

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391367** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2023.10.26

(22) Дата подачи заявки  
2021.11.04

(51) Int. Cl. *A61K 31/7088* (2006.01)  
*A61K 35/15* (2015.01)  
*A61K 38/17* (2006.01)  
*A61K 38/19* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)

**(54) КОМПОЗИЦИИ СКОНСТРУИРОВАННЫХ ХИМЕРНЫХ СЛИТЫХ БЕЛКОВ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 63/109,445; 63/162,205; 63/196,994;  
63/251,400

(32) 2020.11.04; 2021.03.17; 2021.06.04;  
2021.10.01

(33) US

(86) PCT/US2021/058104

(87) WO 2022/098905 2022.05.12

(88) 2022.06.09

(71) Заявитель:

**МАЙЭЛОИД ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.  
(US)**

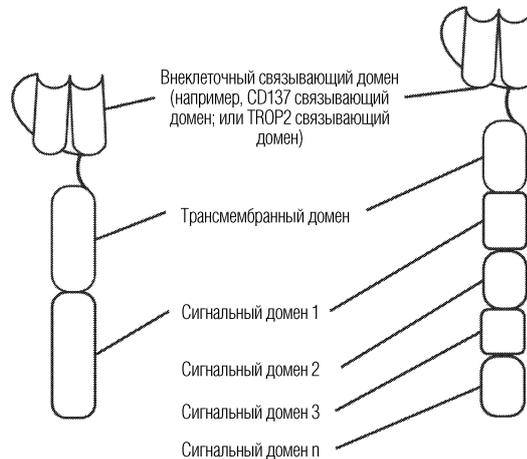
(72) Изобретатель:

**Геттс Дэниэл, Ван Юйсяо, Маккриди  
Брюс, мл. (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Композиции и способы получения и использования сконструированных клеток, таких как сконструированные миелоидные клетки, которые экспрессируют химерный слитый белок, который имеет связывающий домен, способный связывать поверхностные молекулы на клетках-мишенях, таких как больные клетки.



**202391367  
A1**

**202391367  
A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 578176EA/23

### КОМПОЗИЦИИ СКОНСТРУИРОВАННЫХ ХИМЕРНЫХ СЛИТЫХ БЕЛКОВ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 63/109,445, поданной 4 ноября 2020 г.; предварительной заявки США № 63/251,400, поданной 1 октября 2021 г.; предварительной заявки США № 63/196,994, поданной 4 июня 2021 г.; и предварительной заявки США № 63/162,205, поданной 17 марта 2021 г.; каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Клеточная иммунотерапия является многообещающей новой технологией для борьбы с трудноизлечимыми заболеваниями, такими как рак и персистирующие инфекции, и также с некоторыми заболеваниями, которые трудно поддаются другим формам лечения. Крупный прорыв произошел с открытием CAR-T-клеток и их потенциальным использованием в иммунотерапии. CAR-T-клетки представляют собой Т-лимфоциты, экспрессирующие химерный антигенный рецептор, который помогает таргетировать Т-клетки на определенные больные клетки, такие как раковые клетки, и может вызывать цитотоксические реакции, направленные на уничтожение раковых клеток-мишеней, или иммунодепрессию и/или толерантность в зависимости от используемого внутриклеточного домена и совместно экспрессируемых иммунодепрессивных цитокинов. Тем не менее, несколько ограничений на этом пути замедлили прогресс в области CAR-T-клеток и ослабили его надежды в клинических испытаниях.

[0003] Понимание ограничений CAR-T-клеток является ключом к использованию технологии и продолжению инноваций в направлении улучшения моделей иммунотерапии. В частности, при Т-клеточных злокачественных новообразованиях, CAR-T-клетки, по-видимому, столкнулись с серьезной проблемой. CAR-T-клетки и злокачественные Т-клетки имеют общий поверхностный антиген в большинстве Т-клеточных лимфом (TCL), поэтому CAR-T-клетки подвержены цитотоксичности так же, как и раковые клетки. В некоторых случаях, продукты CAR-T могут быть загрязнены злокачественными Т-клетками. Кроме того, аплазия Т-клеток является потенциальной проблемой из-за длительного персистирования CAR-T-клеток. Другие ограничения включают плохую способность CAR-T-клеток проникать в солидные опухоли и мощное микроокружение опухоли, которое подавляет их противоопухолевый потенциал. На функцию CAR-T-клеток также негативно влияет иммунодепрессивное микроокружение опухоли (TME), которое приводит к инактивации и истощению эндогенных Т-клеток.

[0004] Миелоидные клетки, включая макрофаги, представляют собой клетки, происходящие из миелоидной линии, и принадлежат врожденной иммунной системе. Они

происходят из стволовых клеток костного мозга, которые попадают в кровь и могут мигрировать в ткани. Некоторые из их основных функций включают фагоцитоз, активацию Т-клеточных ответов и удаление клеточного дебриса и внеклеточного матрикса. Они также играют важную роль в поддержании гомеостаза, иницировании и разрешении воспаления. Более того, миелоидные клетки могут дифференцироваться в многочисленные последующие клетки, включая макрофаги, которые могут демонстрировать различные ответы от провоспалительных до противовоспалительных в зависимости от типа стимулов, которые они получают из окружающей микросреды. Кроме того, было показано, что тканевые макрофаги играют широкую регулируемую и активирующую роль в отношении других типов иммунных клеток, включая CD11b эффекторных клеток, NK-клетки и Т-регуляторные клетки. Было показано, что макрофаги являются основным иммунным инфильтратом в злокачественных опухолях и оказывают широкое иммунодепрессивное влияние на эффекторную иммунную инфильтрацию и функцию.

[0005] Миелоидные клетки представляют собой основной клеточный компартмент иммунной системы, состоящий из моноцитов, дендритных клеток, тканевых макрофагов и гранулоцитов. Модели клеточного онтогенеза, активации, дифференциации и тканеспецифических функций миелоидных клеток были пересмотрены в последние годы с неожиданными результатами. Однако их огромная пластичность и гетерогенность, как во время гомеостаза, так и во время болезни, далеки от понимания. Хотя миелоидные клетки имеют много функций, включая фагоцитоз и их способность активировать Т-клетки, продуцирование растворимых факторов, использование этих функций для терапевтических целей остается труднодостижимым. Поэтому ищутся новые возможности для использования других типов клеток для разработки улучшенных терапевтических агентов, включая, но не ограничиваясь ими, Т-клеточные злокачественные новообразования.

[0006] Миелоидные клетки, сконструированные *in vivo* или *ex vivo*, также могут быть короткоживущими *in vivo*, фенотипически разнообразными, чувствительными, пластичными, и часто оказывается, что с ними трудно манипулировать *in vitro*. Например, экспрессия экзогенных генов в моноцитах затруднена по сравнению с экспрессией экзогенных генов в не гемопоэтических клетках. Существуют значительные технические трудности, связанные с трансфекцией миелоидных клеток (например, моноцитов/макрофагов). В качестве профессиональных фагоцитов, миелоидные клетки, такие как моноциты/макрофаги, содержат множество эффективных деструктивных ферментов, которые могут нарушать целостность нуклеиновых кислот и делать перенос генов в эти клетки неэффективным процессом. Это особенно верно для активированных макрофагов, физиология которых претерпевает резкие изменения после воздействия иммунных или воспалительных стимулов. Вирусная трансдукция этих клеток затруднена, потому что макрофаги являются клетками конечной стадии, которые обычно не делятся; следовательно, некоторые из векторов, которые зависят от интеграции в репликативный

геном, имели ограниченный успех. Кроме того, макрофаги очень чувствительны к «сигналам опасности», и поэтому некоторые из исходных вирусных векторов, которые использовались для переноса генов, индуцировали мощные противовирусные ответы в этих клетках, что делало эти векторы непригодными для доставки генов.

### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0007] Разнообразная функциональность миелоидных клеток делает их идеальными кандидатами для клеточной терапии, которые могут быть сконструированы таким образом, чтобы оказывать многочисленные терапевтические эффекты. Настоящее описание относится к иммунотерапии с использованием миелоидных клеток (например, CD14+ клеток) иммунной системы, в частности, фагоцитарных клеток. Ряд терапевтических показаний может быть рассмотрен с использованием миелоидных клеток. Например, иммунотерапия миелоидными клетками может иметь чрезвычайно важное значение при раке, аутоиммунитете, фиброзных заболеваниях и инфекциях. Настоящее описание относится к иммунотерапии с использованием миелоидных клеток, включая фагоцитарные клетки иммунной системы, в частности макрофаги. Объектом описанного в настоящем документе изобретения является использование одной или нескольких из этих функций миелоидных клеток для терапевтического применения. Например, объектом описанного в настоящем документе изобретения является использование фагоцитарной активности миелоидных клеток, включая сконструированные миелоидные клетки, для терапевтического применения. Например, объектом описанного в настоящем документе изобретения является использование способности миелоидных клеток, включая сконструированные миелоидные клетки, стимулировать активацию Т-клеток. Например, объектом описанного в настоящем документе изобретения является задействование способности миелоидных клеток, включая сконструированные миелоидные клетки, стимулировать секрецию туморицидных молекул. Например, объектом описанного в настоящем документе изобретения является использование способности миелоидных клеток, включая сконструированные миелоидные клетки, стимулировать рекрутирование и транспортировку иммунных клеток и молекул. Настоящее изобретение предлагает инновационные способы и композиции, которые могут успешно трансфицировать или трансдуцировать миелоидную клетку, или иным образом индуцировать генетическую модификацию в миелоидной клетке с целью усиления функционального аспекта миелоидной клетки, кроме того, без ущерба для способности клетки к дифференциации, потенциала созревания и/или ее пластичности. Миелоидная клетка может находиться *in vivo* внутри тела или быть сконструирована *ex vivo*.

