, уничтоженных в образцах при отсутствии T-клеток ("только клетки-мишени"), трансдуцированных пустым вектором ("NT"), против MSLN (положительный контроль, "SS1") или с конструкциями против мезотелина SD1, SD4 и SD6 в форматах TFP CD3ε (Фиг. 8A), CD3γ (Фиг. 8B), TCRβ (Фиг. 8C) и CAR CD28ζ (Фиг. 8D). На каждом графике черные столбцы обозначают соотношение 1:1 T-клеток к клеткам-мишеням, а серые столбцы - соотношение 1:5 T-клеток к клеткам-мишеням. Аналогичные результаты наблюдали для второго донора T-клеток.

Как показано на фиг. , соотношение 1:1 T-клеток к клеткам-мишеням привело к наивысшей степени уничтожения клеток-мишеней, как и ожидалось. Кроме того, TFP-T- и CAR-T-клетки продемонстрировали схожую активность в клетках, экспрессирующих высокие уровни MSLN.

Пример 8: Измерение активации T-клеток методом FACS.

Активацию T-клеток, экспрессирующих конструкции CAR и TFP против MSLN, выполняли с использованием MSLN+ и MSLN- клеток K562, как показано на фиг. 9. Как было описано выше, активированные PBMC трансдуцировали с помощью 50 MOI LV в течение двух дней подряд и размножали. На 8 день после трансдукции совместные культуры PBMC помещали с клетками-мишенями (клетки K562, сверхэкспрессирующие MSLN) в соотношении 1:1 Е к Т (0,2×10⁶ каждого типа клеток) в цитотоксичной среде (RPMI1640 без фенолового красного (Invitrogen) плюс 5% сыворотка АВ (Gemini Bioproducts; 100-318). Клетки K562, сверхэкспрессирующие BCMA, использовали в качестве отрицательных контролей. Через 24 часа после начала совместного культивирования клетки собирали, трижды промывали в PBS и окрашивали с помощью Live/Dead Aqua в течение 30 минут на льду. Для блокирования Fc-рецепторов добавляли человеческий Fc-блок (BD) и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Клетки впоследствии окрашивали с помощью APC против CD3 (клон, UCHT1), APCcy7 против CD8 (клон SK1), Alexa Fluor® 700 против CD69 (клон FN50) от BD Biosciences и PE против CD25 (клон BC96,

eBioscience). Клетки дважды промывали и анализировали с помощью BD LSRII-Fortessa. Данные анализировали, как описано выше, используя программное обеспечение для анализа FlowJo® (Tree star, Inc.). Как показано на фиг. 9А, слева направо, Т-клетки были нетрансдуцированными, трансдуцированными пустым вектором, трансдуцированными с помощью анти-MSLN-CD3ε TFP, анти-MSLN-28ζ CAR или анти-MSLN-41BBζ CAR. Клетки, совместно культивируемые с MSLN-клетками, показаны в верхнем ряду, а клетки, совместно культивируемые с MSLN+ клетками-мишенями, показаны в нижнем ряду. Затем клетки окрашивали антителами, специфическими к маркерам активации поверхности CD69 и CD25. Количество клеток, окрашенных антителами к CD69, соответствует оси x, а количество клеток, окрашенных антителами к CD25, соответствует оси y. Как показано, Т-клетки, экспрессирующие конструкции CAR и TFP против мезотелина, были активированы путем культивирования с MSLN+ клетками, как показано при помощи повышенных уровней экспрессии CD69 и CD25, относительно совместного культивирования с MSLN- клетками (Фиг. 9В). Показано процентное содержание CD25+ клеток для каждой конструкции в MSLN-(белые столбцы) и MSLN+ (черные столбцы) клетках.

Аналогичный эксперимент провели с использованием клеток MSLN- K562 (Фиг. 9С, круги) и MSLN+ клеток K562 (Фиг. 9С, квадраты) для нетрансдуцированных Т-клеток либо для Т-клеток, трансдуцированных положительными контрольными связующими антителами против MSLN ("510-SS1-CD3ε"). Данные представляют сумму CD25+, CD69+ и CD25+/CD69+ клеток. На фиг. 9D представлены данные для собственных связующих антител против MSLN SD1 (квадраты), SD4 (круги) и SD6 (треугольники) в MSLN- клетках-мишенях K562 (левая панель) и MSLN+ клетках K562 (правая панель), объединенных с донорскими Т-клетками, имеющими форматы TFP CD3ε, CD3γ, TCRβ и CD28ζ CAR. Аналогичные результаты наблюдали при использовании клеток второго донора Т-клеток.

Активацию Т-клеток можно оценивать аналогичным образом путем анализа выработки гранзима В. Т-клетки культивируют и размножают, как описано выше, а внутриклеточное окрашивание гранзима В выполняют в соответствии с инструкциями к набору производителя (Gemini Bioproducts; 100-318). Клетки собирали, трижды промывали в PBS и блокировали с помощью человеческого Fc-блока в течение 10 минут. Клетки окрашивали в отношении поверхностных антигенов с помощью APC против CD3 (клон UCHT1) и APCcy7 против CD8 (клон SK1) в течение 30 минут при температуре 4°C. Затем клетки фиксировали с помощью раствора для фиксации/пермеабилзации (набор BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permealbilzation kit, № по кат. 554714) в течение 20 минут при температуре 4°C с последующим промыванием в буфере BD Perm/Wash. Клетки впоследствии окрашивали с помощью Alexafluor700 против гранзима В (клон GB11), дважды промывали в буфере BD Perm/Wash и повторно суспендировали в буфере FACS. Данные были получены с помощью BD LSRII-Fortessa и проанализированы с использованием FlowJo® (Tree star Inc.).

Как показано на фиг. 10А, слева направо, Т-клетки были нетрансдуцированными, трансдуцированными пустым вектором, трансдуцированными с помощью анти-MSLN-CD3ε TFP, анти-MSLN-28ζ CAR или анти-MSLN-41BBζ CAR. Клетки, совместно культивируемые с MSLN-клетками, показаны в верхнем ряду, а клетки, совместно культивируемые с MSLN+ клетками-мишенями, показаны в нижнем ряду. Количество клеток, окрашенных антителами к GrB, соответствует оси x, а количество клеток, окрашенных антителами к CD8, соответствует оси y. Как показано, Т-клетки, экспрессирующие конструкции CAR и TFP против мезотелина, были активированы путем культивирования с MSLN+ клетками, а не с MSLN-клетками. Эти результаты опять таки показаны на фиг. 10В, где показан процент клеток GrB+ для каждой конструкции в мезотелин-отрицательных ("MSLN-", белые столбцы) и мезотелин-положительных ("MSLN+", черные столбцы) клетках. Эти данные демонстрируют способность MSLN-экспрессирующих клеток специфически активировать Т-клетки.

Пример 9: Секреция IL-2 и IFN-γ методом ИФА.

Другим измерением активации и пролиферации эффекторных Т-клеток, связанных с распознаванием клеток, несущих распознаваемый антиген, является выработка эффекторных цитокинов, таких как интерлейкин-2 (IL-2) и интерферон-гамма (IFN-γ).

Анализ ИФА для человеческого IL-2 (№ по каталогу EH2IL2, Thermo Scientific) и IFN-γ (№ по каталогу KHC4012, Invitrogen) выполняют, как описано в листках-вкладышах. В одном примере 50 мкл восстановленных стандартов или образцов добавляют в двух повторностях в каждую лунку 96-луночного планшета с последующим добавлением 50 мкл реагента биотинилированного антитела. Образцы перемешивают, осторожно постукивая по планшету несколько раз. Затем добавляют 50 мкл стандартного разбавителя во все лунки, не содержащие стандарты или образцы, после чего планшет осторожно закрывают адгезивной крышкой планшета перед инкубацией в течение 3 часов при комнатной температуре (20-25°C). Затем крышку планшета снимают, содержимое планшета удаляют и в каждую лунку заполняют промывочным буфером. Такую процедуру промывания повторяют всего 3 раза, а планшет промакивают бумажными полотенцами или другим абсорбирующим материалом. В каждую лунку добавляют 100 мкл приготовленного раствора стрептавидин-HRP и прикрепляют новую крышку планшета перед инкубацией в течение 30 минут при комнатной температуре. Крышку планшета снова снимают, содержимое планшета удаляют и в каждую лунку добавляют 100 мкл субстратного раствора

ТМБ. Реакцию оставляют протекать при комнатной температуре в темноте в течение 30 минут, после чего в каждую лунку добавляют 100 мкл стоп-раствора. Планшет оценивают. Поглощение измеряют с помощью считывателя планшетов ИФА, установленного на 450 нм и 550 нм, в течение 30 минут до остановки реакции. Значения при 550 нм вычитают из значений при 450 нм и рассчитывают количества IL-2 в неизвестных образцах относительно значений, полученных с помощью стандартной кривой IL-2. Альтернативно, выполняют анализы 2-Plex, используя набор реагентов Human Cytokine Magnetic Buffer Reagent Kit (Invitrogen, LHB0001M) с набором гранул Human IL-2 Magnetic Bead Kit (Invitrogen, LHC0021M) и набором гранул Human IFN- γ Magnetic Bead Kit (Invitrogen, LHC4031M).

Вкратце, 25 мкл гранул антител человеческого IL-2 и IFN- γ добавляют в каждую лунку 96-луночного планшета и промывают, используя следующие инструкции: два промывания в 200 мкл 1x промывочного раствора, привести планшет в контакт с магнитным 96-луночным сепаратором (Invitrogen, A14179), дать гранулам отстояться в течение 1 минуты и декантировать жидкость. Затем 50 мкл буфера для инкубирования добавляют в каждую лунку планшета со 100 мкл восстановленных стандартов в двух повторностях или 50 мкл образцов (надосадочные жидкости из анализов цитотоксичности) и 50 мкл раствора для разведения в трех повторностях, общим объемом 150 мкл. Образцы смешивают в темноте со скоростью 600 об./мин на орбитальном шейкере с орбитальным радиусом 3 мм в течение 2 часов при комнатной температуре. Планшет промывают, следуя тем же инструкциям по промыванию, и в каждую лунку добавляют 100 мкл биотинилированного детекторного антитела к человеческому IL-2 и IFN- γ . Образцы смешивают в темноте со скоростью 600 об./мин на орбитальном шейкере с орбитальным радиусом 3 мм в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшет промывают, следуя тем же инструкциям по промыванию, и в каждую лунку добавляют 100 мкл стрептавидин-R-фикоэритрина. Образцы смешивают в темноте со скоростью 600 об./мин. на орбитальном шейкере с орбитальным радиусом 3 мм в течение 30 минут при комнатной температуре. Планшет промывают 3 раза, следуя тем же инструкциям по промыванию, и после декантирования жидкости образцы повторно суспендируют в 150 мкл 1x промывочного раствора. Образцы смешивают со скоростью 600 об./мин на орбитальном шейкере с орбитальным радиусом 3 мм в течение 3 минут и хранят в течение ночи при температуре 4°C. После этого планшет промывают, следуя тем же инструкциям по промыванию, и образцы повторно суспендируют в 150 мкл 1x промывочного раствора.

Планшет считывают с помощью программного обеспечения MAGPIX System (Luminex) и xPONENT. Анализ данных выполняют с помощью программного обеспечения MILLIPIX Analyst, которое обеспечивает стандартную кривую и концентрации цитокинов.

По отношению к нетрансдуцированным или контрольным CAR-трансдуцированным Т-клеткам Т-клетки, трансдуцированные с помощью TFP против мезотелина, продуцируют более высокие уровни IL-2 и IFN- γ при совместном культивировании с клетками, которые эндогенно экспрессируют мезотелин, или мезотелин-трансдуцированными клетками. Напротив, совместное культивирование с мезотелин-отрицательными клетками или нетрансдуцированными клетками может привести к незначительному высвобождению или отсутствию высвобождения цитокинов из TFP-трансдуцированных Т-клеток. В соответствии с предыдущими данными цитотоксичности TFP против мезотелина, сконструированные с альтернативной шарнирной областью, могут давать аналогичные результаты при совместном культивировании с несущими мезотелин клетками-мишенями.

В соответствии с предыдущими данными цитотоксичности CD3 ϵ против мезотелина и CD3 γ против мезотелина могут привести к самым высоким уровням IL-2 и IFN- γ в конструкциях TFP. Однако выработка цитокинов Т-клетками, трансдуцированными с помощью TFP CD3 ϵ против мезотелина и TFP CD3 γ против мезотелина, может быть сопоставимой с выработкой цитокинов Т-клетками, экспрессирующими CAR 28 ζ против мезотелина, несмотря на то, что TFP демонстрируют значительно более высокие уровни уничтожения клеток-мишеней. Возможность того, что TFP могут более эффективно уничтожать клетки-мишени, чем CAR, однако высвободить сопоставимые или более низкие уровни провоспалительных цитокинов, представляет собой потенциальное преимущество TFP перед CAR, поскольку повышенные уровни этих цитокинов связаны с дозолимитирующей токсичностью адоптивной CAR-Т терапии.

Иллюстративные результаты показаны на фиг. 11. Как было описано выше, активированные PBMC трансдуцировали с помощью 50 MOI лентивирусов в течение двух дней подряд и размножали. На 8 день после трансдукции совместные культуры PBMC помещали с клетками-мишенями (клетки K562, сверхэкспрессирующие MSLN) в соотношении 1:1 Е к Т (0,2 \times 10⁶ каждого типа клеток) в цитотоксичной среде (RPMI1640 без фенолового красного (Invitrogen) плюс 5% сыворотка АВ (Gemini Bioproducts; 100-318). Клетки K562, сверхэкспрессирующие ВСМА, использовали в качестве отрицательных контролей. Через 24 часа клетки проанализировали в отношении экспрессии IFN- γ (Фиг. 11А) и IL-2 (Фиг. 11В) методом ИФА, как описано выше. Как показано на каждой фиг. слева направо, Т-клетки были нетрансдуцированными, трансдуцированными пустым вектором, трансдуцированными с помощью анти-MSLN-CD3 ϵ TFP, анти-MSLN-28 ζ CAR или анти-MSLN-41BB ζ CAR. Клетки, совместно культивированные с MSLN-клетками, обозначены белыми столбцами, а клетки, совместно культивированные с MSLN+ клетками-

мишенями, обозначены черными столбцами. Как можно увидеть на фиг. , Т-клетки, экспрессирующие конструкции CAR и TFP против мезотелина, были активированы, о чем свидетельствует выработка как IFN- γ , так и IL-2, путем совместного культивирования с MSLN+ клетками, а не MSLN- клетками, дополнительно демонстрируя способность MSLN-экспрессирующих клеток специфически активировать Т-клетки.

Пример 10: Воздействие CP107a методом проточной цитометрии.

Дополнительным анализом активации Т-клеток является поверхностная экспрессия CD107a, лизосомального мембранного белка (также известного как LAMP-1), который расположен в мембране цитоплазматических цитолитических гранул в клетках, находящихся в состоянии покоя. Дегрануляция эффекторных Т-клеток, что является предпосылкой для цитолитической активности, приводит к мобилизации CD107a к клеточной поверхности после индуцированного активацией экзоцитоза гранул. Таким образом, воздействие CD107a обеспечивает дополнительное измерение активации Т-клеток, помимо выработки цитокинов, что тесно коррелирует с цитотоксичностью. Клетки-мишени и эффекторные клетки отдельно промывают и повторно суспендируют в цитотоксичной среде (RPMI + 5% человеческая сыворотка АВ +1% противогрибковый раствор с антибиотиком). Анализ выполняют путем объединения 2×10^5 эффекторных клеток с 2×10^5 клеток-мишеней в 100 мкл конечного объема в 96-луночных планшетах с U-образным дном (Corning) в присутствии 0,5 мкл/лунку меченного PE/Cy7 антитела к человеческому CD107a (LAMP-1) (клон H4A3, BD Biosciences). Затем культуры инкубируют в течение одного часа при температуре 37°C и 5% CO₂. Сразу же после этой инкубации 10 мкл разведения 1:10 ингибитора секреции мөнненина (1000x раствор, BD GolgiStop™) осторожно добавляют в каждую лунку, не взболтав клетки. Затем планшеты инкубируют в течение дополнительных 2,5 часов при температуре 37°C и 5% CO₂. После этой инкубации клетки окрашивают с помощью антитела к человеческому CD3 APC (клон UCHL1, BD Biosciences), антитела к человеческому CD8 PerCP/Cy5.5 (клон SK1, BD Biosciences) и антитела к человеческому CD4 Pacific Blue (клон RPA-T4, BD Biosciences), а затем инкубируют в течение 30 минут при температуре 37°C и 5% CO₂. Затем клетки промывают 2 раза в буфере FACS (и повторно суспендируют в 100 мкл буфера FACS и 100 мкл фиксирующего буфера IC перед выполнением анализа.

Воздействие CD107a на поверхность Т-клеток определяют методом проточной цитометрии. Проточную цитометрию выполняют с помощью LSRFortessa™ X20 (BD Biosciences), а анализ данных проточной цитометрии осуществляют с помощью программного обеспечения FlowJo (TreeStar, Inc. Ашленд, штат Орегон). Процентное содержание CD8⁺ эффекторных клеток в пределах гейта CD3, которые являются CD107-положительными, определяют для каждой культуры эффекторных клеток/клеток-мишеней.

В соответствии с предыдущими данными цитотоксичности и данными для цитокинов совместное культивирование мезотелин-экспрессирующих клеток-мишеней с эффекторными Т-клетками, трансдуцированными с помощью CAR 28 ζ против мезотелина, может индуцировать повышение поверхностной экспрессии CD107a по отношению к эффекторам, инкубированным с мезотелин-отрицательными клетками-мишенями. Для сравнения при тех же условиях TFP-экспрессирующие эффекторы ДЛ CD3 ϵ против мезотелина или ДЛ CD3 γ против мезотелина могут демонстрировать от 5- до 7-кратной индукции экспрессии CD107a. TFP против мезотелина, сконструированные с альтернативной шарнирной областью, могут давать аналогичные результаты при совместном культивировании с несущими мезотелин клетками-мишенями.

Пример 11: Исследования эффективности *in vivo* на мышах.

Чтобы оценить способность эффекторных Т-клеток, трансдуцированных с помощью TFP против мезотелина, достигать противоопухолевых ответов *in vivo*, эффекторные Т-клетки, трансдуцированные CAR 28 ζ против мезотелина, TFP ДЛ CD3 ϵ против мезотелина или TFP ДЛ CD3 γ против мезотелина, адаптивно переносят мышам NOD/SCID/IL-2R γ ^{-/-} (NSG-JAX), которых ранее инокулировали линиями мезотелин+ раковых клеток человека.

Самок мышей NOD/SCID/IL-2R γ ^{-/-} (NSG-JAX), возраст которых перед началом исследования составляет по меньшей мере 6 недель, получают у The Jackson Laboratory (исходный номер 005557) и акклиматизируют в течение 3 дней перед использованием в исследовании. Линии мезотелин-экспрессирующих клеток человека для инокулирования выдерживают в культуре в log-фазе, прежде чем они будут собраны и подсчитаны с помощью трипанового синего для определения количества жизнеспособных клеток. В день испытания с опухолью клетки центрифугируют при 300g в течение 5 минут и повторно суспендируют в предварительно нагретом стерильном PBS при концентрации клеток $0,5-1 \times 10^6$ клеток/100 мкл. Для адаптивного переноса готовят Т-клетки, нетрансдуцированные либо трансдуцированные конструкциями CAR 28 ζ против мезотелина, TFP ДЛ CD3 ϵ против мезотелина или TFP ДЛ CD3 γ против мезотелина. В день 0 исследования 10 животным на экспериментальную группу внутривенно вводят $0,5-1 \times 10^6$ мезотелин-экспрессирующих клеток. Через 3 дня каждому животному внутривенно переносят 5×10^6 популяций эффекторных Т-клеток в 100 мкл стерильного PBS. Подробные клинические наблюдения на животных ежедневно регистрируются до момента эвтаназии. Массу тела измеряют у всех животных еженедельно до момента смерти или эвтаназии. Эвтаназию всех животных проводят через 35

дней после адоптивного переноса исследуемого и контрольного препаратов. Всех животных, у которых наблюдается агония в ходе исследования, умерщвляют по усмотрению руководителя исследования после консультации с ветеринаром.

По сравнению с нетрансдуцированными Т-клетками адоптивный перенос Т-клеток, трансдуцированных CAR 28 ζ против мезотелина, TFP ДЛ CD3 ϵ против мезотелина или TFP ДЛ CD3 γ против мезотелина, может повысить выживаемость мышей, несущих линию мезотелин-экспрессирующих опухолевых клеток, и может указывать на то, что Т-клетки, трансдуцированные конструкциями CAR и TFP против мезотелина, способны опосредовать уничтожение клеток-мишеней, соответствующим образом повышая выживаемость в этих мышинных моделях. В совокупности эти данные могут указывать на то, что TFP являются альтернативной платформой для создания химерных рецепторов, которые демонстрируют лучшее антиген-специфическое уничтожение по сравнению с CAR первого поколения как *in vitro*, так и *in vivo*.

Пример 12: Лечение человеческими Т-клетками TFP в ксенотрансплантатной мышинной модели с солидной опухолью *in vivo*.

Эффективность лечения человеческими Т-клетками TFP мезотелин также можно протестировать на мышинных моделях с пониженным иммунитетом, несущих подкожные солидные опухоли, полученные из линий человеческих мезотелин-экспрессирующих клеток ОЛЛ, ХЛЛ, НХЛ или MSTO. Уменьшение опухоли в ответ на лечение человеческими Т-клетками TFP мезотелин можно оценивать либо путем измерения размера опухоли штангенциркулем, либо путем отслеживания интенсивности сигнала зеленого флуоресцентного белка (ЗФБ), издаваемого ЗФБ-экспрессирующими опухолевыми клетками.

Первичные клетки человеческой солидной опухоли можно вырастить у мышей с пониженным иммунитетом без необходимости их культивирования *in vitro*. К примерам клеток солидных раковых опухолей относятся линии клеток солидной опухоли, такие как предложенные в Атласе ракового генома (The Cancer Genome Atlas - TCGA) и/или в расширенной Энциклопедии клеточных линий рака (Broad Cancer Cell Line Encyclopedia - CCLE, см. Barretina et al., Nature 483:603 (2012)). К примерам клеток солидных раковых опухолей относятся первичные опухолевые клетки, выделенные из мезотелиомы, почечно-клеточной карциномы, рака желудка, рака молочных желез, рака легких, рака яичников, рака предстательной железы, рака толстой кишки, рака шейки матки, рака головного мозга, рака печени, рака поджелудочной железы, рака почек, эндометрия и желудка. В некоторых вариантах осуществления рак, подлежащий лечению, выбирают из группы, состоящей из мезотелиомы, папиллярной серозной аденокарциномы яичников, светлоклеточного рака яичников, смешанной карциномы яичников Мюллера, эндометриоидной слизеобразующей карциномы яичников, аденокарциномы поджелудочной железы, протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, серозной карциномы матки, аденокарциномы легких, карциномы внепеченочного желчного протока, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищевода, колоректальной аденокарциномы и аденокарциномы молочных желез. Этих мышей могут использовать для проверки эффективности Т-клеток TFP мезотелин в ксенотрансплантатных моделях опухоли человека (см., например, Morton et al., Nat. Protoc. 2:247 (2007)). После подкожной имплантации или инъекции 1×10^6 - 1×10^7 первичных клеток (обработанные коллагеназой суспензии объемной опухоли в матричном материале EC) или фрагментов опухоли (фрагменты первичной опухоли в матричном материале EC) опухолям дают вырасти до объема 200-500 мм³ перед началом лечения.

Один такой эксперимент провели для проверки эффективности активности *in vivo* MSLN-специфических однодоменных антител (sdAb) в ксенотрансплантатных мышинных моделях мезотелиомы, как описано выше. Меченные люциферазой MSTO-211H-FL-MSLN-Luc) инокулировали подкожно в концентрации 1×10^6 клеток на мышь с Matrigel® в соотношении 1:1. Объем опухоли отслеживали путем измерения штангенциркулем два раза в неделю. Через четырнадцать дней после инъекции опухоли, когда объем опухоли составлял приблизительно 300 мм³, каждому животному внутривенно вводили 1×10^7 Т-клеток. Используемые Т-клетки включали в себя клетки, трансдуцированные с помощью CD3 ϵ -SD1 TFP, CD3 γ -SD1 TFP, CD3 ϵ -SD4 TFP, CD3 γ -SD4 TFP, CD28 ζ SD1 CAR и CD28 ζ SD1 CAR. Группу мышей, которым не выполняли инъекцию Т-клеток, использовали в качестве отрицательного контроля.

Результаты показаны на фиг. 12А. Мыши, инъецированные Т-клетками CD3 ϵ -SD1 TFP и CD3 γ -SD1 TFP, продемонстрировали наибольшее и самое быстрое снижение объема опухоли, хотя мыши, которым не инъецировали Т-клеточный контроль, продемонстрировали снижение объема опухоли после инъекции Т-клеток.

Устойчивая эффективность SD1 ϵ - и γ -TFP Т-клеток была протестирована *in vivo* путем повторного исследования с участием выживших мышей в ксенотрансплантатной мышинной модели мезотелиомы.

Мышам подкожно инокулировали 1×10^6 опухолевых клеток (MSTO 211H FL MSLN Luc) на мышь с Matrigel® (соотношение 1 к 1). Одной группе мышей инъецировали клетки Raji в качестве отрицательного контроля, а одной группе мышей инъецировали только клетки MSTO, опять таки, в качестве отрицательного контроля. Объем опухоли отслеживали путем измерения штангенциркулем два раза в неделю. Через четырнадцать дней после инъекции опухоли (когда объем опухоли достиг приблизительно 300 мм³) каждому животному внутривенно вводили 1×10^7 MSTO (MSLN+) или Raji (MSLN-, в качестве от-

рицательного контроля). Результаты показаны на фиг. 12B. Каждая линия на фигуре обозначает одно животное. Как показано на фиг. , мыши, которые ранее получали лечение TFP-T-клетками против MSLN, были способны к повторному снижению объема опухоли или искоренению опухоли, что указывает на то, что у мышей либо сохранились первоначально введенные Т-клетки, либо у них развился вторичный ответ против MSLN. Напротив, мыши, которым повторно ввели клетки Raji (MSLN-), были неспособны контролировать рост опухолей Raji, демонстрируя, таким образом, специфичность TFP-T-клеточного ответа.

Пример 13. Эффективность *in vivo* MSLN ϵ -TFP-T-клеток, полученных у пациентов, в ксенотрансплантатной мышинной модели опухоли MSLN SD1 ϵ -TFP-T-клетки, полученные у пациентов с раком яичников, использовали для проверки противоопухолевой эффективности *in vitro* и *in vivo* SD1 ϵ -TFP-T-клеток против мезотелин-экспрессирующих опухолевых клеток (MSTO-MSLN-Luc). Лентивирус получали в соответствии с тем, как описано выше. Получение CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток из цельной крови пациентов с раком яичников CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки очищали из цельной крови пациентов с раком яичников следующим образом (схематический обзор показан на фиг. 13A). Собирали 40-50 мл гепаринизированной цельной крови пациентов с раком яичников и транспортировали в течение ночи с помощью Convergant Bio (Хантсвилл, штат Алабама). Кровь разводили равным объемом PBS, и 35 мл разведенной цельной крови осторожно наносили на 15 мл Ficoll-Paque® (GE healthcare, № по кат.: 17-5442-02) в конической пробирке объемом 50 мл. Затем ее центрифугировали при 800 × g в течение 20 минут при комнатной температуре в бакет-роторе без торможения. Верхний слой отсасывали, оставляя слой мононуклеарных клеток (лимфоциты, моноциты и тромбоциты) непо потревоженным в интерфазе. Слой мононуклеарных клеток переносили в новую коническую пробирку объемом 50 мл, добавляли 30 мл PBS и центрифугировали при 300×g в течение 10 минут при комнатной температуре. Добавляли 1-2 мл лизирующего буфера ACK (ThermoFisher, № по кат.: A1049201) к осадку, тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 минут, добавляли 20 мл PBS, центрифугировали при 300×g в течение 10 минут при комнатной температуре. Клеточный осадок повторно суспендировали в 10 мл ледяного буфера MACs и подсчитывали клетки с помощью Cellometer Auto 2000. Выделение CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток выполняли с помощью микрогранул человеческого CD4/8 Miltenyi (№ по кат. 130-045-101; 130-045-201) в соответствии с инструкциями производителя.