[0008] Настоящее описание включает программирование миелоидных клеток *in vivo* или *ex vivo*, создание и использование сконструированных миелоидных клеток (например, CD14+ клеток, таких как макрофаги или другие фагоцитарные клетки, которые могут атаковать и убивать (АТАК) больные клетки прямо и/или косвенно, такие как раковые клетки и инфицированные клетки. Сконструированные миелоидные клетки,

такие как макрофаги и другие фагоцитарные клетки, могут быть получены путем включения последовательностей нуклеиновых кислот (например, мРНК, плазмид, вирусных конструкций), кодирующих химерный слитый белок (CFP), который имеет внеклеточный связывающий домен, специфичный к антигенам, ассоциированным с заболеванием (например, раковым антигенам), в клетки с использованием, например, *ex vivo* с использованием технологии рекомбинантных нуклеиновых кислот, синтетических нуклеиновых кислот, методов редактирования генов (например, CRISPR), трансдукции (например, с использованием вирусных конструкций), электропорации или нуклеофекции, или *in vivo* с использованием технологии доставки мРНК, включая, но не ограничиваясь ими, технологию LNP. Было обнаружено, что миелоидные клетки могут быть сконструированы так, чтобы они обладали широким и разнообразным спектром активности. Например, было обнаружено, что миелоидные клетки можно сконструировать так, чтобы они экспрессировали химерный слитый белок (CFP), содержащий антигенсвязывающий домен, обладающий широким и разнообразным спектром активности. Например, было обнаружено, что миелоидные клетки могут быть сконструированы таким образом, чтобы они обладали повышенной фагоцитарной активностью, так что при связывании CFP с антигеном на клетке-мишени клетка демонстрирует повышенный фагоцитоз клетки-мишени. Также было обнаружено, что миелоидные клетки могут быть сконструированы так, чтобы стимулировать активацию Т-клеток, так что при связывании CFP с антигеном на клетке-мишени клетка способствует активации Т-клеток, таких как Т-клетки в микроокружении опухоли. Миелоидные клетки могут быть сконструированы таким образом, чтобы способствовать секреции туморицидных молекул, так что при связывании CFP с антигеном на клетке-мишени клетка способствует секреции туморицидных молекул из близлежащих клеток. Миелоидные клетки могут быть сконструированы таким образом, чтобы стимулировать рекрутирование и транспортировку иммунных клеток и молекул таким образом, что при связывании CFP с антигеном на клетке-мишени клетка способствует рекрутированию и транспортировке иммунных клеток и молекул в клетку-мишень или микроокружение опухоли.

[0009] Настоящее описание основано на важном открытии, что сконструированные миелоидные клетки преодолевают, по меньшей мере, некоторые из ограничений CAR-T-клеток, в том числе легко рекрутируются в солидные опухоли; имеют короткую, а также конструируемую продолжительность выживания, что снижает риск пролонгированной персистенции, приводящей к аплазии и иммунодефициту; миелоидные клетки не могут быть загрязнены Т-клетками; миелоидные клетки могут избежать взаимного уничтожения по меньшей мере потому, что они не экспрессируют те же антигены, что и злокачественные Т-клетки; и миелоидные клетки обладают множеством противоопухолевых функций, которые можно задействовать. В некоторых отношениях, сконструированные миелоидные клетки могут быть более безопасными инструментами иммунотерапии для таргетирования и уничтожения больных клеток.

[0010] Более того, миелоидные клетки, такие как макрофаги, повсеместно обнаруживаются в опухолевой среде (ТМЕ) и являются наиболее распространенными клетками в некоторых типах опухолей. В рамках своей роли в иммунной системе, миелоидные клетки, такие как макрофаги, естественным образом участвуют в очищении от больных клеток. Настоящее изобретение также относится к использованию функции миелоидных клеток и, в частности, к таргетированию, уничтожению и прямому и/или косвенному удалению больных клеток, а также к доставке полезной нагрузки, такой как антигены и цитокины.

[0011] Настоящее описание также основано на важном открытии, что сконструированные миелоидные клетки могут стимулировать активность эндогенных Т-клеток. Настоящее описание включает, помимо программирования миелоидных клеток. Сконструированные миелоидные клетки могут быть получены путем *in vivo* включения последовательностей нуклеиновых кислот (например, мРНК, плазмид, вирусных конструкций), кодирующих химерный слитый белок (CFP), который имеет внеклеточный связывающий домен, специфичный к антигенам, ассоциированным с заболеванием (например, раковым антигенам), в клетки с использованием, например, *ex vivo* с использованием технологии рекомбинантных нуклеиновых кислот, синтетических нуклеиновых кислот, методов редактирования генов (например, CRISPR), трансдукции (например, с использованием вирусных конструкций), электропорации или нуклеофекции, или *in vivo* с использованием мРНК технологии доставки, включая, помимо прочего, технологию LNP.

[0012] Сконструированные миелоидные клетки также могут быть короткоживущими *in vivo*, фенотипически разнообразными, чувствительными, пластичными, и часто оказывается, что ими трудно манипулировать *in vitro*. Например, экспрессия экзогенных генов в моноцитах затруднена по сравнению с экспрессией экзогенных генов в не гемопоэтических клетках. Существуют значительные технические трудности, связанные с трансфекцией миелоидных клеток (например, моноцитов/макрофагов). Как профессиональные фагоциты, миелоидные клетки, такие как моноциты/макрофаги, содержат множество сильнодействующих ферментов деградации, которые могут нарушать целостность нуклеиновых кислот и делать перенос генов в эти клетки неэффективным процессом. Это особенно верно для активированных макрофагов, физиология которых претерпевает резкие изменения после воздействия иммунных или воспалительных стимулов. Вирусная трансдукция этих клеток затруднена, потому что макрофаги являются клетками конечной стадии, которые обычно не делятся; следовательно, некоторые из векторов, которые зависят от интеграции в репликативный геном, имели ограниченный успех. Кроме того, макрофаги очень чувствительны к «сигналам опасности», и поэтому некоторые из исходных вирусных векторов, которые использовались для переноса генов, индуцировали мощные противовирусные ответы в этих клетках, что делало эти векторы непригодными для доставки генов. Настоящее изобретение предлагает инновационные способы и композиции, которые могут успешно

трансфицировать или трансдуцировать миелоидную клетку или иным образом индуцировать генетическую модификацию в миелоидной клетке с целью усиления функционального аспекта миелоидной клетки, кроме того, без ущерба для способности клетки к дифференциации, потенциала созревания и/или ее пластичности.

[0013] В настоящем документе предложены терапевтические агенты, направленные на связывание с определенными антигенами, которые экспрессируются на пораженной клетке, например, на раковой клетке, и связывание терапевтических агентов (например, таргетных «связывающих агентов») с антигеном-мишенью на таргетных клетках-мишенях инициирует процесс разрушения клетки-мишени. Терапевтический агент, описанный в настоящем документе, может представлять собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, которая может экспрессироваться в подходящей клетке, такой как клетка млекопитающего, такая как клетка человека, где подходящей клеткой может быть миелоидная клетка. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент, описанный в настоящем документе, может представлять собой рекомбинантный белок, который может связываться с антигеном-мишенью на клетке-мишени. В некоторых случаях, терапевтический агент, описанный в настоящем документе, может представлять собой клетку, например, миелоидную клетку, где миелоидная клетка содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе, и/или экспрессирует рекомбинантный белок, описанный в настоящем документе, так что миелоидная клетка может таргетировать больную клетку, экспрессирующую антиген-мишень на поверхности клетки; и миелоидная клетка лизует или фагоцитирует больную клетку.

[0014] В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент представляет собой миелоидную клетку, такую как описана в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка представляет собой миелоидную клетку-предшественник. В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка представляет собой недифференцированную и/или неполяризованную миелоидную клетку. В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка представляет собой фагоцитарную клетку. В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка представляет собой CD14+/CD16- клетку.

[0015] В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент представляет собой рекомбинантную или сконструированную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота представляет собой РНК.

[0016] В некоторых вариантах осуществления, сконструированная нуклеиновая кислота представляет собой мРНК. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент, представляющий собой рекомбинантную или сконструированную нуклеиновую кислоту, кодирует химерный слитый рецепторный белок (CFP).

[0017] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует внеклеточный или растворимый белок, также известный как «рекрутер», который связывается с антигеном-мишенью на больной клетке со связывающим доменом-

мишенью, расположенным, например, на одном конце белка; и способен связываться с эффекторной клеткой, такой как эффекторная миелоидная клетка, например, с активной фагоцитарной клеткой по меньшей мере с другим доменом, который связывается с молекулой на структуре эффекторной клетки, такой как миелоидная клетка. Типовые рекрутеры представляют собой биспецифические рекрутеры (BiME) или триспецифические рекрутеры (TRiME), как описано в настоящем документе.

[0018] В одном аспекте, в настоящем документе описана композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок (CFP), содержащий: (a) субъединицу фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), содержащую: (i) трансмембранный домен, или (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и (b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен CD137, который может специфически связываться с CD137 на клетке-мишени; где внеклеточный и трансмембранный домены функционально связаны.

[0019] В одном аспекте, в настоящем документе описана композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок, содержащий: (a) первый антигенсвязывающий домен CD137, который специфически связывается с антигеном CD137 на клетке-мишени, и (b) второй связывающий домен, который специфически связывается с поверхностным агентом на миелоидной клетке; где связывание первого антигенсвязывающего домена с антигеном CD137 происходит на клетке-мишени и связывание второго связывающего домена с поверхностным агентом происходит на миелоидной клетке.

[0020] В одном аспекте, в настоящем документе описана композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок (CFP), содержащий: (a) субъединицу фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), содержащую: (i) трансмембранный домен, или (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и (b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен Клаудина 18.2, который может специфически связываться с Клаудином 18.2 на клетке-мишени; где внеклеточный и трансмембранный домены функционально связаны.

[0021] В одном аспекте, в настоящем документе описана композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок, содержащий: (a) первый антигенсвязывающий домен Клаудина 18.2, который специфически связывается с антигеном Клаудина 18.2 на клетке-мишени, и (b) второй связывающий домен, который специфически связывается с поверхностным агентом на миелоидной клетке; где связывание первого антигенсвязывающего домена с антигеном Клаудина 18.2 происходит на клетке-мишени и связывание второго связывающего домена с поверхностным агентом происходит на миелоидной клетке.

[0022] В одном аспекте, в настоящем документе описана композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок (CFP),

содержащий: (a) субъединицу фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), содержащую: (i) трансмембранный домен, или (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и (b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен Клаудина 3, который может специфически связываться с Клаудином 3 на клетке-мишени; где внеклеточный и трансмембранный домены функционально связаны.