TFP-T-клетки получали в соответствии с тем, как описано выше, а трансдукцию определяли методом FACS. Экспрессию мезотелина подтверждали на клетках-мишенях (линия MSLN^{high} клеток MSTO-211H-FL MSLN (полученные из собственных родительских MSTO-211H, ATCC, CRL-2081)), а экспрессию MSLN-Fc подтверждали Т-клетками SD1 ϵ -TFP методом проточной цитометрии в тот же день, что и анализ люциферазы. Одну суспензию меченных люциферазой клеток-мишеней (MSTO-211H-FL MSLN-Luc или линия MSLN- клеток C30-Luc (A2780, Sigma)) готовили в среде R10. 1 × 10⁴ клеток-мишеней в 100 μ л добавляли в 96-луночный плоскодонный планшет. TFP-T-клетки добавляли в 100 μ л в другом соотношении эффекторных клеток к клеткам-мишеням (E:T), как указано. Определение эффективности трансдукции на основе FACS и активации Т-клеток

TFP-T-клетки размораживали, дегранулировали (при размножении *ex vivo* в условиях Dynabeads+IL-2), промывали, а затем повторно суспендировали в Т-клеточной культуральной среде без цитокинов. Желаемое количество Т-клеток (в 100 μ л) добавляли для достижения соотношения эффекторных клеток к клеткам-мишеням равного 5 к 1, 1 к 1 и 1 к 5, соответственно. Для каждого типа Т-клеток готовили три повторности в исследуемом соотношении. Затем клетки культивировали в течение 24 часов при температуре 37°C и при 5% CO₂. Через 24 часа совместного культивирования планшет центрифугировали при 300 × g в течение 2 минут для осаждения клеток. 100 μ л надосадочной жидкости культуры из каждой лунки осторожно удаляли для анализа Luminex. В каждую лунку добавляли 100 μ л аналитического буфера от системы Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega, №E2650). Содержимое в каждой лунке перемешивали, аккуратно пипетируя вверх и вниз. Смесь клеток и реагента оставили при комнатной температуре в темноте на 3 минуты для полного лизиса клеток. 200 μ л клеточного лизата из каждой лунки перенесли в 96-луночный планшет с белыми стенками Greiner-One. Люминесценцию измерили в относительных люминесцентных единицах (relative luminescence unit - RLU) с помощью считывателя планшетов M5 SpectraMax (Molecular devices).

Процент (%) лизиса опухоли рассчитали с помощью представленной ниже формулы:

$$\% \text{ лизиса опухоли} = 100 * \left[1 - \frac{\text{Люминесценция (Опухоль + Т-клетка)}}{\text{Люминесценция (Опухоль)}} \right]$$

Анализ Luminex®.

Надосадочную жидкость совместной культуры опухоли и Т-клеток собирали и хранили при температуре -80°C, как было описано ранее. Профили цитокинов определяли с помощью набора Millipore Luminex (HCD8MAG-15K) в соответствии с инструкциями производителя. Надосадочную жидкость поме-

шали на планшет без разведения, а показатель измеряли с помощью технологии Magpix xMAP®.

Ксенотрансплантатная мышьяная модель подкожной мезотелиомы и оценки *in vivo* Самки мышей NSG в возрасте 6 недель (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, № по кат.: 005557, Jackson Laboratories) использовались в данном исследовании. Животных акклиматизировали в течение как минимум 3 дней в условиях, аналогичных условиям исследования. Клетки MStO-211H-FLMSLN-Luc суспендировали в стерильном PBS в концентрации 1×10^6 клеток/100 мкл. Затем клеточную суспензию в PBS смешивали в соотношении 1 к 1 с ледяным Matrigel® для получения конечного объема инъекции 200 мкл для каждой мыши. Полученную в результате клеточную суспензию в PBS/ Matrigel® хранили на льду до подкожного введения в заднюю часть мыши. Рост опухоли отслеживали как объем опухоли путем измерения штангенциркулем. Объем опухоли рассчитывали следующим образом:

$$\text{Объем опухоли} = \frac{1}{2} (\text{длина} \times \text{ширина}^2)$$

Через десять дней после инъекции опухолевых клеток животных рандомизировали в соответствии с объемом опухоли (200~300 мм³) и разделили на 10 групп для получения инъекции SD1 ε-TFP-T-клеток от разных пациентов (количество мышей в группе варьируется в зависимости от количества SD1 ε-TFP-T-клеток, восстановленных в день выполнения инъекции). День выполнения инъекции Т-клеток считался днем 0 исследования. Т-клетки готовили в стерильном PBS в концентрации 5×10^6 клеток/100 мкл. Затем клеточную суспензию инъецировали внутривенно мышам в хвостовую вену.

Размножение *ex vivo* SD1 E-TFP-T-клеток, полученных от пациентов с раком яичников MSLN-специфические sdAb TFP-T-клетки готовили с помощью лентивирусных кодирующих CD3ε форматов TFP со связующими антителами SD1, нацеленными на MSLN. Кратное размножение, определенное с помощью подсчета жизнеспособных клеток на 10 день, варьировалось от 8,58 до 28,2 раз (17,8 +/- 3,3) по сравнению с днем 0 для клеток, полученных с помощью Dynabeads®+IL-2, и от 10 до 33,6 раз (22,9 +/- 5,0) по сравнению с днем 0 для клеток, полученных с помощью TransAct® + IL-7/15. Эффективность трансдукции для SD1 ε-TFP-T-клеток определяли на 10 день размножения путем окрашивания поверхности в отношении присутствия ЗФБ и MSLN-Fc на CD4⁺ и CD8⁺ популяциях. Эффективность трансдукции находилась в диапазоне от 28,6% до 52,1% (40,9 +/- 4,0%) для клеток, полученных с помощью Dynabeads+IL-2, и от 5,7% до 46,9% (26,8 +/- 6,3%) для клеток, полученных с помощью TransAct+IL-7/15; никаких значимых различий кратного размножения и эффективности трансдукции между условиями Dynabeads+IL-2 и TransAct+IL-7/15 не наблюдалось. Количество копий вектора на клетку соответствовало эффективности трансдукции, при этом количество копий составило около 1~2 на клетку в условиях Dynabeads+IL-2 или TransAct+IL-7/15, за исключением пациента 1, у которого было 0,38 копий вектора на клетку.

Противоопухолевая активность *in vitro* SD1 ε-TFP-T-клеток, полученных от пациентов с раком яичников

Эффективность *in vitro* SD1 ε-TFP-T-клеток, полученных от пациентов с раком яичников, была протестирована с помощью анализов лизиса репортерных опухолевых клеток на основе люциферазы. Экспрессию мезотелина подтверждали на линиях клеток MStO-211H-FLMSLN-Luc в день проведения анализа (Фиг. 13B); все SD1 ε-TFP-T-клетки продемонстрировали различные уровни уничтожения опухоли. Устойчивый лизис опухолевых клеток наблюдался у пациентов 1, 2, 4 и 5 (75%~97%). MSLN ε-TFP-T-клетки при совместном культивировании с MStO-211H-FLMSLN-Luc (экспрессор MSLN high) при соотношении эффекторных клеток к клеткам-мишеням 5 к 1, при этом пациент 3 демонстрирует ~35% опухолевый лизис при соотношении эффекторных клеток к клеткам-мишеням 5 к 1, 4 из 5 пациентов (пациенты 1, 2, 4 и 5) продемонстрировали в среднем 50% опухолевый лизис при соотношении эффекторных клеток к клеткам-мишеням 1 к 1, 2 из 5 (пациенты 4 и 5) продемонстрировали ~50% опухолевый лизис даже при соотношении эффекторных клеток к клеткам-мишеням 1 к 5. Все Т-клетки продемонстрировали быстрое уничтожение опухолевых клеток. Опухолевый лизис не наблюдался для всех Т-клеток MSLN ε-TFP™ при совместном культивировании с мезотелин-отрицательными линиями клеток C30-Luc (Фиг. 13C). Профили цитокинов MSLN ε-TFP пяти пациентов были проанализированы, используя панель человеческих CD8 Lumipex®, цитолитические цитокины, такие как IFN-γ, GM-CSF, гранзим-А/В, IL-2, MIP-1α/β, TNF-α, и перфорин, были значительно повышены в Т-клетках MSLN ε-TFP™ по сравнению с нетрансдуцированными Т-клетками (Фиг. 13D-L).

Эффективность *in vivo* MSLN ε-TFP-T-клеток в ксенотрансплантатной мышьяной модели MSLN-экспрессирующей опухоли MStO-211H-FLMSLN-Luc использовали для установления мышьяной модели подкожно ксенотрансплантатной мезотелин-экспрессирующей опухоли. Объем опухоли измеряли два раза в неделю. На 10 день после инъекции опухоли средний объем опухоли достигал 200-300 мм³, а MSLN ε-TFP-T-клетки, размножившиеся в течение 10 дней, от одного нормального донора (ND12, фиг. 14A) и пациентов 1-4 (Фиг. 14B-E) размораживали и подтверждали эффективность трансдукции. 5×10^6 MSLN ε-TFP-T-клеток или нетрансдуцированных Т-клеток на мышшь инъецировали в/в, после чего отслеживали объемы опухолей. MSLN ε-TFP-T-клетки от 3 из 4 пациентов (пациенты 1, 2 и 4) продемонстрировали полное удаление опухоли на 20 день после инъекции Т-клеток. Удаление опухоли сохранялось

до 40 дня. Пять из шести мышей получили MSLN ϵ -TFP-T-клетки от пациента 3, который продемонстрировал частичную защиту. Из всех четырех пациентов, которые получили MSLN ϵ -TFP-T-клетки от ND12 один продемонстрировал полное удаление опухоли, а два пациента продемонстрировали частичное удаление опухоли.

Примечания.

Несмотря на то что в настоящем документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что эти варианты осуществления приведены исключительно с целью иллюстрации. Множество вариаций, изменений и замен будут очевидны специалистам в данной области техники без отхода от объема и сущности настоящего изобретения. Следует понимать, что различные альтернативные варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, могут применяться при практической реализации настоящего изобретения. Подразумевается, что нижеприведенная формула изобретения определяет объем настоящего изобретения, и что способы и структуры в рамках объема этой формулы, а также их эквиваленты будут охватываться данной формулой.

Приложение А. Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO.	Название	Последовательность
1	Короткий линкер 1	GGGGSGGGSGGGGSLE
2	Короткий линкер 2	AAAGGGSGGGSGGGGSLE
3	Длинный линкер	AAAIEVMYPPPYLGGGGSGGGSGGGGSLE
4	CD3- ϵ человека	MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGIT QTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIG GDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPR GSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMMSVATIVI VDICITGGLLLL VYYWSKNRKAKAKPVTRGAGA GGRQRGQNKERPPVPNPDYEPKRGQRDLYSGL NQRRRI
5	CD3- γ человека	MEQGKGLAVLILAILLQGTLAQSIKGNHLVKVYD YQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGMIGFLTEDK KKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYY RMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLA VGVYFIA GQDGVQRSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQ YSHLQGNQLRRN
6	CD3- δ человека	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIELEDRVFN CNTSITWVEGTGTLSDITRLDLGKRILDPRGIYR CNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVA GIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQ ALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNKS
7	CD3- ζ человека	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLDPKLCYL LDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGKPKQR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
57	α -цепь TCR человека	MAGTWLLLLLALGCPALPTGVGGTFFPSLAPPIML LVDGKQQMVVCLVLDVAPPGLDSPIWFSAGNG SALDAFTYGPSATDGTWTNLAHLSLPSEELASW EPLVCHTGPAGEGHSRSTQPMHLSGEASTARTCP QEPLRGTPGGALWLGVLRLLLFKLLFDLLLTCS LCDPAGPLPSPATTTLRALGSHRLHPATETGGRE ATSSPRPQRDRRWGDTPPGRKPGSPVWGEYSYL

		SSYPTCPAQAWCSRSALRAPSSSLGAFFAGDLPPP LQAGA
9	C-область α -цепи TCR человека	PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNV SQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSCDVKLVEKS FETDTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRL WSS
10	V-область α -цепи TCR человека CTL-L17	MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQ NSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKYP EGPTFLISSIKDKNEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIV PSQPGDSAVYFCAAKGAGTASLTFGTGTRLQVT L
11	C-область β -цепи TCR человека	EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATG FFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSAFTWQNP RNHFRCQVQFYGL SENDEWTQDRAKPVTVIVSAEAWGRADCGFTSV SYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMA MVKRKDF
12	V-область β -цепи TCR человека CTL-L17	MGTSLLCWMALCLLGHADTGVSQNPRHNITK RGQNVTFRCDPSEHNRLYWYRQTLGQGPEFLTY FQNEAQLEKSRLSDRFS AERP KGSFSTLEIQRTEQ GDSAMYLCASSLAGLNQPQHFGDGRLSIL
13	V-область β -цепи TCR человека YT35	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEM GQEVTLRCKPISGHNSLFWYRQTMMRGLELLIYF NNNVPIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEP RDSAVYFCASSFSTCSANYGYTFGSGTRLTVV
14	ДНК-последовательность MSLN	acgcgtgtagtcttatgcaatactctgtagtctgcaacatggaacgatgagtt agcaacatgccttacaaggagagaaaaagcacctgcatgccgattggtgga agtaaggtagtacctgctcttattaggaagcaacagacggctgacat ggattggacgaaccactgaattgccgattgagagatattgtattaaagtgcct agctcgatacaataaacgggtctctctgtagaccagatctgagcctggag ctctctggctaactaggaaccactgcttaagcctcaataaacctgctctgag tgctcaagtagtgtgtcccgtctgtgtgactctgtaactagagatccctc agacccttttagtcagtgtagaaaatcttagcagtgccgcccgaacaggac ctgaaagcgaaaggaaaaccagagctctctcgacgaggactcggctgctg aagcgcgcacggcaagaggcaggggcggcactggtgagtacccaaa aattttgactagcggaggctagaaggagagatgggtgcgagagcgtcagtt attaagcgggggagaattagatcgcatgggaaaaaattcggttaaggccag

	<p>ggggaagaaaaataaataaataaataatagatgggcaagcaggagct agaacgattcgcagttaatcctggcctgtagaaacatcagaaggctgtagaca aatactgggacagctacaaccatccctcagacaggatcagaagaacttagat cattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaagatagagataaa agacaccaaggaagcttagacaagataggaagagcaaaacaaaagtaa gaccaccgcacagcaagcggcactgatctcagacctggaggaggagata tgagggacaattggagaagtgaattatataaataaagtagtaaaaatgaac cattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtgtgagagagaaa aaagagcagtggaataggagcttctccttgggttctgggagcagcagga agcactatggcgagcctcaatgacgctgacggtacaggccagacaattat gtctggtatagtgcagcagcagaacaattgtgagggtattgaggcgaac agcatctgtgcaactcacagtctgggcatcaagcagctccaggcaagaatc ctggctgtggaagatacctaaaggatcaacagctcctgggatttgggtg ctctggaactcattgaccactgctgtgcttggatgctagtggagtaaat aaatctctggaacagattggaatcacagcctggatggagtgggacagaga aattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatgcaaaaccag caagaaaagaatgaacaagaattatggaattagataaatggcaagttgtgg aattggttaacatacaaaftggctgtgtatataaaattatcataatgatagta ggaggctgtgtaggttaagaatggtttgtctactttctatagtaatagatt aggcaggatattcaccattatcttgcagaccacctccaaccccaggggg accgcacagggcccgaaggaatagaagaagaagggtggagagagagacaga gacagatccattcgattagtgaacggatctcagcggatcggftaactttaaaa gaaaaggggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataa tagcaacagacatacaactaaagaattacaaaacaaattcaaaatcaaaa ttttatcgatactagtattatgccagtagaccttattggacttctacttggc agtacatctacgtatttagtcatcgtattaccatggtgatcggtttggcagtac atcaatgggcgtggatagcgggttgactcacggggattccaagtctccaccc attgacgtcaatggga gtttgtttggcaccaaaatcaacgggactttcaaatgtcgtacaactccgc ccattgacgcaaatggcggttagcgtgtacggtggaggttatataagca gagctcgttagtgaaccgtcagatcgcctggagacgcatccacgctgtttg acctcatagaagatttagagccaccatgcttctcctggtgacaagcctt ctgctctgtgagtaccacaccagatcctcctgatccagacattcagcag gtccagctccagcagctggccctgaaactgaaaaacctggcgtagcgtga aaatttctgtaaagcctccggctacttttactggctacacaatgaattgggtg aaacagctcacggcaaatccctgaaatggatcggactcatcacacctacaat ggcgcctcttctacaaccgaaatccggggcaaggcaaacactcactgtgg acaaatcatcctctaccgctacatggatctctcctcctcacatctgaggactc</p>
--	---

		<p>cgctgtctacttttggcccggaggagatacaggagaggattcgattactg gggacagggaaactgtgacggtgtctagtggcggcgaggaggaggag gcggaggatcttctggcggggatccgatattgaaacacacagtctcccgt atcatgtctcttctcccggagaaaagtactatgactgtctctctctctt gtgtctacatgcactggaccagcaaaatctggcacatcccctaacggg gatctacgatactagcaaaactggcatccggcgtgctggcgattctctg tggctctggcaactcttactctcacaatctctctgaggtgagggacgat gccacatactactgtcagcagtggtctaaacaccactcacattcggcgtg cactaaactggaaataaaagcggccgaggtggcggggtctggtggcgg cggttctggtggcggcgggtctctcagagatgtaataagaaatgggtgat tacacagacaccatataaagtctccatctctggaaccacagtaattgacatgc cctcagtatcctggatctgaatactatggcaacacaatgataaaacataggc ggtgatgaggatgataaaacataggcagtgatgaggatcacctgtcactgaa ggaatttcagaattggagcaaatggttattatgtctgtaccagagggaag caaaccagaagatcgaaactttatctctactgaggcgaagagtggtgaga actgcatggagatggatgtgatgtcggggccacaattgcatagtggacatct gcatcactggggctgtgtctgtctggttactactggagcaagaatagaaag gccaaggccaagcctgtgacacgaggagcgggtgctggcgagcagcaag gggacaaaacaaggagaggccaccactgttccaaccagactatgagcc catccgaaaaggccagcggacgttattctggcctgaatcagagacgcatct gataagaatcgatccggcggcgaaggatctgcatcgtccgggtgccc tcagtgggcagagcgcacatcggcccagtcggcgaagttggggggag gggtcggcaattgaacgggtgcctagagaagggtggcggggtaaaactggg aaagtgatgtcgtactgctccgcttttcccagggtgggggagaaccgt atataagtgcagtagtcgccgtgaacgttttttcgcaacgggttccgcccag aacacagctgaagcttcgaggggctcgcacatctctcttcacgcgcccgc cctacctgaggcccatccacgccggtgagtcgcttctgccctcccgc ctgtggtcctcctgaaactgcgtccgcttagtaagtttaaagtcaggtc gagaccggcccttctccggcgtcccttgagcctacctagactcagccgg ctctccacgcttgcctgacctgcttctcaactctacgtcttfttcttctgt tctgcgcttacagatccaagctgtgaccggcctacgctagatgaccgag tacaagcccacggtgcctcgcaccccgcgacgactcccagggccgta cgaccctcggccggttcgactaccccacgcgcccacaccgtc gatccggaccgccacatcgagcgggtcaccgagctgcaagaactctctca cgcgctcgggctcgacatcggcaagggtgggtcgggacgacggcgc gcggtggcgtctggaccacccggagagcgtgaaagcggggcgggtgt cgccgagatcggcccgcacatggccgagttgagcgggtcccggctgccc gcagcaacagatggaaggcctcctggtcggccaccggcccaaggaccg</p>
--	--	---

	<p> cgtggctcctggccaccgtcggcgtctcgcgccaccaccagggaagggtct gggcagcgcctcgtgctccccggagtgaggcggccgagcgcgcggg gtgccgccttcctggagacctccgccccgcaacctccccctctacgagcg gctcggcttcaccgtcaccgcccagctcaggtgccgaaggaccgacac ctggtgatgaccgcaagccgggtcctgagtcgacaatcaacctctggatt acaaaattgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgccttttacgctatg tggatacgtccttaatgcctttgatcatgctattgctcccgtatgctttcattt tctcctctgtataaatcctggtgctgctctttatgaggagttgtggccggtgt caggcaacgtggcgtggtgactggtttgctgacgcaacccccactggtt ggggcattgccaccacgtcagctccttccggacttcccttccccctccc tattgccacggcgaactcatcgccgctgctcccgtgctgacagggg gctcggctgtggcactgacaattccgtggtgtgctgggaaatcatgctcc tttccttggctcctcctgtgtgacacgtgattctgcggggacgtcctctg ctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccctccggcctgctgccc ggctctcggcctcttccgctcttcgcttccctcagacgagtcggatctc cctttgggcccctccccctgtaccttaagaccaatgactacaaggcag ctgtagatcttagccacttttaaaagaaaagggggactggaaggcctaattc actccaacgaaaataagatctgcttttctgtactgggtctctctggttagac cagatctgagcctgggagctctctgctaactagggaaccactgcttaagcc tcaataaagctgctttagtctcaagtagtgtgcccgtctgtgtgact ctggtaaactagagatcctcagacccttttagtcagtgtgaaaatctctagcag tagtagtcatgtcatcttattatcagatttataactgcaagaatgaatatca gagagtgaagggaactgtttattgacgttataatggttacaataaagcaata gcatcacaatttcacaataaagcatttttctactgcattctagttgtgtttgc caaactcatcaatgtatcttatcatgctgctctagctatcccccccctaactcc gcccagttcccccattctccgccccatggctgactaattttttattatgcaga ggccgaggccgctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggagccttt ttggaggccttagacttttgcagagacggccaaattcgtaatcatggtcatagct gtttctgtgtgaaattgtatcgcctcacaattccacacaacatacagccgga agcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatgagtgagtaactcacattaatt gcgttgcgctcactgcccgttccagtcgggaaacctgctgcccagctgcat taatgaatcggcaacgcggggagaggcgggttgcgtattgggctctctc cgcttctcgcicactgactcgtcgcctcggctcgtcggctgctgagcgg tatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataac gcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaacctgaa aaaggccgctgctggcgttttccataggctccgccccctgacgagcatc acaaaaatcgacgtcaagttagaggtggcgaacccgacaggactataaa gataccaggcgttccccctggaagctccctcgtgcgtctctcttccgaccc </p>
--	--

	<p>tgccgcttacggatacctgtccgctttctccctcgggaagcgtggcgtttc tcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctg ggctgtgtgcacgaacccccgtcagcccgaccgctgcgcttatccggtaa ctatcgtcttgagccaaccggtaaagacacgacttatgccactggcagcag ccactggtaacaggattagcagagcagggtatgtaggcgggtctacagagttc ttgaagtgggtgacctaacggctacactagaaggacagattttggtatctgc gctctgctgaagccagttaccttcggaaaagagttgtagctcttgatccggc aaacaaaccaccgctggtagcgggtggtttttgtttgcaagcagcagattacgc gcagaaaaaaggatctcaagaagatccttgatctttctacgggtctgacg ctcagtggaacgaaaactcagttaagggttttggcatgagattatcaaaaa ggatcttcacctagatcctttaaataaaaatgaagtttaaatcaatcaagat atatgagtaacttggctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatct cagcgtctgtctatttcttccatccatagttgctgactccccgtcgtgtagata actacgatacgggagggttaccatctgccccagtgctcaatgataccgcg agaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccgga agggccgagcgcagaagtgtcctgcaactttatccgctccatccagctatt aattgttccgggaagctagagtaagtagttccagtaatagtttgcgcaac gttgttgcattgctacaggcatcgtggtgcacgctcgtcgtttggtatggcttc atcagctccggttccaacatcaaggcaggttacatgatccccatgttgg caaaaaagcggtagctcctcggctcctccgatcgttgcagaagtaagttggc cgcagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataaattcttactgtcatgc catccgtaagatgctttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaa tagtgtatcggcgaccgaggtgctcttcccggcgtcaatacgggataatacc gcgccacatagcagaacttaaaagtgtcctcattggaaaacgttcttgggg cgaaaactctcaaggatcttaccgctgttagatccagttcgtatgaaccactc gtgcaccaactgatctcagcatctttacttaccagcgtttctgggtgagca aaaacagggaagcaaaatccgcaaaaagggaataaggcgcacacggaa atgttgaatactcatactcttctttcaatattattgaagcatttatcagggtattg tctcatgagcggatacatattgaaatgatttgaaaaaataaacaataggggctc cgcgcacattccccgaaaagtccacctgacgtctaagaaaccattattatcat gacattaacctataaaaataggcgatcacgagcccttctcgtcgcggttcc ggtgatgacgggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacag cttctgtgaagcggatccgggagcagacaagcccgtcaggcgcgtcag cgggtgttggcgggtgtcgggctggcttaactatcggcatcagagcagatt gtactgagagtgaccatfatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaagga gaaaataccgcatcaggcgcattcgcattcaggtcgcgcaactgttgggaa ggcgcatcgggtcggcctcttctgctattacgccagctggcgaagggggat</p>
--	---

		gtgctgcaaggcgattaagtgggtaacgccagggttttccagtcacgacgtt gtaaacgacggccagtgccaagctg
15	аминокислотная последовательность MSLN: последовательность мезотелина человека (учетный номер UniProt Q13421)	MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSR TLAGETGQEAAPLDGVLANPPNISSLSRQLLGFP CAEVSGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCL AHLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDAFSGPQACTR FFSRITKANVDLLPRGAPERQRLPAALACWGVV GSLLSEADVRLGGLACDLPRGFVAESAELLPR LVSCPGPLDQDQEAARAALQGGGPPYGGPSTWS VSTMDALRGLLPVLGQPIRSIPQGIVAAWRQRSS RDPSWRQPRTLPRFRREVEKTACPSGKKAREI DESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFT YEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLFLKM SPEDIRKWNVTSLETLKALLEVNGHEMSPQVAT LIDRFVKGRGQLDKDLDLTAFYPGYLCSLSPPE LSSVPPSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLA FQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTELDKALSQQNVS MDLATFMKLRTDAVPLPLTVAEVQKLLGPHVEGL KAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLGLQGGIPN GYLVLDLSMQEALSGTPCLLGGPVLTVLALLLA STLA
16	ДНК p510_anti- MSLN_SS1_CD3ε	accgctgtagcttattgcaatactctgtagcttgaacatgtaacgatgagtt agcaacatgccttacaaggagagaaaaagcacctgcatgcccattggggga agtaagggtgtacatgctgcttattaggaaggcaacagacgggtctgacat ggattggacgaaccactgaattgccgattgacagatattgtatttaagtcct agctcgatacaataaacgggtctctctgtagaccagatctgagcctgggag ctctctggctaactagggaaaccactgctaagcctcaataaagcttgcttgag tgcttcaagtagtgtgtgccctgtgtgtgactctgtaactagagatccctc agacccttttagctagtgtaaaatctctagcagtgcccccgaacaggac ctgaaagcgaagggaaccagagctctctcagcagactcggctgtctg aagcgcgcacggcaagaggcgagggggcggcactggtgagtagcctcaaa aattttgactagcggaggctagaaggagagatgggtgagagcgtcagct attaagcggggagaattagatcgatgggaaaaattcggtaagccag ggggaagaaaaataaataaataatagatagggcaagcaggagct agaacgattcagctaatcctggcctgtagaaacatcagaaggctgtagaca aatactgggacagctacaaccatccctcagacagatcagaagaacttagat cattatataacagtagcaaccctctattgtgtcatcaaggatagagataaa

	<p> agacaccaaggaagctttagacaagatagaggagcaaaacaaaagtaa gaccaccgcacagcaagcggccactgatcttcagacctggaggaggagata fgagggacaattggagaagtgaaffatataatataaagtagtaaaaaattgaac cattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtggtgcagagagaaa aaagagcagtggaataggagctttgttccttgggtcttgggagcagcagga agcactatggcgagcctcaatgacgctgacggtacaggccagacaattatt gtctgtatagtgacagcagacaacaattgctgagggtattgaggcgcaac agcatctgttcaactcacagtctgggcatcaagcagctccaggcaagaatc ctggctgtgaaagatacctaaggatcaacagctcctgggatttgggggtg ctctggaaaactcatttgaccactgctgtccttggaatgctagtggagtaat aaatctctggaacagattggaatcacagcactggatggagtggacagaga aattaacaattacacaagcttaatacactcctaattgaagaatcgaaaaccag caagaaaagaatgaacaagaaffattggaattagataaatgggcaagttgtgg aattggttaacatacaaaattggctgtgtatataaaattattcataatagatga ggaggctgttaggttaagaatagttttgctgtactttctatagtaatagatt aggcagggataftcaccattatcgttcagaccacctccaaccccgagggg acccgacagggccgaaggaaatagaagaagaagggtggagagagagacaga gacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgftaacttttaaaa gaaaagggggattgggggtacagtgacgggaaagaatagtagacataa tagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaattcaaaa ttttatcgatactagtattatgccagtacatgacctatgggactttcacttggc agtacatctacgtattagtcacgctattaccatgggtgatcggttttggcagtac atcaatggcggtggatagcggtttgactcacggggattccaagtctccacccc attgacgtcaatgggagttgtttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaat gtcgtacaactccgccccattgacgcaaatgggctgtagcggtgtacggtg ggaggttatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgctggagac gcatccacgctgtttgacctccatagaagattctagagccgccaccatgcttc tctgtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattcctctgat cccagacattcagcaggtccagctcagcagctggccctgaactcgaaaaa cctggcgtagcgtgaaaatttctgtaaacctccggctactctttactggcta cacaatgaattgggtgaaacagctcagcgcaaatccctcgaatggatcgagac tcatcacacctacaatggcgctcttctacaaccagaaattccggggcaag gcaacactcactgtggacaaatcctctaccgcctacatggatctgctctccc tcacatctgaggactccgctgtctactttgtcccaggaggatagcagcgac gaggattcgattactgggacagggaaacactgtgaccgtgtctagtggcgg cggaggagtgaggcggagatctctggcggggatccgatattgaactc acacagctcccgtatcatgtctctctcccggcgagaagtgactatgactt gctctgcttctctgtgtcctacatgactggaccagcaaaatctggcac </p>
--	---