[0023] В одном аспекте, в настоящем документе описана композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок, содержащий: (a) первый антигенсвязывающий домен Клаудина 3, который специфически связывается с антигеном Клаудина 3 на клетке-мишени, и (b) второй связывающий домен, который специфически связывается с поверхностным агентом на миелоидной клетке; где связывание первого антигенсвязывающего домена с антигеном Клаудина 18.2 происходит на клетке-мишени и связывание второго связывающего домена с поверхностным агентом происходит на миелоидной клетке.

[0024] В одном аспекте, в настоящем документе описана композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок (CFP), содержащий: (a) субъединицу фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), содержащую: (i) трансмембранный домен, или (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и (b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен CD70, который может специфически связываться с CD70 на клетке-мишени; где внеклеточный и трансмембранный домены функционально связаны.

[0025] В одном аспекте, в настоящем документе описана композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок, содержащий: (a) первый антигенсвязывающий домен CD70, который специфически связывается с антигеном CD70 на клетке-мишени, и (b) второй связывающий домен, который специфически связывается с поверхностным агентом на миелоидной клетке; где связывание первого антигенсвязывающего домена с антигеном CD70 происходит на клетке-мишени и связывание второго связывающего домена с поверхностным агентом происходит на миелоидной клетке.

[0026] В одном аспекте, в настоящем документе описана композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок (CFP), содержащий: (a) субъединицу фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), содержащую: (i) трансмембранный домен, или (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и (b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен TROP2, который может специфически связываться с TROP2 на клетке-мишени; где внеклеточный и трансмембранный домены функционально связаны.

[0027] В одном аспекте, в настоящем документе описана композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок, содержащий: (a) первый антигенсвязывающий домен TROP2, который специфически

связывается с антигеном TROP2 на клетке-мишени, и (b) второй связывающий домен, который специфически связывается с поверхностным агентом на миелоидной клетке; где связывание первого антигенсвязывающего домена с антигеном TROP2 происходит на клетке-мишени и связывание второго связывающего домена с поверхностным агентом происходит на миелоидной клетке.

[0028] В одном аспекте, в настоящем документе описана композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок (CFP), содержащий: (a) субъединицу фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), содержащую: (i) трансмембранный домен, или (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и (b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен TMPRSS, который может специфически связываться с TMPRSS на клетке-мишени; где внеклеточный и трансмембранный домены функционально связаны.

[0029] В одном аспекте, в настоящем документе описана композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок, содержащий: (a) первый связывающий домен антигена TMPRSS, который специфически связывается с антигеном TMPRSS на клетке-мишени, и (b) второй связывающий домен, который специфически связывается с поверхностным агентом на миелоидной клетке; где связывание первого антигенсвязывающего домена с антигеном TMPRSS происходит на клетке-мишени и связывание второго связывающего домена с поверхностным агентом происходит на миелоидной клетке.

[0030] В одном аспекте, в настоящем документе описана композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок (PFP) фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), включающую: (a) субъединицу PR, содержащую: (i) трансмембранный домен, и (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и (b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен любого из описанных выше, обладающий сильной аффинностью связывания с антигеном клетки-мишени; где трансмембранный домен и внеклеточный домен функционально связаны; и где при связывании PFP с антигеном клетки-мишени убивающая или фагоцитарная активность клетки, экспрессирующей PFP, увеличивается по меньшей мере более чем на 20% по сравнению с клеткой, не экспрессирующей PFP.

[0031] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен любого из PFP, описанных в настоящем документе, происходит от фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления, или где внутриклеточный сигнальный домен содержит домен активации фагоцитоза.

[0032] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит провоспалительный сигнальный домен.

[0033] В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит домен активации киназы или связывающий домен киназы.

[0034] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит домен рекрутирования киназы PI3.

[0035] В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит домен активации сигнального каскада IL-1.

[0036] В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из TLR3, TLR4, TLR7, TLR 9, TRIF, RIG-1, MYD88, MAL, IRAK1, MDA-5, рецептора IFN, члена семейства NLRP, NLRP1-14, NOD1, NOD2, пирина, AIM2, NLRC4, FCGR3A, FCERIG, CD40, домена каспазы или домена, связывающего прокаспазу, или любую их комбинацию.

[0037] В некоторых вариантах осуществления, любой из PFP, описанных в настоящем документе, дополнительно содержит трансмембранный домен, полученный из TM домена белка CD2, CD8, CD28, CD64 или CD68.

[0038] В некоторых вариантах осуществления, любой из PFP, описанных в настоящем документе, дополнительно содержит шарнирный домен.

[0039] В некоторых вариантах осуществления, при связывании PFP с антигеном клетки-мишени, активность клетки, экспрессирующей PFP, увеличивается по меньшей мере более чем на 20% по сравнению с клеткой, не экспрессирующей PFP.

[0040] В некоторых вариантах осуществления, при связывании PFP с антигеном клетки-мишени, активность клетки, экспрессирующей PFP, увеличивается по меньшей мере в 1,1 раза по сравнению с клеткой, не экспрессирующей PFP.

[0041] В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит первый терапевтический агент, где терапевтический агент содержит: первый связывающий домен, где первый связывающий домен представляет собой первое антитело или его функциональный фрагмент, который специфически взаимодействует с антигеном на клетке-мишени, и второй связывающий домен, где второй связывающий домен представляет собой второе антитело или его функциональный фрагмент, который специфически взаимодействует с миелоидной клеткой; где (i) первый терапевтический агент связан с первым компонентом, где первый компонент представляет собой дополнительный терапевтический агент или третий связывающий домен, или (ii) в некоторых вариантах осуществления, композиция содержит дополнительный терапевтический агент.

[0042] В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент содержит: (a) первый связывающий домен, который специфически взаимодействует с антигеном клетки-мишени, (b) второй связывающий домен, который специфически взаимодействует с миелоидной клеткой, и (c) третий связывающий домен который специфически взаимодействует с миелоидной клеткой.

[0043] В некоторых вариантах осуществления, любой из связывающих доменов терапевтического агента содержит связывающий домен антитела, функциональный фрагмент антитела, его переменный домен,  $V_H$  домен,  $V_L$  домен, VNAR домен,  $V_{HH}$  домен, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), Fab, однодоменное антитело

(sdAb), нанотело, биспецифическое антитело, диатело или функциональный фрагмент или их комбинацию.

[0044] В некоторых вариантах осуществления, антиген на клетке-мишени, с которым связывается первый связывающий домен, представляет собой раковый антиген или патогенный антиген на клетке-мишени или аутоиммунный антиген.

[0045] В некоторых вариантах осуществления, первый терапевтический агент содержит полипептид длиной менее 1000 аминокислот или 1000 нм. В некоторых вариантах осуществления, первый терапевтический агент содержит полипептид длиной менее 500 аминокислот или 500 нм. В некоторых вариантах осуществления, первый терапевтический агент содержит полипептид длиной 200-1000 аминокислот или 200-1000 нм.

[0046] В некоторых вариантах осуществления, взаимодействие связывающих доменов первого терапевтического агента обеспечивает контакт раковой клетки с миелоидной клеткой.

[0047] В некоторых вариантах осуществления, второй связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой и способствует фагоцитарной активности миелоидной клетки.

[0048] В некоторых вариантах осуществления, второй связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой и способствует передаче сигналов воспаления миелоидной клеткой.

[0049] В некоторых вариантах осуществления, второй связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой или молекулой адгезии и способствует адгезии миелоидной клетки к клетке-мишени.

[0050] В некоторых вариантах осуществления, второй связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой и ингибирует анти-фагоцитарную активность миелоидной клетки, опосредованную клеткой-мишенью.

[0051] В некоторых вариантах осуществления, второй связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой и ингибирует противовоспалительную активность миелоидной клетки, опосредованную клеткой-мишенью.

[0052] В некоторых вариантах осуществления, второй и/или третий связывающий домен способствует фагоцитарной активности миелоидной клетки.

[0053] В некоторых вариантах осуществления, второй и/или третий связывающий домен способствует передаче сигналов воспаления миелоидной клеткой.

[0054] В некоторых вариантах осуществления, второй и/или третий связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой или молекулой адгезии и способствует адгезии миелоидной клетки к клетке-мишени.

[0055] В некоторых вариантах осуществления, второй и/или третий связывающий домен ингибирует антифагоцитарную активность миелоидной клетки, опосредованную клеткой-мишенью.

[0056] В некоторых вариантах осуществления, второй и/или третий связывающий домен ингибирует противовоспалительную активность миелоидной клетки, опосредованную клеткой-мишенью.

[0057] В некоторых вариантах осуществления, третий связывающий домен или дополнительный терапевтический агент содержит антагонист CD47, блокатор CD47, антитело, химерный рецептор CD47, сиалидазу, цитокин, провоспалительный ген, прокаспазу или противораковый агент.

[0058] В некоторых вариантах осуществления, третий связывающий домен или дополнительный терапевтический агент содержит антагонист SIRP-альфа, блокатор SIRPA, антитело, химерный рецептор SIRPA, цитокин, провоспалительный ген, прокаспазу или противораковый агент.

[0059] В некоторых вариантах осуществления, третий связывающий домен или дополнительный терапевтический агент содержит антагонист PD1, блокатор PD1, антитело, химерный рецептор PD1, цитокин, провоспалительный ген, прокаспазу или противораковый агент.

[0060] В некоторых вариантах осуществления, второй связывающий домен и третий связывающий домен связываются с разными не идентичными антигенами-мишенями.

[0061] В некоторых вариантах осуществления, первый связывающий домен, второй связывающий домен или третий связывающий домен представляет собой лигандсвязывающий домен.

[0062] В некоторых вариантах осуществления, первый, второй или третий связывающие домены функционально связаны одним или несколькими линкерами.

[0063] В некоторых вариантах осуществления, линкер представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления, линкер представляет собой функциональный пептид. В некоторых вариантах осуществления, линкер представляет собой лиганд для рецептора. В некоторых вариантах осуществления, лиганд для моноцитарного или макрофагального рецептора. В некоторых вариантах осуществления, линкер активирует рецептор. В некоторых вариантах осуществления, линкер ингибирует рецептор.