		<p>atcccctaaacggtggatctacgatactagcaaacctggcatccggcgtgctg ggcgattctctggctctggctctggcaactcttactctcacaatctcatctg gaggctgaggacgatgccacatactactgtcagcagtggtctaacaccact cacattcggcgtggcactaaactggaaataaaaagcggccgaggtggcgg cggftctggtggcggcggftctggtggcggcggftctctcagagatgtaatg aagaaatgggtggtattacagacaccatataaagtctccatctctggacca cagtaattatgacatgccctcagatcctgcatgaaatactatggcaacaaa tgataaaacatagggcgtgatgaggatgataaaacataggcagtgatgag gatcacctgtcactgaaggaafttcagaattggagcaaagtgggtattatgtctg ctaccccagaggaaagcaaacagaagatcgaaactttatctctactgaggg caagagtgtgagaactgcatggagatggatgtgatgtcgggtggccacaatt gtcatagtgacatctgcatcactggggccttctgctgctggttactactgga gcaagaatagaagccaagccaagcctgtgacacgagagcgggtgct ggcggcaggcaaggggacaaaacaaggagagggccaccactgttccaa cccagactatgagccatccggaaggccagcgggacctgtattctggcctg aatcagagacgcatctgataagaatcgaatccgcccgcgaagatctcgcg atcgtccggtgcccgtcagtgaggcagagcgcacatgcccacagtcccgg agaagttggggggagggtcggcaattgaacgggtgcttagagaaggtggc gccccgtaaacctgggaaagtgatgtcgtgactggctcgccttttccgagg gtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgcccgtgaacgttcttttcga acgggtttccgccaagaacacagctgaagcttcgagggctcgcacatctctct tcacgccccgcccctactgagccgccatccacgcccgttgatgctc gttctgcccctcccctgtggtgctcctgaactgctcgcgctctaggtg agtttaagctcaggtcagaccggcctttgtccggcgtcctctggagccta cctagactcagccgctctccacgtttgctgaccctgctgctcaactctacg tcttgttctgtttctgtctcgcggttacagatccaagctgtgaccggcgccta cgctagatgaccgagtacaagcccacgggtgcccctcgcaccccgcgacgac gtcccaggcgtacgcaccctcggcccgcgttcggcactaccccgc acgcccacaccgtgatccggaccgcccacatcagcgggtcaccgagctg caagaactctctcacgcgctgggctcgcacatcggaaggtgtgggtcgc cggacgacggcggcgggtggtgctgaccacgcccggagagcgtcga agcggggggtggttcgcccagatcggcccgcgatggccgagttgagcg gttccggctggccgagcaacagatggaaggcctcctgcccgcacc ggcccaggagcccgtggtcctgcccaccgtcggcgtctcgcggcacc accagggcaagggtctggcagcggcgtgctccccggagtgaggcgc gcccagcgcgggggtgcccgcctcctggagacctcggccccgcaa cctccccctacgagcggctcggctcaccgtcaccgcccagctcaggtgc ccgaaggaccgcccactggtgcatgaccgcaagcccgggtcctgagtcg</p>
--	--	--

	<p>acaatcaacctctggattacaaaatttgaaagattgactggfattcttaactatg ttgctccctttacgctatgtggatacctgcttfaatccctttgtatcatgctattgct tcccgataggcttcattttctcctcctgtataaatcctggfctgtctctttatgag gagttgtggcccgtgtcaggcaacgtggcgtgggtgcaactgtttgtgac gcaacccccactggfggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggact ttcgctttccccctcctattgccacggcggaaactcaicgcgcgctgcttccc gctgctggacagggctcggctgtgggcaactgacaattccgtgggtgtgctg gggaaatcatcgtcctttcctggctgctcgcctgtgttccacctggattctgcg cgggacgtccttctgctacgtccctfeggccctcaatccagcggacctcctcc cgcgctgctgcccgtctgcccctctcccgcttctccttccctccctcag acgagtcggatctcctttggcgcctccccctgtactttaagaccaat gactacaagcagctgtagatcttagccacttttaaaagaaaagggggact ggaagggtcaattcactcccaacaaaataagatctgcttttgcctgtactggg tctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctgctaactagggaac ccactgcttaagcctcaataaagctgcttgcctgagctcaagtagtgtgtccc gtctgtgtgtgactctgtaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtg aaaatcttagcagtagtagtcatgtcatcttattatcagttataactgcaa agaaatgaatatcagagagtgagaggaaactgtttattgagctataatggtta caataaagcaatgcatcacaatttcacaataaagcatttttctactgcattc tagttgtggtttgccaactcaatgtatcttatcatgtctgcttagctatcc cgcccctaactccgccagftcccccattctccgcccatggctgactaatttt ttttattatgagagccgagccgctcggcctctgagctattccagaagta gtgagggagctttttggagcctagactttgagagacggcccaaatcgtta atcatggtcatagctgttctgtgaaattgtatccgctcacaattccacaaa catacagccggaagcataaagttaaagcctgggtgcctaataatgagtgagc taactcattaattgcttgcgctcactgccgcttccagtcgggaaacctgt cgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgaggagagggcgtttgctg tattggcgctctccgcttctcgtcactgactgctgcgctcggctgcttgg ctgcggcgagcggatcagctcactcaaaaggcggtaatacgggtatccacaga atcaggggataacgaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaagg ccaggaaccgtaaaaaggccgctgtgctgctgttttccataggctcgcctccc cctgacgagcatcacaataatcgacgctcaagtcaagtgaggtggcgaacccg acaggactataaagataccagcgtttcccctggaagctcctcgtgctctt cctgttccgacctgcccctaccgatacctgtccgcttctccctcgggaa gctgtggcgtttctcatagctcagctgtaggtatctcagttcgggtgagtgctt cgtccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgtcagcccaccgctgctg cctatccggtaactatcgtcttgagccaacccgtaagacacgacttatcggc actggcagcagccactgtaacaggattagcagagcggaggtatgtagcgggt</p>
--	--

		<p>gctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagt atttgatctgcgctctctgaaagccagttacctcggaaaaagagttgtagc tcttgatccggcaacaaccaccgctgtagcgggtgtttttgttgcagc agcagattacgcgagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctac ggggtctgacgctcagtggaacgaaactcacgtaagggattttgcatga gattatcaaaaaggatcttcacatagatccttttaaatfaaaatgaagtttaaat caatctaaagtatatatagtaaaacttgctgacagttaccaatgcttaacagt gaggcacctatctcagcagatctgtctatfttcgctcatcatagttgctgactccc cgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggcccagtgctg caatgataccgagaccacgctaccgctccagattatcagcaataaac cagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctctgcaactttatccgct ccatccagctattaattgttccgggaagctagagtaagtagttcgcaggttaa tagtttgcgcaacgttgttgcattgctacaggcatcgtggtgacgctcgtc tttgatggcttattcagctccggttcccaacgatcaaggcagttacatgat ccccatgtgtgcaaaaagcggtagctccttcgctcctccgatcgtgtcag aagtaagttggccgaggttatcactcatggttatggcagcactgcataattct cttactgcatgcatccgtaagatgctttctgtgactggtgagttactcaacaa gtcattctgagaatagtgatgcgccgaccgagttgctcttggccgctcaat acgggataataccgcccacatagcagaacttaaaagtgtcatcattggaa aacgttctcggggcgaactctcaagatcttaccgctgttgagatccagttc gatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagatcttttactttaccagcg tttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaatccgcaaaaagggaataa gggacacggaaatgtgaatactcactcttcttttcaatatttgaagca ttatcagggttatgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaata acaaataggggttcgcgcacatttccccgaaaagtccacctgacgtctaag aaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgatcacgagccctt cgtctcgcggttccggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgacgtccc ggagacggtcacagcttctgtaagcggatccgggagcagacaagccg tcaggcgcgctcagcgggtgttggcgggtgctgggctggttaactatgcg gcatcagagcagattgtactgagagtgaccatagcgggtgtaaataccgca cagatgctaaggagaaaataccgcatcagcgcattcgcattcaggctg cgcaactgttgggaaggcgatcgggtcgggctcttctgctattacgaccgt ggcgaagggggatgtgctgcaaggcgattaagttggtaacgccagggtt tccagtcacgagctgttaaacgacggccagtgccaagctg</p>
17	аминокислота p510_anti-MSLN_SS1_CD3ε	<p>MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQVQLQQSGPEL EKPGASVKISCKASGYSTGYTMNWVKQSHGKSL EWIGLITPYNGASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAY MDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWQGT</p>

		TVTIVSSGGGGSGGGSSGGSDIELTQSPAIMSAS PGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQKSGTSPKRWI YDTSKLAGVPGRFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDD ATYYCQQWSKHPLTFGAGTKLEIKAAAGGGGSG GGGSGGGGSLGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVI LTCQPYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDED HLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYL RARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLL YYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERP PPVNPDYEPKRGQRDLYSGLNQRRI*
18	аминокислота легкой цепи против MSLN (MHC1445LC.1)	DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGN TYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSG SGSGTDFTLKTRVEAEDLGVFVFCSTHVPFTFGS GTKLEIK
19	ДНК легкой цепи против MSLN (MHC1445LC.1)	gatgttgatgacccaaactccactctccctgctgctgagcttggagatcaag cctccatctcttcagatctagtcagagccttgatcacagtaatggaacaccta tttacattgtactctgagaagccaggccagctcctcaagctctgatctacaa agttccaaccgattttctggggtcccagacaggttcagtgagtgatgagcagg gactgattcacactcaagatcaccagagtgaggctgaggatctgggagtttt ttctgctcctcaagtacatgttcattcacgttcgctcggggacaaggtg gaaataaaa
20	аминокислота тяжелой цепи против MSLN (MHC1445HC.1)	QVQLQQSGAELVIRPGASVTLSCASGYTFFDYEM HWVKQTPVHGLEWIGRIDPEIDGTAYNQKFKGK AILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTDYYG SSYWYFDVWGTGTTVTVSS
21	ДНК тяжелой цепи против MSLN (MHC1445HC.1)	caggttaactgcagcagctctgggctgagctggtgaggcctgggcttcagt gacgctgctcctgaaggctcgggctacacattttgactatgaaatgactgg gtgaagcagacacctgtgcatggcctggaatggattggagctattgatcctga aattgatggactgctacaatcagaagttcaaggcaaggccatactgactgc agacaaatcctccagcacagcctacatggagctccgagcctgacatctgag gactctgccgtctattactgtacagattactacggtagtagctactggtacttca tgtctggggcacagggaccacggcaccgtctctctc
22	аминокислота легкой цепи против MSLN (MHC1446LC.1)	DVMMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNG NTYLHWFLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYFCSQTHVPLTF GAGTKLELK
23	ДНК легкой цепи против MSLN (MHC1446LC.1)	gatgttatgatgacccaaactccactctccctgctgctgagcttggagatcaag cctccatctcttcagatctagtcagagccttgatcacagtaatggaacaccta

		ttfacattggtcctgcagaagccaggccagctctccaaagctcctgatcacaag gftccaaccgattttctggggctccagacaggtcagtgaggcagtgatcaggg acagattcacactcaagatcagcagagtgaggctgaggatctgggagttat ttctgctcacaactacacatgtccgctcacgtcggctgggaccaagctgg agctgaaa
24	аминокислота тяжелой цепи против MSLN (MHC1446HC.3)	QVQLQQSGAELVRPGASVTLCKASGYTFTDYEM HWVKQTPVHGLEWIGRIDPEIAGTAYNQKFKGK AILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVVYCSRYGG NYLYYFDYWGQGTTLTVSS
25	ДНК тяжелой цепи против MSLN (MHC1446HC.3)	caggttcaactgcagcagctctgggctgagctggtaggcctgggctcagc gacgctgctcctcaaggctcgggctacactttactgactatgaaatgcaactg gtgaagcagacacctgtccatggcctggaatggattggagctattgatcctgaa attgctggtactgctacaatcagaagtcaaggccaaggccatactgactgca gacaaatcctccagcacagcctacatggagctccgagcctgacatctgagg actctgccgtctattactgtcaagataggggtgtaactaccttactacttgact actggggccaaggcaccactctcacagctcctca
26	аминокислота легкой цепи против MSLN (MHC1447LC.5)	DVLMTQIPLSLPVS LGDQASISCRSSQNIVYSNGNT YLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPFTFGS GTKLEIK
27	ДНК легкой цепи против MSLN (MHC1447LC.5)	gatgtttgatgaccaaattccactctccctgctgctcagctctggagatcaagc ctccatctctgcagatctagtcagaacattgtatagtaatgaaacacctattt agagtggtacctgcagaaccaggccagctcctcaagctcctgatcacaag ttccaaccgattttctggggctccagacaggtcagtgaggcagtgatcaggg cagattcacactcaagatcagcagagtgaggctgaggatctgggagttatt actgcttcaaggtcacatgtccattcacgttcggctcggggcaaaagttgga aataaaa
28	аминокислота тяжелой цепи против MSLN (MHC1447HC.5)	QVQLQQSGAELVRPGASVTLCKASGYTFTDYEM HWVKQTPVHGLEWIGRIDPEIGGSAYNQKFKGRA ILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVVYCTGYDGY FWFAYWGQGTTLTVSS
29	ДНК тяжелой цепи против MSLN (MHC1447HC.5)	caggttcaactgcagcagctccgggctgagctggtaggcctgggctcag tgacgctgctcctcaaggctcgggctacacattactgactatgaaatgcaactg ggtagcagacacctgtcatggcctggaatggattggagctattgatcctg aaattggtggtctgctacaatcagaagtcaaggccaaggccatattgactg cagacaaatcctccagcacagcctacatggagctccgagcctgacatctga ggactctgccgtctattattgtacggctatgatggttactttggttctactgg ggccaagggactctggtcactgtctctca

30	аминокислота легкой цепи против MSLN (MHC1448LC.4)	ENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHW YQKKSSTSPKLWIYDTSKLASGVPGRFSGSGS YSLTISSMEAEDVATYYCFQSGGYPLTFGSGTKLE IK
31	ДНК легкой цепи против MSLN (MHC1448LC.4)	gaaaatgttctcaccagctcagcaatcatgtccgcatctccaggga ggaccatgacctgagctgtagctcaagtgaagtacatgactggtacca gcagaagtcaagcacctccccaaactctggattatgacacatccaactgg cttctggagtcccaggtcgttcagtgaggctgggctggaaactctactctet cacgatcagcagcatggaggctgaagatgttccactattactgtttcagg gagtggtaccactcagttcggctcgggacaaagtggaaataaaa
32	аминокислота тяжелой цепи против MSLN (MHC1448HC.3)	QVQLQQSGAELVRPGASVTLCKASGYTFTDYEM HWVKQTPVHGLEWIGGIDPETGGTAYNQKFKGK AILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTSYYS RVFWGTGTTVTVSS
33	ДНК тяжелой цепи против MSLN (MHC1448HC.3)	caggttcaactgcagcagctggggctgagctggtgagcctggggctcag gacgctgtcctgcaaggctcgggtacacattactgactatgaaatgactg ggtgaaacagacacctgcatggcctggaatggattggaggtattgatcctg aaactggtggtactgctacaatcagaagtcaaggtaaggccatactgact gcagacaaatcctccagcacagcctacatggagctcgcagcctgacatctg aggactctgccccttactgtacaagttactatgtagtagagcttctggggc acagggaccaggtcaccgtctctca
34	аминокислота легкой цепи против MSLN (MHC1449LC.3)	QIVLSQSPAILSAFPGEKVTMTCRASSSVSYMHWY QQKPGSSPKWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSY SLTISSVEAEDAATYYCQQWSSNPPTLTFGAGTKL ELK
35	ДНК легкой цепи против MSLN (MHC1449LC.3)	caaatgttctctcccagctcagcaatcctgtctgcatctccaggggagaag tactatgactgagggccagctcaagtgaagtacatgactggtaccagc agaagccaggatcctccccaaacctggattatgccacatccaacctggctt ctggagtcccctgctcgttcagtgaggctgggctgggaccttactctctcac aatcagcagtggtgaggctgaagatgctgccacttactgcccagcagtgga gtagtaaccaccacgctcagctcggctgctgggaccaagctggagctgaa a
36	аминокислота тяжелой цепи против MSLN (MHC1449HC.3)	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYGI SWVKQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYNESFKGKV TLTADKSSGTAYMELRSLTSEDSAVYFCARWGSY GSPPFYYGMDYWGQGTSTVTVSS
37	ДНК тяжелой цепи против MSLN (MHC1449HC.3)	caggttcagctgcagcagctggagctgagctggcaggcctggggctcag tgaagctgctcgaaggcttctggctacacctcacaagctatggtataagctg

		gggtgaagcagaggactggacagggccttgagtggattggagagattatccta gaagtggtaatacttactacaatgagagctcaagggcaaggtcacactgacc gcagacaaatctccggcacagcgtacatggagctccgcagcctgacatctg aggactctgcggtctatttctgtcaagatgggctcctacggtagtccccctt ttactatggtatggactactgggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctca
38	аминокислота легкой цепи против MSLN (MHC1450LC.3)	DVLMQTPLSLPVSLGNQASISCRSSQSIVHSSGST YLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDFRSGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPYTFG GGTKLEIK
39	ДНК легкой цепи против MSLN (MHC1450LC.3)	gatgtttgatgacccaaactcactctccctgcctgtcagcttggaaatcaag cctccatctcttcagatctagtcagagcattgtacatagtagtgaagcaccta tftagaatgtacctgcagaaaccaggccagtctcaaagctcctgatctaaa agtttccaaccgattttctggggtccagacaggttcagtgagtgatcagg gacagattcacactcaagatcagcagagtgaggctgagatctgggagttt attactgttcaaggctcacatgtccatacacgttcggagggggaccaagc tggaataaaaa
40	аминокислота тяжелой цепи против MSLN (MHC1450HC.5)	QVQLQQSGAELARPGTSVKVSKASGYTFTSYGI SWVKQRIGQGLEWIGIEIHPRSGNSYYNEKIRGKA TLTADKSSSTAYMELRSLI SEDSAVYFCARLITTV VANYYAMDYWGQGTSTVTVSS
41	ДНК тяжелой цепи против MSLN (MHC1450HC.5)	cagggtcagctgcagcagctggagctgagctggcaggcctgggacttcag tgaaggtgtcctgcaaggcttctggctatacctcacaagttatgtataagctg ggtaagcagagaattggacagggccttgagtgattggagagattcatccta gaagtggtaatagttactataatgagaagatcaggggcaaggccacactgact gcagacaaatcctccagcacagcgtacatggagctccgcagcctgatctga ggactctgcggtctatttctgtgcaaggctgattactacggtagtgcctaattact atgctatggactactgggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctca
42	аминокислота легкой цепи против MSLN (MHC1451LC.1)	DIVMSQSPSSLA VSAGEKVTMSCKSSQLLNSRTR KNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDFRT GSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLVTF GAGTKLELK
43	ДНК легкой цепи против MSLN (MHC1451LC.1)	gacattgtgatgtcacagctcctacccctggctgtgctcagcaggagagaag gtcactatgagctgcaaatccagtcagagctgctcaacagtagaaccgaaa gaactactggcttggtagcagcagaaccaggcagctcctaaactgctgat ctactgggcatccactaggaatctggggtccctgatcgcttcacaggcagtg gatctgggacagatttcacttcaccatcagcagtggtcaggctgaagacctg

		gcagtttattactgcaacaatcttataatctggtcacgtcgggtctgggaccaa gctggagctgaaa
44	аминокислота тяжелой цепи против MSLN (MHC1451HC.2)	QVQLQQSGAELVLRPGASVTLCKASGYTFFDYEM HWVKQTPVHGLEWIGAIIDPEIDGTAYNQKFKGK AILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTDYYG SSYWFYFDVWGTGTTVTVSS
45	ДНК тяжелой цепи против MSLN (MHC1451HC.2)	caggttcaactgcagcagctctgggctgagctggtgagcctgggcttctcag gagcgtctcctgcaaggctcgggctacacatttttactatgaaatgactgg gtgagcagacacctgtgcatggcctggaatggattggagctattgatcctga aattgatggactgcctacaatcagaagtcaaggcaaggccatactgactgc agacaaatcctccagcacagcctacatggagctccgagcctgacatctgag gactctgccgtctattactgtacagattactacggtagtagctactggtactcga tgtctggggcacagggaccacgggtaccgtctctc
46	аминокислота легкой цепи против MSLN (MHC1452LC.1)	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTISCSASSSVSYMYWY QQKPGSSPKWIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSY SLTISSMEAEDAATYYCQQYHSYPLTFGAGTKLE LK
47	ДНК легкой цепи против MSLN (MHC1452LC.1)	caaaftgtctcaccagctctccagcaatcatgtctgcatctccagggagaag gtcaccatactctcagtgccagctcaagtgaagtacatgactggtaccag cagaagccaggatcctccccaaccctggattatcgcacatcaacctggc ttctggagtccctgctcgttctcagtgccagtggtctggacctcttactctca caatcagcagcatggaggctgaagatgctgccacttactgcccagcagtatc atagttaccactcacgttcgggtctgggaccaagctggagctgaaa
48	аминокислота легкой цепи против MSLN (MHC1452LC.6)	QIVLTQSPAIMASAPGERVTMTCSASSSVSSSYLY WYQQKSGSSPKLWIYISNLASGVPARFSGSGSGT SYSLTINSMEAEDAATYYCQQWSSNPQLTFGAGT KLELK
49	ДНК легкой цепи против MSLN (MHC1452LC.6)	caaaftgtctcaccagctctccagcaatcatgtctgcatctcctgggaacgg gtcaccatgacctgcagtgccagctcaagtgaagtccagctactgtactggt accagcagaagtcaggatcctcccaaaactctggattatagcatatccaacc tggcttctggagtccagctcgttctcagtgccagtggtctggacctcttactc tctcaaatcaacagcatggaggctgaagatgctgccacttactgcccagca gtggagttagtaaccacagctcacgttcgggtctgggaccaagctggagctg aaa
56	аминокислота тяжелой цепи против MSLN (MHC1452HC.2)	QVQLKQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYI NWKQRPQGLEWIGKIGPGSGSTYYNEKFKGK ATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARTGY YVGYAMDYWGQGTSVTVSS

50	ДНК тяжелой цепи против MSLN (MHC1452HC.2)	caggtccagctgaagcagctctggagctgagctggtgaagcctgggcttcag tgaagatctctgcaaggcttctggctacacctcactgactactataataaactg ggtaagcagaggcctggacagggccttgagtgattggaagattggctct ggaagtggtagtactactacaatgagaagtcaaggccaaggccacactgac tcagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctg aggactctgcagctatttctgtgcaagaactggttactacgttggtactatgta tggactactggggtcaaggacctcagtcaccgtctctca
51	аминокислота тяжелой цепи против MSLN (MHC1452HC.4)	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTIYGIS WVKQRTGQGLEWIGEIYPRSDNTYYNEKFKGKA TLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARWYSF YAMDYWGQGTSVTVSS
52	ДНК тяжелой цепи против MSLN (MHC1452HC.4)	caggttcagctgcagcagctctggagctgagctggcgaggcctgggcttcag tgaagctgtcctgcaaggcttctggctacacctcacaatctatggfataagctg ggtaaacagagaactggacagggccttgagtgattggagagattatccta gaagtataatactactacaatgagaagtcaaggccaaggccacactgact gcagacaaatcctccagcacagcgtacatggagctccgcagcctgacatctg aggactctgcggtctatttctgtgcaagatggtactcttctatgctatggactac tggggtcaaggacctcagtcaccgtctctca
58	Однодоменное связующее антитело 1 против MSLN (SD1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGDWSANF MYWYRQAPGKQRELVARISGRGVVDYVESVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVAS WGQGTLLVTVSS
59	Однодоменное связующее антитело 4 против MSLN (SD4)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTSSINTMY WYRQAPGKERELVAFISSGGSTNVRDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNTYIPYGG TLHDFWGQGTLLVTVSS
55	Однодоменное связующее антитело 6 против MSLN (SD6)	QVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSTFSIRAM RWYRQAPGTERDLVAVIYGSSTYYADAVKGRFTI SRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNADTIGT ARDYWGQGTLLVTVSS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий:

(a) субъединицу TCR, содержащую

(i) внеклеточный домен TCR,

(ii) трансмембранный домен TCR и

(iii) внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 эpsilon, CD3 delta или CD3 gamma; и

(b) мышинный, человеческий или гуманизированный вариабельный домен антитела, содержащий связывающий домен против мезотелина, причем мышинный, человеческий или гуманизированный вариабельный домен антитела представляет собой домен scFv или sdAb антитела;

причем внеклеточный домен TCR и связывающий домен против мезотелина функционально соединены, причем по меньшей мере два из (i), (ii) и (iii) происходят из одной и той же субъединицы TCR, причем одна и та же субъединица TCR представляет собой CD3 эpsilon, CD3 delta или CD3 gamma, и при этом TFP функционально взаимодействует с TCR при экспрессии в Т-клетке.

2. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, в которой связывающий домен против мезотелина функционально соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности.

3. Молекула нуклеиновой кислоты по п.2, в которой линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n =$ от 1 до 4.

4. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, в которой субъединица TCR содержит (i) внеклеточный домен TCR, (ii) трансмембранный домен TCR и (iii) внутриклеточный домен TCR, причем (i), (ii) и (iii) происходят из одной и той же субъединицы TCR.

5. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, в которой субъединица TCR содержит полноразмерную последовательность внеклеточного домена TCR.

6. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, представляющая собой вирусный вектор или плазмиду.

7. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, в которой связывающий домен против мезотелина содержит домен V_{HH} , содержащий последовательность: (i) с 70-100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 58; или (ii) с 70-100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 59.

8. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, в которой связывающий домен против мезотелина содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи (HC), CDR2 HC и CDR3 HC последовательности SEQ ID NO: 58 или SEQ ID NO: 59, где последовательности CDR определены по системе нумерации Kabat.

9. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, в которой домен мышиного, человеческого или гуманизованного антитела представляет собой домен sdAb антитела.

10. Молекула рекомбинантного TFP для лечения рака, связанного с экспрессией мезотелина, кодируемая молекулой рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п.1.

11. Человеческая Т-клетка для лечения рака, связанного с экспрессией мезотелина, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-8.

12. Человеческая Т-клетка по п.11, причем человеческая Т-клетка представляет собой Т-клетку, проявляющую увеличенную цитотоксичность в отношении клетки, экспрессирующей мезотелин, по сравнению с цитотоксичностью Т-клетки, не содержащей TFP, в отношении клетки, экспрессирующей мезотелин.

13. Человеческая Т-клетка по п.12, причем человеческая клетка представляет собой $CD8^+$, $CD4^+$ Т-клетку, $CD4^+ CD8^+$ Т-клетку; гамма-дельта Т-клетку; альфа-бета Т-клетку или NKT-клетку.

14. Человеческая Т-клетка по п.12, где продукция IL-2 или $IFN\gamma$ Т-клеткой увеличивается в присутствии клетки, экспрессирующей мезотелин; или где Т-клетка имеет более большую или более эффективную цитотоксическую активность, чем цитотоксическая активность соответствующей Т-клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), состоящий из (a) связывающего домена против мезотелина, функционально связанного с (b) по меньшей мере частью внеклеточного домена CD28, (c) трансмембранного домена CD28, (d) по меньшей мере части внутриклеточного домена CD28 и (e) внутриклеточного домена CD3 зета.

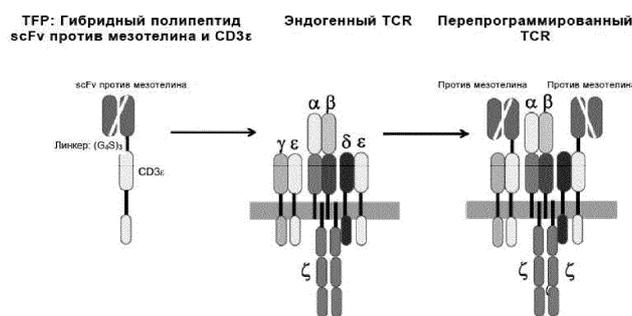
15. Применение композиции, содержащей человеческую Т-клетку по любому из пп. 11-14, для лечения рака, связанного с экспрессией мезотелина, у млекопитающего.

16. Применение по п.15, в котором рак выбран из мезотелиомы, почечно-клеточной карциномы, рака желудка, рака молочных желез, рака легких, рака яичников, рака предстательной железы, рака толстой кишки, рака шейки матки, рака головного мозга, рака печени, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака мочевого пузыря, рака мочеточников, рака почек, рака эндометрия, рака пищевода, рака ЖКТ, рака вилочковой железы, холангиокарциномы и их метастазов.

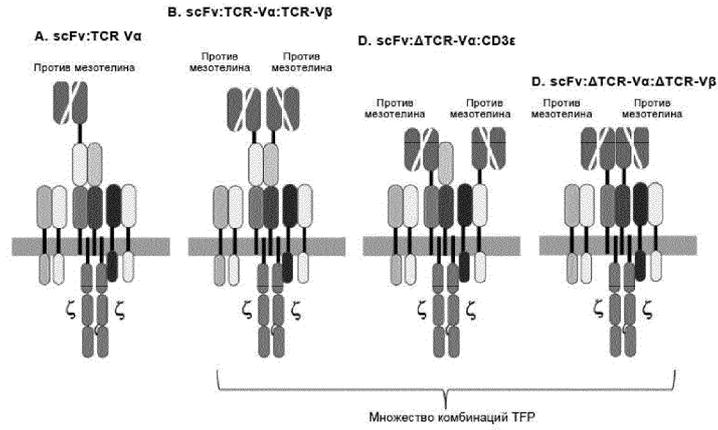
17. Применение по любому из пп. 15, 16, в котором человеческая Т-клетка представляет собой аутологическую Т-клетку или аллогенную Т-клетку.