[0064] В некоторых вариантах осуществления, линкер представляет собой лиганд для рецептора макрофага M2. В некоторых вариантах осуществления, линкер представляет собой лиганд для рецептора TLR, такого как TLR4. В некоторых вариантах осуществления, линкер активирует рецептор TLR. В некоторых вариантах осуществления, первый, второй и/или третий связывающие домены связаны с маской, которая связывается со связывающим доменом.

[0065] В некоторых вариантах осуществления, маска представляет собой ингибитор, который ингибирует взаимодействие связывающего домена с его мишенью, когда маска остается связанной с соответствующим связывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления, маска связана со связывающим доменом через пептидный

линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит расщепляемую группу.

[0066] В некоторых вариантах осуществления, расщепляемый фрагмент расщепляется белком или ферментом, селективно присутствующим в очаге рака или опухоли.

[0067] В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент представляет собой нуклеиновую кислоту, например, сконструированную нуклеиновую кислоту, где нуклеиновая кислота представляет собой РНК.

[0068] В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.

[0069] В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота представляет собой самореплицирующуюся РНК, сконструированную для таргетирования миелоидной клетки.

[0070] В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, то есть сконструированная нуклеиновая кислота, представляет собой кольцевую РНК, созданную для таргетирования миелоидной клетки, созданную для таргетирования миелоидной клетки.

[0071] В некоторых вариантах осуществления, сконструированная рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой РНК, созданную для таргетирования миелоидной клетки.

[0072] В некоторых вариантах осуществления, сконструированная нуклеиновая кислота представляет собой мРНК, созданную для таргетирования миелоидной клетки.

[0073] В некоторых вариантах осуществления, сконструированная нуклеиновая кислота представляет собой самореплицирующуюся РНК, созданную для таргетирования миелоидной клетки.

[0074] В некоторых вариантах осуществления, сконструированная нуклеиновая кислота представляет собой кольцевую РНК, созданную для таргетирования миелоидной клетки.

[0075] В некоторых вариантах осуществления, сконструированная рекомбинантная нуклеиновая кислота ассоциирована с одним или несколькими липидами.

[0076] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота инкапсулирована в липосому.

[0077] В некоторых вариантах осуществления, липосома представляет собой наночастицу.

[0078] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота содержится в векторе.

[0079] В настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая любую из рекомбинантных нуклеиновых кислот композиций по вариантам осуществления, описанным выше, и приемлемый эксципиент.

[0080] В настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой,

кодирующей любой из рекомбинантных белков, описанных выше.

[0081] В настоящем документе предложена клетка, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую любой из рекомбинантных белков, описанных выше.

[0082] В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой миелоидную клетку.

[0083] В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой CD14+, CD16-.

[0084] В настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток, содержащих рекомбинантную нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления, описанных выше, где по меньшей мере 50% клеток представляют собой CD14+CD16-.

[0085] В некоторых вариантах осуществления, менее 10% клеток фармацевтической композиции представляют собой дендритные клетки.

[0086] В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция дополнительно включает подходящий эксципиент.

[0087] В настоящем документе предложен способ изготовления любой из композиций любого из вариантов осуществления, описанных выше.

[0088] В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления, описанных выше.

[0089] В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления, описанных выше.

[0090] В некоторых вариантах осуществления, рак выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака яичников, рака почек, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака печени, рака головного мозга, лимфомы, лейкоза, рака кожи, рака поджелудочной железы, колоректального рака, глиобластомы и рака легких.

[0091] В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ изготовления любой из композиций, описанных в настоящем документе.

[0092] В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе.

[0093] В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе.

[0094] В некоторых вариантах осуществления, рак выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака яичников, рака почек, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака печени, рака головного мозга, лимфомы, лейкоза, рака кожи, рака поджелудочной железы, колоректального рака, глиобластомы и рака легких.

[0095] В одном аспекте, в настоящем документе предложена композиция,

содержащая рекомбинантную полинуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP), где CFP содержит: (a) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, и (b) трансмембранный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом; где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен из белка, который димеризуется с эндогенными рецепторами FcR-гамма в миелоидных клетках; где рекомбинантная полинуклеиновая кислота инкапсулирована средством доставки наночастиц; и где после введения композиции субъекту-человеку CFP экспрессируется на поверхности миелоидных клеток субъекта-человека.

[0096] В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен содержит Fab-фрагмент, домен scFv или домен sdAb. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен из CD8, CD16a, CD64, CD68 или CD89.

[0097] В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен дополнительно содержит шарнирный домен, полученный из CD8, где шарнирный домен функционально связан с трансмембранным доменом и антигенсвязывающим доменом.

[0098] В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен из белка, который димеризуется с эндогенными FcR-гамма-рецепторами в миелоидных клетках, моноцитах или макрофагах; где после введения фармацевтической композиции субъекту-человеку, CFP специфически экспрессируется в миелоидных клетках, моноцитах или макрофагах субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен из CD16a, CD64, CD68 или CD89. В некоторых вариантах осуществления, CFP дополнительно содержит внутриклеточный домен, где внутриклеточный домен содержит один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов, и где один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов содержат внутриклеточный сигнальный домен из FcγR, FcαR, FcεR, CD40 или CD3дзета. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов дополнительно содержат домен рекрутирования фосфоинозитид-3-киназы (PI3K). В некоторых вариантах осуществления, домен рекрутирования PI3K содержит последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит внутриклеточный домен из CD16a, CD64, CD68 или CD89.

[0099] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен CFP, описанный в настоящем документе, содержит домен иммунорецепторного тирозинового активирующего мотива (ITAM). В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен CFP, описанный в настоящем документе, содержит более одного домена ITAM. В некоторых вариантах осуществления, домен ITAM происходит из внутриклеточного домена белка или полипептида, выбранного из группы: субъединица TCR CD3 дзета, субъединица TCR CD3-эпсилон, субъединица TCR CD3-гамма, субъединица TCR CD3-

дельта, дзета-цепь TCR, цепь Fc-эпсилон рецептора 1, цепь Fc-эпсилон рецептора 2, цепь Fc-гамма рецептора 1, цепь Fc-гамма рецептора 2a, цепь Fc-гамма рецептора 2b 1, цепь Fc-гамма рецептора 2b2, цепь Fc-гамма рецептора 3a, цепь Fc-гамма рецептора 3b, цепь Fc-бета рецептора 1, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, их функциональные фрагменты и их аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

[00100] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один домен ITAM содержит сайт фосфорилирования киназ семейства Src.

[00101] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один домен ITAM содержит домен рекрутинга Syk.

[00102] Композиция по любому из пп. 107-110, где внутриклеточная сигнальная субъединица дополнительно содержит домен рекрутирования DAP12.

[00103] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 доменов ITAM.

[00104] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная полинуклеиновая кислота представляет собой мРНК. В некоторых вариантах осуществления, мРНК доставляется в клетку с помощью носителя для доставки в виде наночастиц. В некоторых вариантах осуществления, средство доставки наночастиц содержит липидную наночастицу. В некоторых вариантах осуществления, липидная наночастица содержит полярный липид. В некоторых вариантах осуществления, липидная наночастица содержит неполярный липид. В некоторых вариантах осуществления, липидная наночастица имеет диаметр от 100 до 300 нм. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из TROP2, GPC3, CD5, HER2, CD137, CD70, Клаудина 3, Клаудина 18.2, TMPRSS, CD19, CD22, CD7 и GP75.

[00105] В настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая композицию, как описано выше, и фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция содержит эффективное количество композиции, как описано в настоящем документе, для ингибирования роста рака при введении человеку с раком.

[00106] В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе.

[00107] В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ введения композиции, описанной в настоящем документе, в миелоидную клетку, включающий: электропорацию миелоидной клетки в присутствии рекомбинантной полинуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP), где CFP содержит: (a) внеклеточный домен, содержащий анти-TROP2 связывающий домен, и (b) трансмембранный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом; где рекомбинантная полинуклеиновая кислота (i) присутствует в миелоидной

клетке или (ii) инкапсулирована средством доставки наночастиц; где рекомбинантная полинуклеиновая кислота сконфигурирована для экспрессии рекомбинантной полинуклеиновой кислоты в миелоидной клетке человека.

[00108] В одном аспекте, в настоящем документе предложена композиция, содержащая рекомбинантную полинуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP), где CFP содержит: (a) внеклеточный домен, содержащий анти-TROP2 связывающий домен, содержащий по меньшей мере одну из последовательностей, представленных SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 35, или последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35; (b) трансмембранный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом, содержащий последовательность из трансмембранного домена молекулы Fc $\gamma$ R1 (CD64), молекулы Fc $\gamma$ R3A (CD16) или молекулы Fc $\alpha$ R1 (CD89); и (c) необязательно, шарнирный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом и трансмембранным доменом, где шарнирный домен содержит аминокислотную последовательность из CD8 $\alpha$  шарнирного домена.

[00109] В некоторых вариантах осуществления, композиция дополнительно содержит внутриклеточный домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 26, 27 или 28; или последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 26, 27 или 28. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная полинуклеиновая кислота представляет собой мРНК.

[00110] В настоящем документе предложена клетка, содержащая рекомбинантную полинуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую химерный слитый белок с внеклеточным доменом, содержащим анти-TROP2 связывающий домен, где клетка представляет собой клетку CD14<sup>+</sup>.

[00111] В настоящем документе предложено применение любой из композиций, описанных в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, или клетки, описанной в настоящем документе, для лечения заболевания или нарушения.

[00112] В настоящем документе предложено применение фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, для лечения рака у субъекта, где рак выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака яичников, рака почки, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака печени, рака мозга, лимфомы, лейкоза, рака кожи, рака поджелудочной железы, колоректального рака, глиобластомы и рака легких.

[00113] В настоящем документе предложено применение любой композиции, описанной в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, или клетки, описанной в настоящем документе, для изготовления лекарственного средства для лечения рака у субъекта, где рак выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака яичников, рака почки, рака молочной железы, рака

предстательной железы, рака печени, рака мозга, лимфомы, лейкоза, рака кожи, рака поджелудочной железы, колоректального рака, глиобластомы и рака легких.

[00114] Также в настоящем документе предложена композиция, содержащая одну или несколько последовательностей рекомбинантных нуклеиновых кислот, содержащих: (A) первую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую экзогенный полипептид; (B) вторую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую слитый белок химерного антигенного рецептора (CFP), где CFP содержит: (a) внутриклеточную сигнальную субъединицу, содержащую внутриклеточный сигнальный домен, имеющий один или несколько тирозиновых остатков, которые фосфорилируются при связывании антигена с помощью рецептора; (b) трансмембранный домен, (c) внеклеточный связывающий домен, обладающий специфичностью связывания в отношении компонента на поверхности клетки-мишени, где внеклеточный связывающий домен функционально связан с трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной субъединицей; и (d) домен активатора транскрипции, функционально связанный с внутриклеточной сигнальной субъединицей через последовательность расщепления протеазой, где домен активатора транскрипции способствует транскрипции первой последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей экзогенный полипептид; и (C) третью последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую (i) протеазу, которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, которая функционально связывает домен активатора транскрипции с внутриклеточной сигнальной субъединицей; (ii) домен, который связывается с тирозиновыми остатками, которые фосфорилируются при активации CFP; где протеаза, которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, и домен, который связывается с тирозиновыми остатками, функционально связаны.

[00115] В некоторых вариантах осуществления, третья последовательность нуклеиновых кислот дополнительно кодирует (iii) чувствительный к стимулу элемент.

[00116] В некоторых вариантах осуществления, чувствительный к стимулу элемент (iii) слит с доменом, который связывается с фосфорилированными тирозиновыми остатками.

[00117] В некоторых вариантах осуществления, чувствительный к стимулу элемент (iii) отвечает на микроокружение клетки, которая экспрессирует последовательность нуклеиновых кислот.

[00118] В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько рекомбинантных нуклеиновых кислот экспрессируются в миелоидной клетке.

[00119] В некоторых вариантах осуществления, домен активатора транскрипции дополнительно содержит ДНК-связывающий домен.

[00120] В некоторых вариантах осуществления, ДНК-связывающий домен выбран из ДНК-связывающего домена (DB) Gal4, ZFHD1 или tet-R.

[00121] В некоторых вариантах осуществления, домен активатора транскрипции содержит домен трансактивации VP64.

[00122] В некоторых вариантах осуществления, протеаза, которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, которая функционально связывает домен активатора транскрипции с внутриклеточной сигнальной субъединицей, представляет собой протеазу NS3 вируса гепатита С (HCV).

[00123] В некоторых вариантах осуществления, домен, который связывается с тирозиновыми остатками, которые фосфорилируются при активации CFP, представляет собой связывающий домен фосфотирозина (PTB).

[00124] В некоторых вариантах осуществления, PTB представляет собой Shc PTB.

[00125] В некоторых вариантах осуществления, (iii) представляет собой дегрон, функционально связанный с (ii).

[00126] В некоторых вариантах осуществления, дегрон представляет собой дегрон NIF-1a.

[00127] В настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая композицию, указанную в параграфах [0114] - [00126], и фармацевтически приемлемый эксципиент. В настоящем документе предложена клетка, содержащая композицию, указанную в параграфах [0114]-[00126]. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой CD14+. В настоящем документе предложен способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение субъекту любого из: (i) фармацевтической композиции; или (ii) клетки, указанной в параграфе [0127].

#### **ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ**

[00128] Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в этом описании, включены в настоящее описание посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были конкретно и индивидуально указаны для включения в качестве ссылки.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

[00129] Новые признаки изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание особенностей и преимуществ настоящего изобретения можно получить, обратившись к следующему подробному описанию, в котором представлены иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы изобретения, и прилагаемым чертежам.

[00130] На **ФИГ. 1** изображена схема, показывающая два типовых CFP, CFP слева, содержащий внеклеточный связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, и CFP справа, содержащий внеклеточный связывающий домен, трансмембранный домен, первый внутриклеточный сигнальный домен, второй внутриклеточный сигнальный домен, третий внутриклеточный сигнальный домен и один или несколько дополнительных внутриклеточных сигнальных доменов. Сигнальные домены могут быть получены из других рецепторов и могут быть сконструированы так, чтобы вызывать любое количество клеточных функций. Типовой связывающий домен представляет собой связывающий домен CD137. Типовой связывающий домен представляет собой связывающий домен TROP2.

[00131] На **ФИГ. 2А** схематично показан типовой димер CFP, содержащий анти-CD137 внеклеточный связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий внутриклеточный домен, полученный из FcR $\gamma$ , слитого с доменом рекрутирования P13K.

[00132] На **ФИГ. 2В** схематически показан типовой димер CFP, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен анти-CD137, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий домен фагоцитоза, домен рекрутирования P13K и провоспалительный домен.

[00133] На **ФИГ. 3** представлена схема, изображающая типовой гомодимер CFP, в котором каждая субъединица содержит внеклеточный домен, слитый с scFv, который связывается с одной мишенью (слева), и типовой гетеродимер CFP, в котором первая субъединица гетеродимера содержит внеклеточный домен, слитый с scFv, который связывается с первой мишенью, и где вторая субъединица гетеродимерной субъединицы содержит внеклеточный домен, слитый с scFv, который связывается со второй мишенью (справа).

[00134] На **ФИГ. 4А** представлена схема типовой рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей CFP, содержащую сигнальный пептид, слитый с антигенспецифическим scFv, который слит с внеклеточным доменом (ECD), трансмембранным доменом (TMD) и внутриклеточным доменом (ICD) фагоцитарного рецептора с сигнальными доменами 1, 2 и 3. Кроме того, типовой рекомбинантной нуклеиновой кислотой является мРНК с 5'- и 3'UTR.

[00135] На **ФИГ. 4В** показаны данные о том, что при доставке вирусного гена (левая панель) некоторые типы клеток демонстрируют плохую трансдукцию и клеточную дифференциацию, что может негативно повлиять на потенциальный эффект терапевтической функции клеток и продолжительность жизни; доставка, опосредованная плазмидами (вверху справа), может индуцировать дифференциацию и гибель клеток; тогда как доставка мРНК безопасна и вызывает почти незначительный иммунный ответ в клетке после доставки (внизу справа).

[00136] На **ФИГ. 5** представлены типовые данные, изображающие ожидаемые результаты относительного фагоцитоза в первичных миелоидных клетках человека, трансдуцированных пустым вектором (контроль) или вектором, кодирующим CFP, совместно культивируемых с микроносителями, покрытыми антигеном, как показано на графической диаграмме вверху. Фагоцитоз количественно определяют с помощью проточной цитометрии.

[00137] На **ФИГ. 6А** представлены типовые данные, изображающие ожидаемые результаты относительного фагоцитоза в первичных миелоидных клетках человека, трансдуцированных пустым вектором (контроль) или вектором, кодирующим CFP, совместно культивируемых с антигенэкспрессирующими клетками-мишенями, мечеными флуоресцентным красителем, как показано на графической диаграмме сверху. Фагоцитоз количественно определяют с помощью проточной цитометрии. Влияние

соотношений миелоидных клеток к мишеням показано, как ожидалось.

[00138] На **ФИГ. 6В** представлены данные, демонстрирующие специфичность CFP-связывающих доменов (связывающих), клетки, экспрессирующие CD19-связывающую CFP конструкцию (CD19-АТАК), демонстрируют высокий фагоцитоз только в присутствии CD19+-мишеней, и не в присутствии CD22+-мишеней, не несущих CD19 на поверхности, и наоборот.

[00139] На **ФИГ. 6С** представлены данные, показывающие успешный хемотаксис и локализацию миелоидных клеток, экспрессирующих флуоресцентные конструкции CFP, в опухоли (визуализация, левая панель); график справа показывает хемотаксис *in vitro* в присутствии различных концентраций CCL2.

[00140] На **ФИГ. 7А** показан типовой график анализа проточной цитометрии, изображающий первичные клетки моноцитов человека, экспрессирующие анти-CD5 CFP, которые инкубируют в различных условиях поляризации (показаны на верхней панели), например, в присутствии только MCSF (условия M0); или дополнительно с IL-10, IL-4 и TGF $\beta$  (условия M2) или в присутствии IFN и LPS в течение 24 часов, и затем инкубируют с клетками Т-клеточной лимфомы Н9, результаты показывают, что экспрессия CFP не изменяет способность клетки быть поляризованной в этих условиях. Кроме того, совместная инкубация с опухолевыми клетками не изменяет поляризацию. Кроме того, те же самые условия культивирования используют для тестирования и демонстрации того, что первичные клетки моноцитов человека, экспрессирующие анти-CD5 CFP, обладают мощным фагоцитозом опухолевых клеток и активностью уничтожения в среде M2 (не показано). Тот же самый подход можно использовать для *in vitro* тестирования эффективности любого из связывающих, описанных в настоящем документе, в среде, стимулирующей M1 или M2.

[00141] На **ФИГ. 7В** представлена схема, показывающая типовую экспериментальную блок-схему лечения эксперимента на модели животных с периферической Т-клеточной лимфомой. Мышам подкожно вводят  $1 \times 10^6$  клеток опухолевой линии CD5-HU9 синдрома Сезари. Лечение указанными количествами первичных моноцитов человека, экспрессирующих анти-CD5 CFP, начинают на 11 день после инъекции клеток опухолевой линии. Всего проводят 5 инфузий, по одной инфузии каждые 3 дня. Такой же подход можно использовать для *in vitro* проверки эффективности любого из связывающих, описанных в настоящем документе, на подходящей экспериментальной модели опухоли *in vivo*.

[00142] На **ФИГ. 7С** представлен график относительного размера опухоли (излучения) в указанные моменты времени в соответствии со схемой эксперимента, описанной на **ФИГ. 7В**.

[00143] На **ФИГ. 8** представлены примерные модульные конструкции CFP для моноцит-специфичной экспрессии (ECD=внеклеточный домен; Н=шарнир; TMD=трансмембранный домен; ICD=внутриклеточный домен).

[00144] На **ФИГ. 9** представлен типовой рабочий процесс для экспрессии и

функционального анализа типовых конструкций CFP, включая анти-GPC3 конструкции CFP и анти-TROP2 конструкции CFP с доменом анти-GPC3 или анти-TROP2 антитела, внеклеточным доменом FLAG, трансмембранными (ТМ) доменами CD16 человека или CD89 человека и внутриклеточными (цито) доменами CD16 человека или CD89 человека. Как показано, 200 мкг/мл РНК, кодирующей конструкции, могут быть подвергнуты электропорации (EP) в PBMC и могут быть проанализированы экспрессия, уничтожение опухолевых клеток-мишеней и продуцирование цитокинов/хемокинов.