18. Применение по любому из пп. 15-17, причем композиция дополнительно содержит антитело или фрагмент антитела, причем антитело или фрагмент антитела блокирует ингибирующую молекулу, причем ингибирующая молекула снижает способность Т-клетки, экспрессирующей TFP, вызывать иммунный эффекторный ответ.

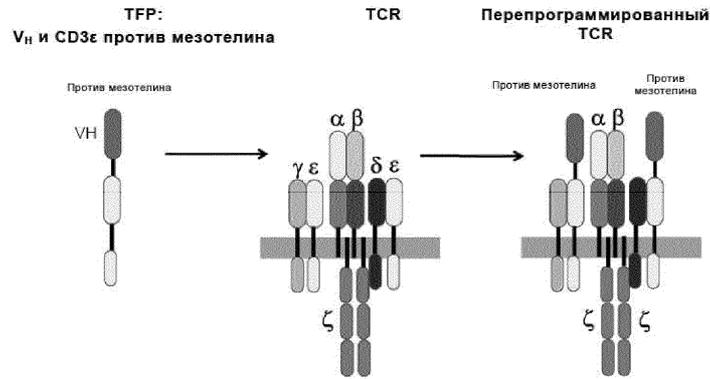
19. Применение по п.18, причем ингибирующая молекула представляет собой PD1.



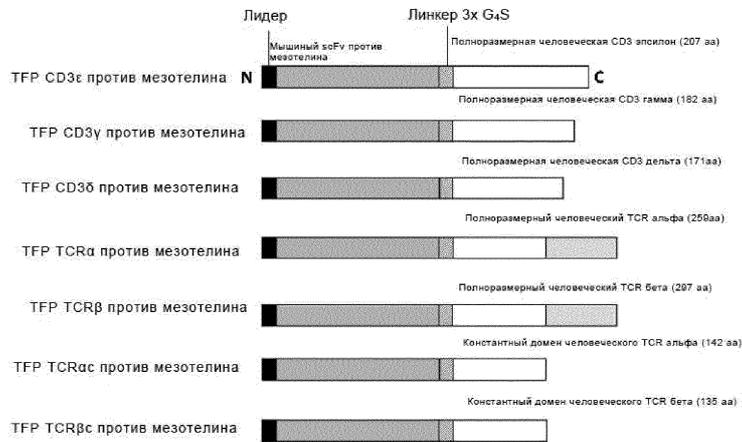
Фиг. 1



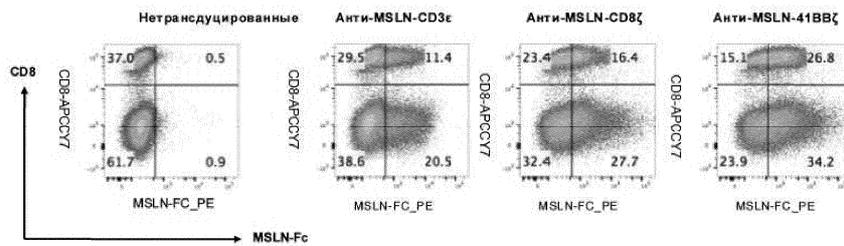
Фиг. 2



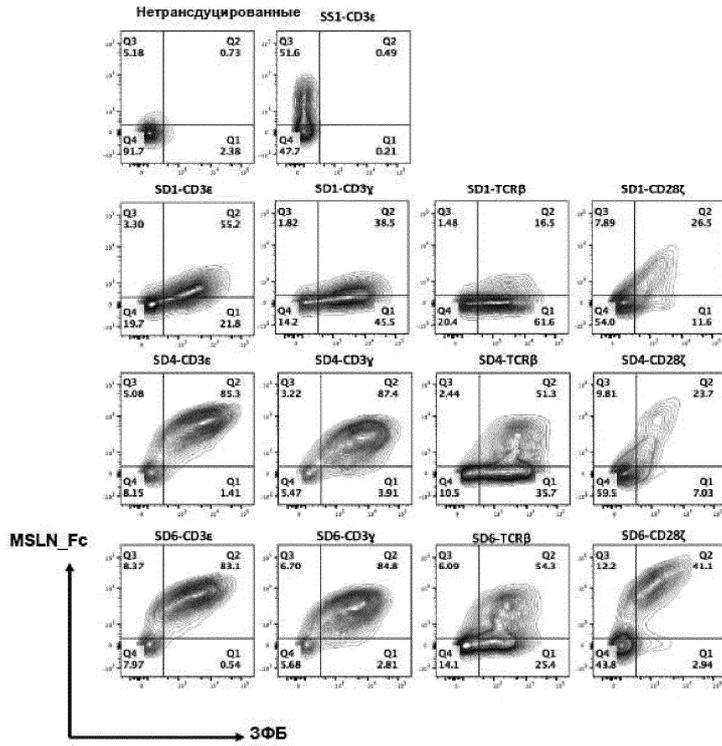
Фиг. 3



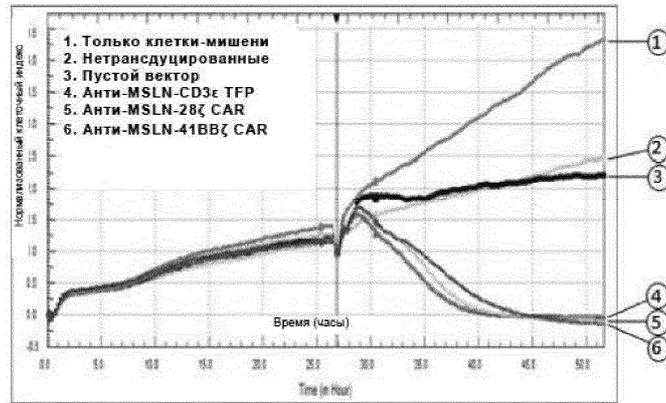
Фиг. 4



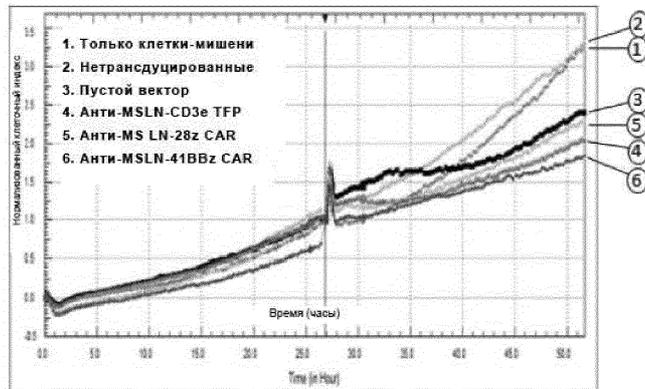
Фиг. 5A



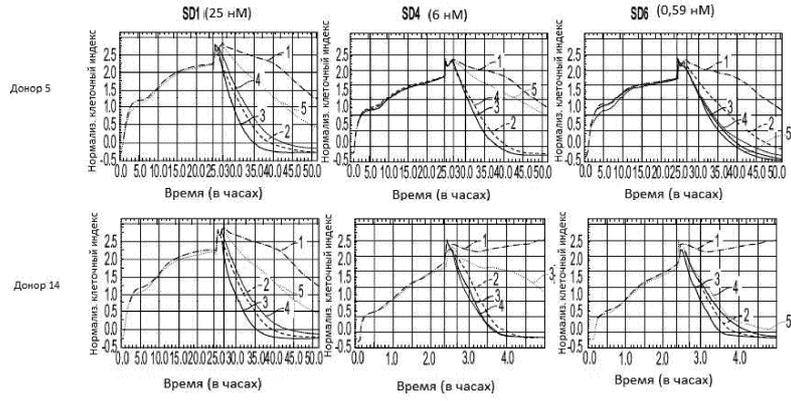
Фиг. 5B



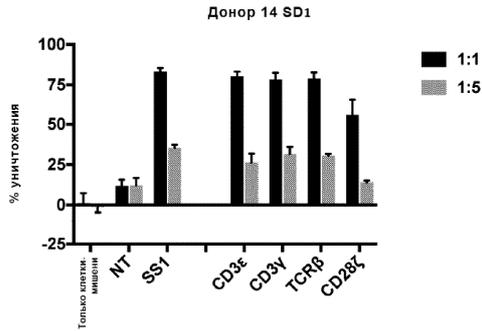
Фиг. 6A



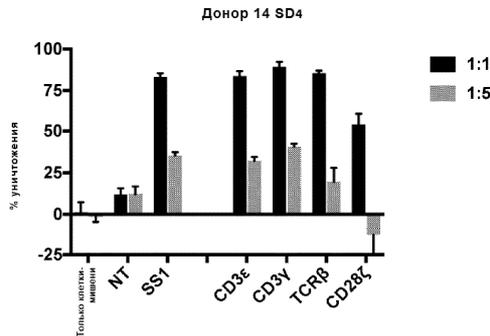
Фиг. 6B



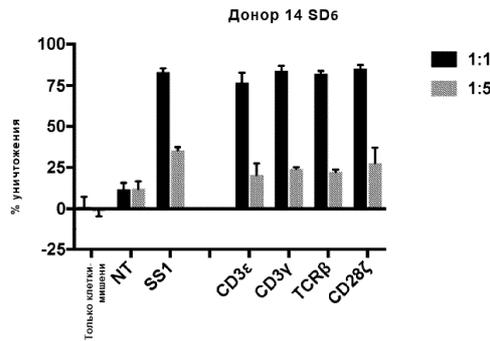
Фиг. 6С



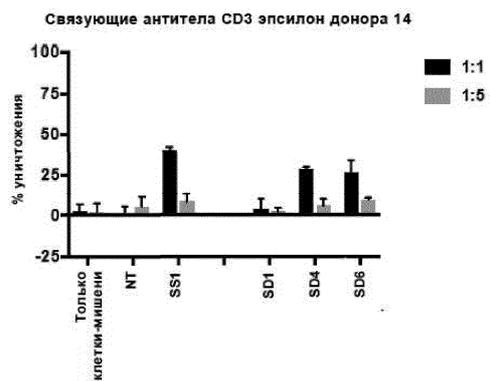
Фиг. 7А



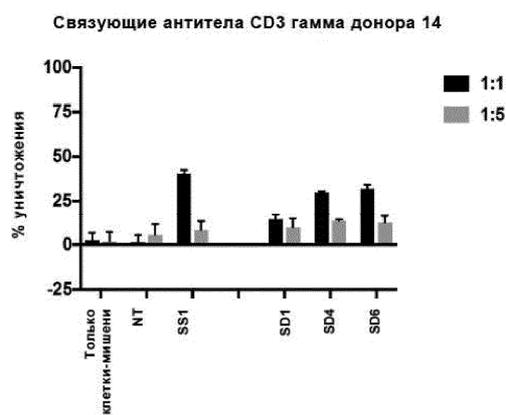
Фиг. 7В



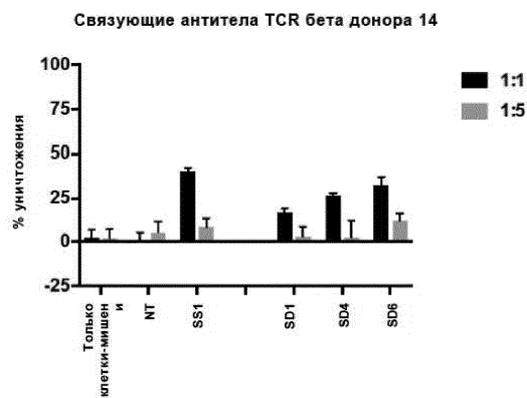
Фиг. 7С



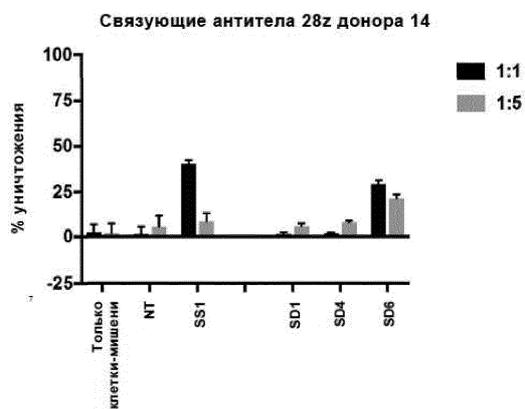
Фиг. 8А



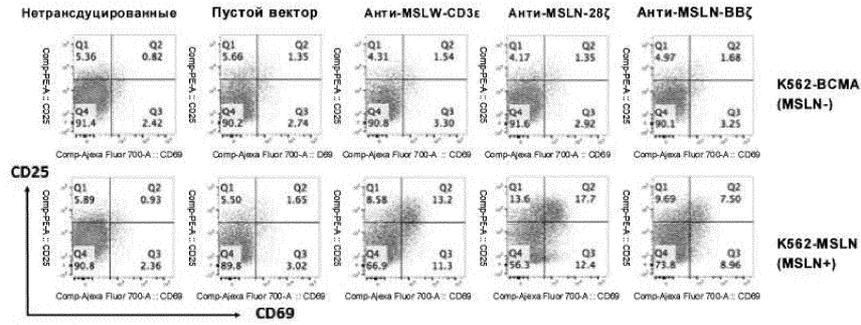
Фиг. 8В



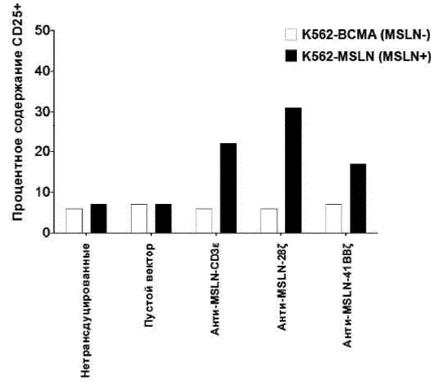
Фиг. 8С



Фиг. 8D



Фиг. 9А



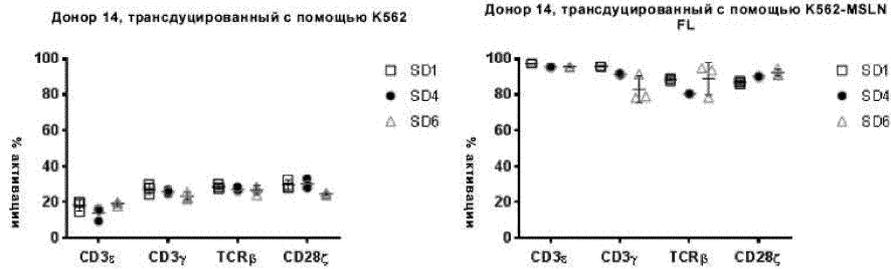
Фиг. 9В

% активации: сумма CD25+, CD69+ и CD25+CD69+ клеток

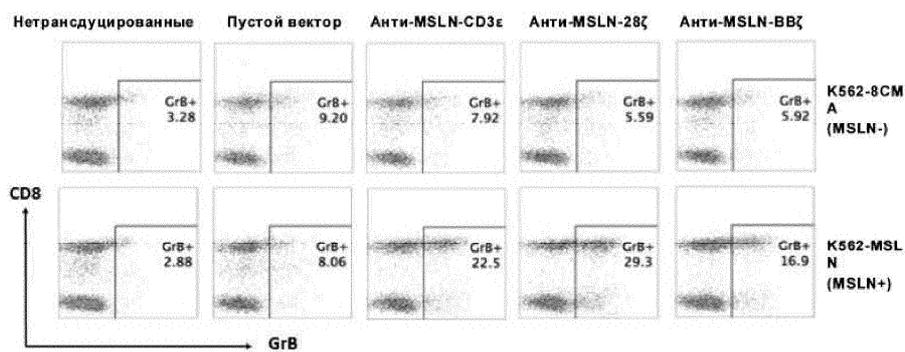


Фиг. 9С

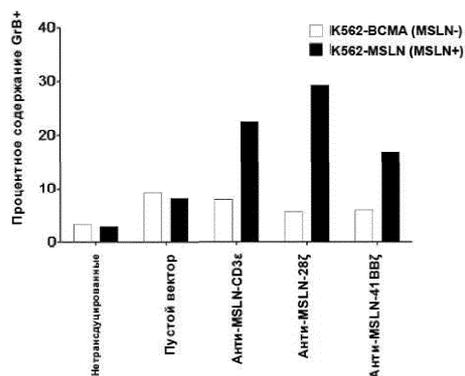
% активации: сумма CD25+, CD69+ и CD25+CD69+ клеток