[00145] На **ФИГ. 10А** представлены данные проточной цитометрии, анализирующие экспрессию указанных анти-TROP2 конструкций CFP в различных типах клеток. Как показано на нижней панели, экспрессия указанных анти-TROP2 конструкций CFP наблюдается в CD14+ миелоидных клетках, но не в CD19+ В-клетках, CD3+ Т-клетках или CD56+ NK-клетках.

[00146] На **ФИГ. 10В** представлены данные проточной цитометрии, анализирующие экспрессию указанных анти-GPC3 CFP-конструкций в различных типах клеток. Как показано на нижней панели, экспрессия указанных анти-GPC3 конструкций CFP наблюдается в CD14+ миелоидных клетках, но не в CD19+В-клетках, CD3+ Т-клетках или CD56+ NK-клетках.

[00147] На **ФИГ. 11А** представлены данные анализа люциферазы для измерения уничтожения клеток SKOV3 с помощью PBMC, трансфицированных указанными анти-TROP2 конструкциями CFP. PBMC, трансфицированные указанными анти-TROP2 конструкциями CFP, совместно культивируют с клетками SKOV3-Luc при соотношении эффекторных клеток:клеток-мишеней 5:1 в течение 3 дней. PBMC, трансфицированные указанными анти-TROP2 конструкциями CFP, демонстрируют специфическое уничтожение клеток SKOV3 по сравнению с контролями.

[00148] На **ФИГ. 11В** представлены данные анализа экспрессии, опухолеспецифического фагоцитоза и продуцирования противоопухолевых цитокинов с использованием миелоидных клеток, контактировавших с LNP, содержащим мРНК, кодирующую указанную анти-TROP2 конструкция CFP. На левой панели представлены данные проточной цитометрии, анализирующей экспрессию указанной анти-TROP2 конструкции CFP в различных типах клеток, контактировавших с LNP, содержащим мРНК, кодирующую указанную анти-TROP2 конструкцию CFP. Экспрессию указанных анти-TROP2 конструкций CFP наблюдают в миелоидных клетках CD14+, но не в CD19+В-клетках, CD3+ Т-клетках или CD56+ NK-клетках. На средней панели представлен график данных анализа люциферазы для измерения уничтожения клеток SKOV3 с помощью PBMC, контактировавших с LNP, содержащим мРНК, кодирующую указанную анти-TROP2 конструкцию CFP. PBMC, контактировавшие с LNP, содержащим мРНК, кодирующую указанную анти-TROP2 конструкцию CFP, и совместно культивированные с клетками SKOV3-Luc, демонстрируют специфическое уничтожение клеток SKOV3 по сравнению с контролем. На правой панели изображен график продуцирования образцов TNF-альфа из средней панели.

[00149] На **ФИГ. 12А** представлены данные о продуцировании цитокинов с использованием миелоидных клеток, контактировавших с LNP, содержащим мРНК, кодирующую указанные анти-TROP2 конструкции CFP. Показаны графики продуцирования IL-1beta и IL-18 из образцов, в которых PBMC, контактировавшие с LNP, содержащим мРНК, кодирующую указанную анти-TROP2 конструкцию CFP, культивировали отдельно или совместно с клетками SKOV3.

[00150] На **ФИГ. 12В** представлены данные о продуцировании цитокинов с использованием миелоидных клеток, контактировавших с LNP, содержащим мРНК, кодирующую указанные анти-TROP2 конструкции CFP. Показаны графики продуцирования CCL2 и TNF-альфа из образцов, в которых PBMC, контактировавшие с LNP, содержащим мРНК, кодирующую указанную анти-TROP2 конструкцию CFP, культивируют отдельно или совместно с клетками SKOV3.

[00151] На **ФИГ. 12С** представлена схема успешного использования CD89 (альфа-цепь FcR) для управления специфического для миелоидных клеток программирования *in vivo*. мРНК, кодирующую CFP с scFv, присоединенным к CD89, включают в LNP и вводят мышам. Показан график доли миелоидных клеток и лимфоцитов, экспрессирующих CFP. Экспрессия CFP наблюдается в миелоидных CD14<sup>+</sup> клетках, но не в лимфоцитах по сравнению с контролем.

[00152] На **ФИГ. 13А** представлены типовые схемы различных конфигураций VH и VL доменов для двух типовых анти-TROP2 конструкций CFP с scFv.

[00153] На **ФИГ. 13В** представлены иллюстративные данные проточной цитометрии, показывающие эффекты различных конфигураций VH и VL доменов для двух иллюстративных анти-TROP2 конструкций CFP с scFv, показанных на **ФИГ. 13А** при экспрессии в клетках THP-1, подвергнутых электропорации с РНК, кодирующей указанные конструкции CFP.

[00154] На **ФИГ. 13С** представлены типовые графики, показывающие фагоцитоз клеток SKOV3 клетками THP-1, экспрессирующими указанные конструкции, указанные на оси X, количественно оцененные по увеличению сигнала pHrhodo Red при указанных соотношениях эффектор:клетка-мишень (E:T).

[00155] На **ФИГ. 13D** представлены типовые данные проточной цитометрии, показывающие экспрессию указанных анти-TROP2 конструкций CFP с указанными комбинациями трансмембранных и внутриклеточных доменов. Имитация трансфекции и набор, трансфицированный анти-HER2 конструкцией CFP, служат в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно.

[00156] На **ФИГ. 13Е** представлены типовые данные, демонстрирующие экспрессию указанных анти-HER2 (справа) и анти-TROP2 (слева) конструкций CFP с указанными комбинациями трансмембранных и внутриклеточных доменов.

[00157] На **ФИГ. 14А** схематично представлены типовые анти-GP75 ( $\alpha$ GP75) конструкции CFP. Типовая конструкция анти-GP75-FLAG-hCD8-Fcg-PI3K (рецептор АТАК 1 поколения) показана сверху. Каждая из других изображенных анти-GP75

конструкций CFP содержит последовательности, кодирующие указанные домены, и последовательность, кодирующую GFP, отделенную от последовательности, кодирующей внутриклеточный домен, последовательностью, кодирующей пептид T2A. На графике слева показана мультимеризация трансмембранного домена CD16 или трансмембранного домена CD89 анти-GP75 конструкций CFP с эндогенными белками рецептора Fcγ и связывание анти-GP75 конструкций CFP с антигеном GP75 на опухолевой клетке.

[00158] На **ФИГ. 14В** представлен пример стратегии гейтирования методом проточной цитометрии, используемой для анализа экспрессии указанной конструкции CFP в различных типах клеток легкого мыши *in vivo* после инъекции LNP, содержащих РНК, кодирующую указанную конструкцию CFP, мышам.

[00159] На **ФИГ. 14С** представлены графики экспрессии конструкции CFP, измеренной долей клеток, положительных в отношении флуоресценции GFP, или экспрессии flag, измеренной иммуноанализом в указанных типах клеток легкого мыши *in vivo* после однократной или двукратной инъекции LNP, содержащих РНК, кодирующую конструкцию CFP, мышам, и анализ проточной цитометрии в соответствии со стратегией гейтирования, изображенной на **ФИГ. 14В**. Экспрессию наблюдают в миелоидных клетках легких, но не в лимфоцитах или CD45-клетках.

[00160] На **ФИГ. 14D** представлен пример стратегии гейтирования методом проточной цитометрии, используемой для анализа экспрессии указанной конструкции CFP в различных типах клеток печени мыши *in vivo* после инъекции мышам LNP, содержащих РНК, кодирующую указанную конструкцию CFP.

[00161] На **ФИГ. 14Е** представлены графики экспрессии конструкции CFP, измеренной долей клеток, положительных в отношении флуоресценции GFP, или экспрессии flag, измеренной иммуноанализом в указанных типах клеток печени мыши *in vivo* после однократной или двукратной инъекции LNP, содержащих РНК, кодирующую конструкцию CFP, мышам и анализ проточной цитометрии в соответствии со стратегией гейтирования, изображенной на **ФИГ. 14D**. Экспрессию наблюдают в миелоидных клетках печени.

[00162] На **ФИГ. 14F** представлены типовые данные проточной цитометрии, показывающие экспрессию указанных анти-GP75 конструкций CFP в моноцитах мыши, контактировавших *in vitro* с LNP, содержащим мРНК, кодирующую конструкции CFP.

[00163] На **ФИГ. 15А** представлен типовой анализ *in vitro* для измерения фагоцитоза клеток B16, меченных pHrhodoRed, миелоидными клетками, экспрессирующими анти-GP75 конструкции CFP. Миелоидные клетки подвергают контакту (например, электропорируют) с LNP, содержащими мРНК, кодирующую конструкцию CFP. Приведенные данные проточной цитометрии показывают, что CD11b-положительные моноциты фагоцитируют клетки B16, меченные pHrhodoRed.

[00164] На **ФИГ. 15В** представлены иллюстративные данные с использованием моноцитов, экспрессирующих указанные анти-GP75 конструкции CFP, после электропорации с LNP, содержащими мРНК, кодирующую конструкцию CFP, с

использованием анализа, описанного на **ФИГ. 15А**. Показан график индекса фагоцитоза и данных проточной цитометрии. Конструкция MYL157= $\alpha$ GP75-FLAG-мышь CD16 TMD-мышь CD16 ICD-T2A-GFP (также обозначена как GP75-CD16a). Конструкция MYL158= $\alpha$ GP75-FLAG-мышь CD89 TMD-мышь CD89 ICD-T2A-GFP (также обозначена как GP75-CD89).

[00165] На **ФИГ. 15С** представлены иллюстративные данные с использованием моноцитов, экспрессирующих указанные анти-GP75 конструкции CFP, после электропорации с LNP, содержащими РНК, кодирующую конструкцию CFP, с использованием анализа, описанного на **ФИГ. 15А**. Конструкции графически представлены на верхней панели. Данные, отражающие индекс фагоцитоза, основанный на анализе проточной цитометрии, показаны на графике. Конструкции, которые включают шарнир CD8, показали немного лучшую экспрессию.

[00166] На **ФИГ. 15D** представлены данные о продуцировании цитокинов миелоидными клетками, подвергнутыми электропорации с LNP, содержащим мРНК, кодирующую указанные анти-GP75 конструкции CFP, с использованием анализа, описанного на **ФИГ. 15А**. Представлены графики продуцирования TNF-альфа, CCL3, CCL4 и CCL7 только из клеток В16 или моноцитов, контактировавших с LNP, содержащим мРНК, кодирующую указанные анти-GP75 конструкции CFP, которые совместно культивируют с клетками В16.

[00167] На **ФИГ. 16** представлена типовая схема получения LNP, содержащих мРНК, кодирующую различные конструкции CFP, для доставки *in vivo*.

[00168] На **ФИГ. 17А** показан типовой график дозирования LNP для установления и мониторинга роста опухоли в модели сингенных мышей В16. Опухолевые клетки инъецируют в 0 день, и формирование опухоли у мыши происходит в течение 10 дней после инъекции. После формирования опухоли, мышам многократно инъецируют состав LNP, содержащий мРНК, кодирующую конструкции CFP, и контролируют размер опухоли.

[00169] На **ФИГ. 17В** представлена типовая схема получения комплекса трансфекции, опосредованного струйным PEI, содержащего мРНК, кодирующую различные конструкции CFP, и доставки комплекса *in vivo* посредством инъекции.

[00170] На **ФИГ. 18А** представлены данные экспрессии указанной конструкции CFP, демонстрирующие положительную экспрессию указанной конструкции CFP в миелоидных клетках легких, печени и селезенки *in vivo* после инъекции в хвостовую вену LNP, содержащих мРНК, кодирующую конструкцию CFP. Экспрессия не наблюдается в не миелоидных типах клеток легких, печени и селезенки.

[00171] На **ФИГ. 18В** представлены графики экспрессии типовой конструкции CFP (графически представленной сверху), измеренной в долях клеток, положительных в отношении флуоресценции GFP или экспрессии FLAG, по данным иммунологического анализа в указанных типах клеток легкого и печени мыши *in vivo* после однократной или двойной инъекции LNP, содержащих РНК, кодирующую конструкцию CFP, мышам и

анализа проточной цитометрией в соответствии со стратегией селекции, изображенной на **ФИГ. 14В** или **ФИГ. 14Д**.

[00172] На **ФИГ. 18С** представлены гистограммы сдвига GFP и FLAG, показывающие четкую экспрессию GFP в моноцитах и нейтрофилах.

[00173] На **ФИГ. 18D** представлены данные проточной цитометрии экспрессии конструкции CFP, измеренные по доле клеток, положительных в отношении флуоресценции GFP, или экспрессии FLAG, по данным иммуноанализа проточной цитометрией в указанных типах клеток легкого и печени мыши *in vivo* после инъекции LNP, содержащих РНК, кодирующую конструкцию CFP, мышам, и анализ проточной цитометрией в соответствии со стратегией гейтирования, изображенной на **ФИГ. 14В** или **ФИГ. 14D**.

[00174] На **ФИГ. 19** представлен гистопатологический анализ опухоли у мышей B16, получавших LNP, содержащие РНК, кодирующую анти-GP75 конструкцию. У 2 из 4 мышей наблюдается полный противоопухолевый ответ, и опухоль не обнаруживается.

[00175] На **ФИГ. 20А** представлены данные о продуцировании цитокинов клетками от наивных мышей или мышинной модели опухоли, обработанной носителем, или миелоидными клетками, экспрессирующими анти-GP75-АТАК конструкцию CFP. Показаны графики продуцировании CCL2 и IL-1альфа у мышей. CCL7, который способствует прогрессированию опухоли, снижается у леченных мышей, тогда как IL-1-альфа, связанный с гибелью опухолевых клеток, увеличивается. АТАК, акроним для таргетирования и уничтожения антигена.

[00176] На **ФИГ. 20В** представлены данные о продуцировании цитокинов клетками мышей, не подвергавшихся лечению, или мышинной модели опухоли, обработанной носителем, или миелоидными клетками, экспрессирующими анти-GP75 конструкцию CFP. Показаны графики продуцировании IL23, эотаксина, CXCL1, IL17a, G-CSF и CXCL5 у мышей, которые указывают на повышенную активацию Т-клеток и миелоидных клеток.

[00177] На **ФИГ. 20С** показано, что моноциты, экспрессирующие CAR, при стимуляции рекрутируют Т-клетки. В анализе *in vitro*, клетки CD5-АТАК индуцируют хемотаксис Т-клеток.

[00178] На **ФИГ. 21** представлены данные о продуцировании цитокинов клетками от наивных мышей или мышинной модели опухоли, обработанной носителем, или миелоидными клетками, экспрессирующими анти-GP75 конструкцию CFP. Показаны данные проточной цитометрии по продуцированию IFN-гамма, TNF-альфа и IL-2 из клеток, выделенных из соответствующих мышей. Также показаны графики доли CD4+ Т-клеток, продуцирующих IFN гамма, TNF-альфа и продуцирования IL-2.

[00179] На **ФИГ. 22** представлен график зависимости объема опухоли от времени у мышей, получавших LNP, содержащий мРНК, кодирующую указанную анти-GP75 конструкцию CFP, в указанные моменты времени (показаны стрелками под осью X). По 5 мышей из каждой группы умерщвляют на 9 день после лечения. Забирают органы для

проточного анализа: опухоль, легкое, печень и селезенку. Образцы РНК из образцов опухоли сохраняют для анализа экспрессии гена NanoString. Также проводят анализ повторной стимуляции АТ-клеток с помощью пептида Ova.

[00180] На **ФИГ. 23** показано, что лечение LNP изменяет инфильтрацию опухоли иммунными клетками. Представлены графики доли указанных типов клеток среди всех CD45+ иммунных клеток в микроокружении опухоли мышей, получавших LNP, содержащую мРНК, кодирующую указанную анти-GP75 конструкцию CFP. Лечение приводит к явному увеличению воспалительных моноцитов в опухоли и небольшому увеличению макрофагов и Т-клеток.

[00181] На **ФИГ. 24** показано, что обработка LNP приводит к значительному увеличению числа цитотоксических CD8 Т-клеток и снижению числа Treg клеток. Представлены графики доли указанных типов клеток среди всех иммунных CD45+ клеток мышей, обработанных LNP, содержащим мРНК, кодирующую указанную анти-GP75 конструкцию CFP. Лечение увеличивает присутствие цитотоксических CD8+ Т-клеток при одновременном снижении иммунодепрессивных Treg.

[00182] На **ФИГ. 25** показано, что лечение LNP приводит к снижению экспрессии CD8 Т-клеток иммунной контрольной точки. Представлены графики уровня экспрессии указанных молекул иммунных контрольных точек CD8+ Т-клетками из микроокружения опухоли мышей, леченных LNP, содержащим мРНК, кодирующую указанную анти-GP75 конструкцию CFP. Лечение приводит к снижению уровня экспрессии PD1 и незначительному увеличению экспрессии LAG3.

[00183] На **ФИГ. 26** показано превращение микроокружения опухоли в воспалительный фенотип при *in vivo* введении нуклеиновой кислоты, кодирующей CFP, в композиции LNP.

[00184] На **ФИГ. 27** показано, что обработка LNP приводит к снижению экспрессии Ki-67 и перфорина в CD8+ Т-клетках. Представлены графики уровня экспрессии указанных молекул CD8+ Т-клетками из микроокружения опухоли мышей, обработанных LNP, содержащей мРНК, кодирующую указанную конструкцию анти-GP75 CFP.

[00185] На **ФИГ. 28** показаны данные проточной цитометрии, показывающие экспрессию конструкции CFP в клетках THP-1, подвергнутых электропорации с мРНК, кодирующей CFP.

[00186] На **ФИГ. 29** показана схема, демонстрирующая получение анти-GP75 мыши (Tgp-1) CFP АТАК клеток. Анти-GP75 CFP эффективно экспрессируется в моноцитах мыши посредством электропорации мРНК, кодирующей анти-GP75 CFP, и клетки, экспрессирующие анти-GP75 CFP, обладают фагоцитарной активностью.

[00187] На **ФИГ. 30** показаны данные, демонстрирующие, что моноциты анти-GP75 АТАК подавляют опухоли в сингенной мышинной модели B16. Данные представляют собой график объема опухоли в мышинной модели опухоли, резистентной к CAR-T и ингибиторам контрольных точек, с течением времени после обработки

моноцитами мыши, экспрессирующими анти-GP75 CFP. Мышам вводят 8 инфузий  $2 \times 10^6$  клеток к носителю. Инфузии ежедневно  $\times 4$ , 3 дня отдыха, ежедневно  $\times 4$  +/- CO (критерий Манна-Уитни).

[00188] На **ФИГ. 31** показаны графики, демонстрирующие, что после инфузии мышинной модели опухоли, моноциты мыши, экспрессирующие анти-GP75 CFP, проникают в опухоли, поддерживают экспрессию CFP и дифференцируются в эффекторные клетки, такие как воспалительные клетки, дендритные клетки и макрофаги. Левый график показывает, что примерно ~40% моноцитов мыши, экспрессирующих анти-GP75 CFP, сохраняют экспрессию CFP через 5 дней после инфузии. Верхний правый график показывает, что клетки АТАК (клетки, экспрессирующие CFP) проникают в опухоль и селезенку и становятся дендритными клетками. Нижний правый график показывает, что клетки АТАК проникают в опухоль и селезенку и становятся клетками-макрофагами.

[00189] На **ФИГ. 32** представлены данные о продуцировании цитокинов клетками от наивных мышей или мышинной модели опухоли, обработанной носителем, или миелоидными клетками, экспрессирующими анти-GP75 конструкцию CFP. Представлены графики продуцировании указанных цитокинов/хемокинов. Ответы на лечение коррелируют с профилем противоопухолевых цитокинов в сыворотке. Анализ включает животных, ответивших на лечение, в группе лечения на момент окончания исследования.