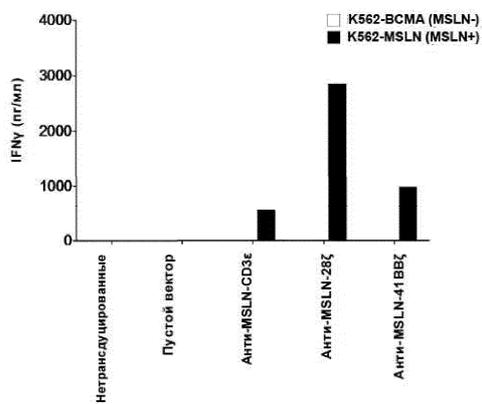
Фиг. 9D



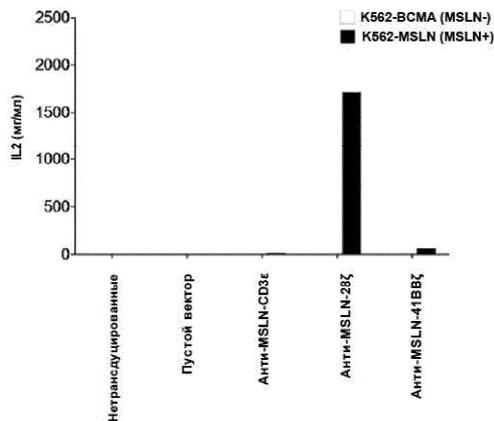
Фиг. 10А



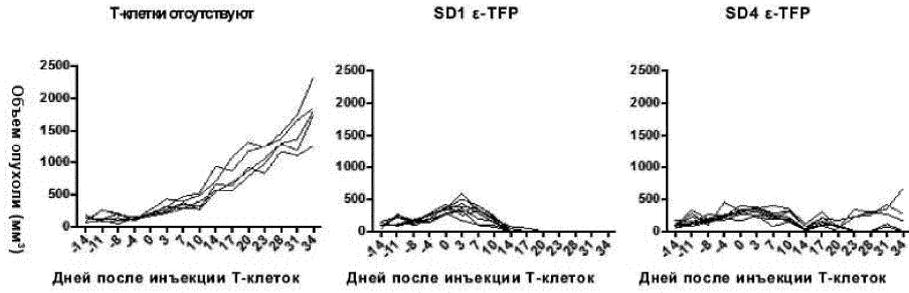
Фиг. 10В



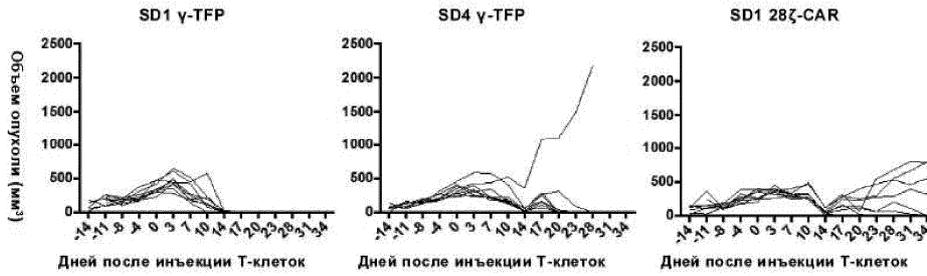
Фиг. 11А



Фиг. 11В



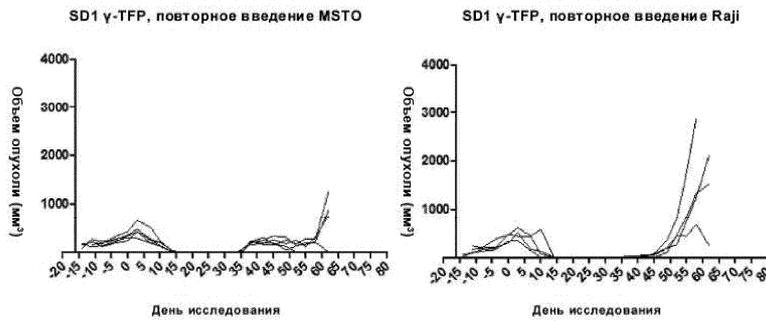
Фиг. 12А



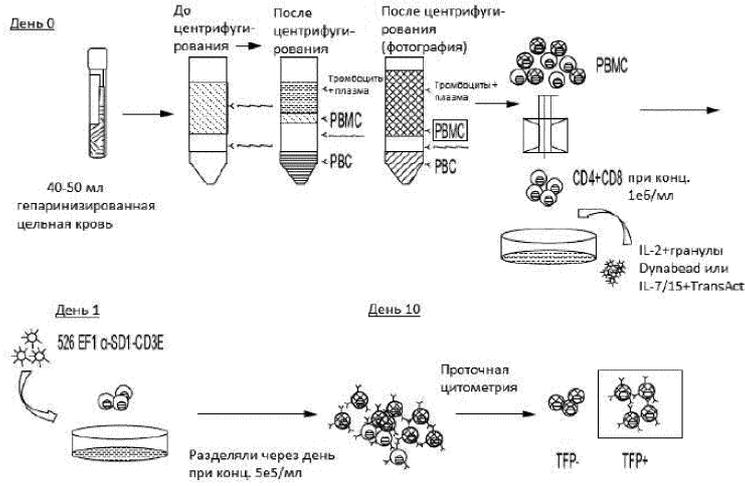
Фиг. 12В



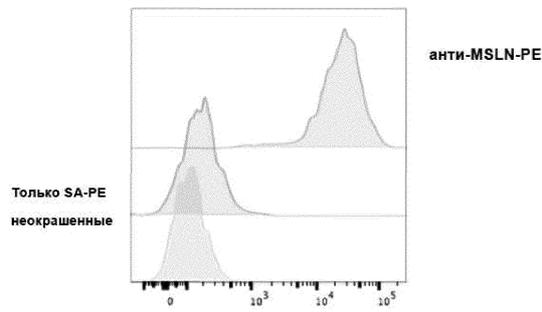
Фиг. 12С



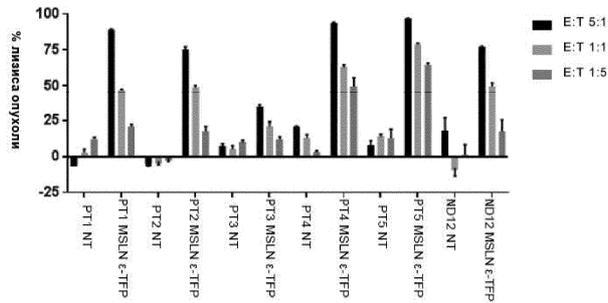
Фиг. 12D



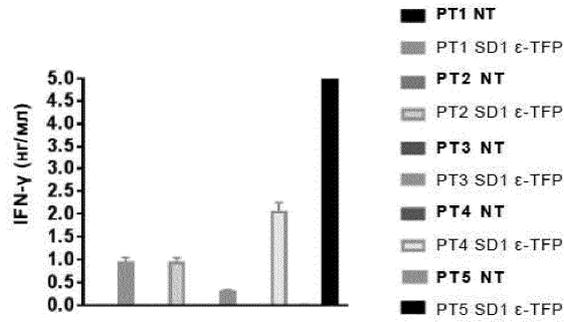
Фиг. 13А



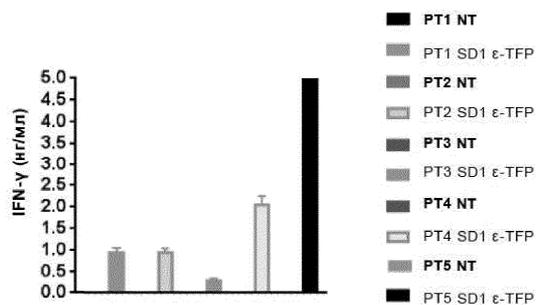
Фиг. 13В



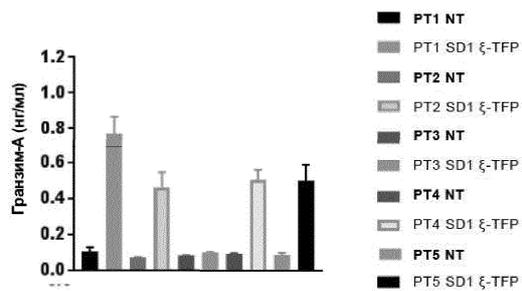
Фиг. 13С



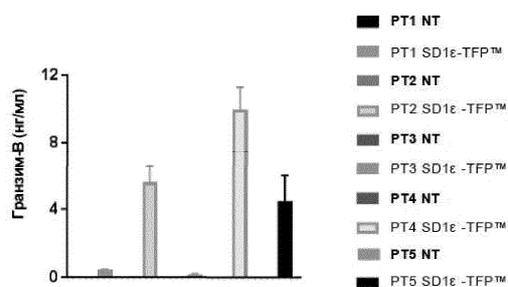
Фиг. 13D



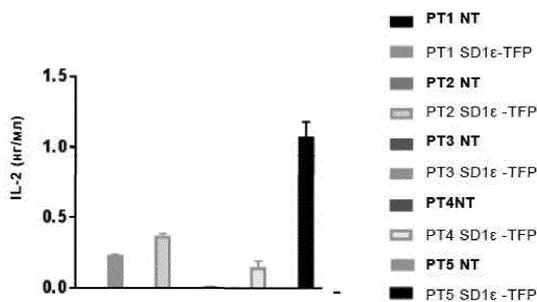
Фиг. 13Е



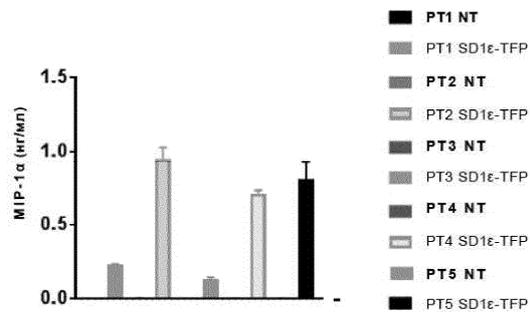
Фиг. 13F



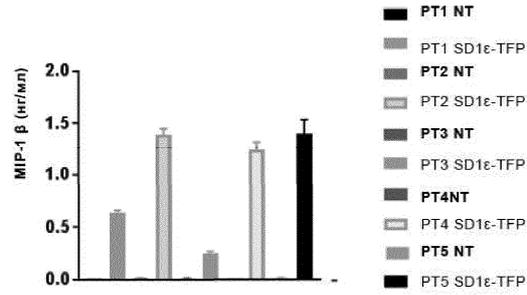
Фиг. 13G



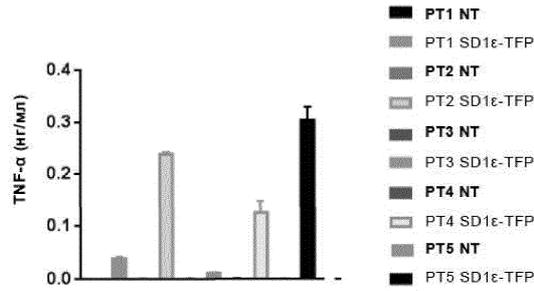
Фиг. 13H



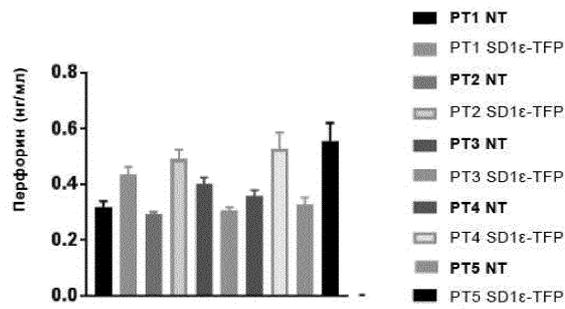
Фиг. 13I



Фиг. 13J

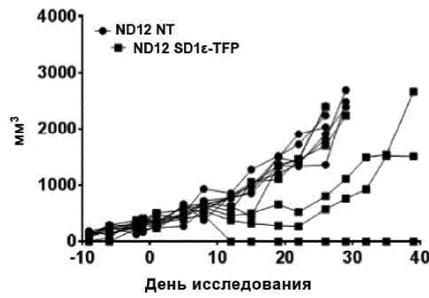


Фиг. 13K



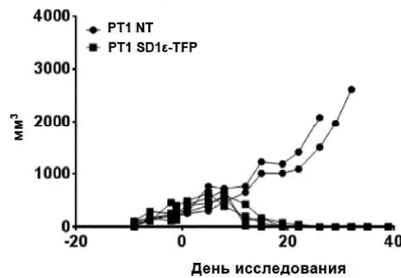
Фиг. 13L

Нормальный донор



Фиг. 14А

Пациент 1



Фиг. 14В