[00190] На **ФИГ. 33** представлены данные, показывающие перекрестную презентацию опухолевого антигена моноцитами мыши, экспрессирующими анти-GP75 CFP. Моноциты мыши, экспрессирующие анти-GP75 CFP, способны фагоцитировать, процессировать и презентировать суррогатный опухолевый неоантиген, в данном случае полученный из белка OVA, Т-клеткам, которые несут родственный TCR для пептида, рестриктированного I классом комплекса гистосовместимости, полученного из OVA (SIINFEKL), и активация Т-клеток определяется образованием IL2 (слева) или интерферона (справа); в то время как моноциты той же мыши, которые не экспрессируют рецептор АТАК, не могут. Это доказывает, что моноциты мыши, экспрессирующие анти-GP75 CFP, могут процессировать и перекрестно презентировать антиген адаптивным иммунным клеткам, таким как CD8 Т-клетки. Конструкция АТАК-GP75 (он же TRP-1 АТАК).

[00191] На **ФИГ. 34** представлены данные, показывающие, что моноциты человека, экспрессирующие CFP, используют врожденный иммунитет и стимулируют адаптивные противоопухолевые иммунные ответы. Данные демонстрируют, что моноциты человека, экспрессирующие CFP, проникают в опухоли, накапливаются в опухолях и распознают опухоли (вверху слева). Данные демонстрируют, что моноциты человека, экспрессирующие CFP, приводят к активации миелоидных клеток, продуцированию цитокинов, продуцированию хемокинов и воспалительной поляризации (графики вверху справа). Данные показывают, что моноциты человека, экспрессирующие CFP, непосредственно убивают опухолевые клетки посредством фагоцитоза (внизу слева),

цитокинов и рецепторов смерти (CD95L). Данные демонстрируют, что моноциты человека, экспрессирующие CFP, демонстрируют долгосрочный контроль над опухолями посредством презентации антигена, распространения эпитопа и вовлечения Т-клеток (нижний правый график), тем самым обеспечивая полную активацию иммунного репертуара.

[00192] На **ФИГ. 35** представлены данные, показывающие, что моноциты человека, экспрессирующие анти-CD5 CFP, проявляют сильную активность в условиях депрессивного микроокружения опухоли (TME) *in vitro*. Моноциты человека, экспрессирующие анти-CD5 CFP, инкубируют в течение ночи в отсутствие или в присутствии родственного антигена в среде, содержащей IL10, IL4 и TGF- $\beta$ . Фагоцитарная активность клеток показана на графике слева вверху. Цитокины/хемокины, как указано, измеряют в культуральном супернатанте.

[00193] На **ФИГ. 36** представлены данные, показывающие, что моноциты человека, экспрессирующие анти-CD5 CFP, ингибируют рост и продлевают выживание в моделях ксенотрансплантатов CD5<sup>+</sup> CTCL, несмотря на отсутствие адаптивной иммунной системы.

[00194] На **ФИГ. 37** представлены данные, показывающие, что инъекция мышам LNP, содержащей РНК, кодирующую анти-GP75 CFP с цепью CD89 (FcRalpha), селективно программирует миелоидные клетки *in vivo*, что приводит к мощной противоопухолевой активности. Наблюдают 75% уменьшение массы опухоли (объем, измерение в мм<sup>3</sup>) в установленной холодной модели опухоли.

[00195] На **ФИГ. 38** представлены данные, показывающие, что инъекция мышам LNP, содержащей РНК, кодирующую анти-GP75 CFP с цепью CD89 (FcRalpha), приводит к экспрессии CFP воспалительными моноцитами в TME. Было обнаружено, что >15% опухолевых миелоидных клеток экспрессируют анти-GP75 CFP.

[00196] На **ФИГ. 39** представлены данные, показывающие, что инъекция мышам LNP, содержащей РНК, кодирующую анти-GP75 CFP с цепью CD89 (FcRalpha), приводит к модификации TME, характеризующейся накоплением воспалительных клеток. Лечение индуцирует опухолевые воспалительные моноциты (слева) и дендритные клетки (справа) *in vivo*, что измерено после смерти леченных животных. Лечение увеличивает иммунные клетки, связанные с соединением врожденного и адаптивного иммунитета.

[00197] На **ФИГ. 40** представлены данные, показывающие, что инъекция мышам LNP, содержащей РНК, кодирующую анти-GP75 CFP с цепью CD89 (FcRalpha), приводит к модификации TME, характеризующейся увеличением CTL и уменьшением Treg. Лечение стимулирует противоопухолевые Т-клетки CD8 и снижает количество Treg, связанных с опухолью.

[00198] На **ФИГ. 41** представлены данные о продуцировании указанных провоспалительных цитокинов сыворотки до и через 24 часа после 2 инъекций и через 72 часа после 4 инъекций мышам LNP, содержащей РНК, кодирующую анти-GP75 CFP с цепью CD89 (FcRalpha).

[00199] На **ФИГ. 42** представлены данные о продуцировании указанных хемокинов в сыворотке до и через 24 часа после 2 инъекций и через 72 часа после 4 инъекций мышам LNP, содержащей РНК, кодирующую анти-GP75 CFP с цепью CD89 (FcRalpha).

[00200] На **ФИГ. 43** показан план эксперимента и рост опухоли. Опухоль инокулируют в 0 день и позволяют расти до 75 мм<sup>3</sup>. LNP-мРНК вводят в дозе 2 мг/кг.

[00201] На **ФИГ. 44** показано исследование субпопуляций и фенотипа Т-клеток в опухоли.

[00202] На **ФИГ. 45** представлены данные о том, что обработка мРНК-LNP индуцирует изменения в частоте подмножества Т-клеток внутри опухоли. Лечение вызывает снижение% Treg в опухоли.

[00203] На **ФИГ. 46А** представлен график, показывающий анализ проточной цитометрией маркера истощения CD8 (PD1) и маркера созревания/эффектора CD8 Т-клеток (CD44)% CD8+ Т-клеток у мышей, которым инъецируют GP75-CD89-LNP.

[00204] На **ФИГ. 46В** представлены данные проточной цитометрии по экспрессии PD1 и CD44 в Т-клетках.

[00205] На **ФИГ. 47А** представлен график, показывающий анализ проточной цитометрией маркера истощения CD8 (TIM3 и TOX)% CD8+ Т-клеток у мышей, которым инъецируют GP75-CD89-LNP.

[00206] На **ФИГ. 47В** представлены данные проточной цитометрии по экспрессии TIM3 и TOX в Т-клетках.

[00207] На **ФИГ. 48А** представлен график, показывающий анализ методом проточной цитометрии маркера клеточной пролиферации Ki67 и маркера активации Т-клеток у мышей Гранзима В, которым инъецируют GP75-CD89-LNP.

[00208] На **ФИГ. 48В** представлены данные проточной цитометрии Ki67 и Гранзима В в клетках CD8Т мышей, которым инъецируют GP75-CD89-LNP.

[00209] На **ФИГ. 49** показаны данные исследования клеточных линий; панель маркеров и флуорофоров показана слева.

[00210] На **ФИГ. 50** представлены данные, указывающие на то, что лечение мРНК/LNP не вызывает значительного сдвига в популяции иммунных клеток.

[00211] На **ФИГ. 51** показаны данные по экспрессии рецептора.

[00212] На **ФИГ. 52** показан точечный график, показывающий экспрессию FLAG (т.е. рецептора) в дендритных клетках.

[00213] На **ФИГ. 53** показан точечный график, показывающий экспрессию FLAG в воспалительных моноцитах Ly6C<sup>hi</sup>.

[00214] На **ФИГ. 54** показан точечный график, показывающий экспрессию FLAG в Ly6C<sup>lo</sup> резидентных миелоидных клетках.

[00215] На **ФИГ. 55** представлены данные, указывающие на то, что лечение мышей значительно повышает уровни CD40 и CD206 в воспалительных моноцитах Ly6C<sup>hi</sup> и CCR2<sup>hi</sup>.

[00216] На **ФИГ. 56** показаны уровни PDL1, CD40, CD86 и CD206 в резидентных

миелоидных клетках Ly6C<sup>lo</sup> и CCR2<sup>lo</sup>. Данные указывают на то, что лечение мышей значительно повышает уровни CD40 и CD206.

[00217] На **ФИГ. 57** показаны уровни PDL1, CD40, CD86 и CD206; результаты показывают, что лечение слегка снижает уровень PDL1 в резидентных макрофагах опухоли.

[00218] На **ФИГ. 58** показано, что лечение значительно увеличивает маркер активации DC, включая МНСII, CD86 и CD40, но также повышает уровень PD-L1 в фенотипе CD103+CD11b дендритных клеток в селезенке.

[00219] На **ФИГ. 59** показано, что лечение значительно увеличивает маркер активации DC, включая МНСII, CD86 и CD40, но также повышает уровень PD-L1 в фенотипе дендритных клеток CD103-CD11b<sup>+</sup> в селезенке.

[00220] На **ФИГ. 60** представлено графическое представление типовой конструкции вектора экспрессии для экспрессии в миелоидной клетке первого вектора, кодирующего химерный рецепторный белок, содержащий расщепляемый протеазой индуцируемый белок-активатор транскрипции гена, который активируется специфически, когда миелоидная клетка находится в контакте с раковой клеткой; и второй вектор, экспрессирующий ген-мишень, индуцируемый активатором транскрипции гена, кодируемым первым вектором.

[00221] На **ФИГ. 61А** показано графическое представление типового химерного белка, полученного путем экспрессии векторов, показанных на **ФИГ. 60**. **ФИГ. 61А** также конкретно демонстрирует, что протеаза, слитая с РТВ-НIF-дегеном, легко расщепляется, поскольку инициируется комплексом дегрона, слитым с РТВ, когда РТВ не связан с остатками фосфотирозина мотива ITAM внутриклеточного домена химерного рецептора.

[00222] На **ФИГ. 61В** представлен ожидаемый механизм действия химерных белков, показанных на **ФИГ. 61А**, что приводит к экспрессии гена-мишени. При связывании НIF-дегронпротеазы с фосфорилированным мотивом ITAM рецептора, протеаза активируется и расщепляет активатор транскрипции GAL-VP64.

[00223] На **ФИГ. 62А** представлена графическая иллюстрация конструкции нуклеиновой кислоты, которая кодирует индуцируемый цитотоксический белок. Конструкция предназначена для экспрессии и секреции миелоидной (например, макрофагальной) клеткой. Конструкция содержит кислотный домен и цитотоксический домен главного основного белка эозинофилов человека. Два домена перемежаются последовательностью, кодирующей пептид распознавания MMP; пептид, распознающий MMP, расщепляется MMP, который в избытке присутствует в микроокружении опухоли. В отсутствие MMP, секретируемый цитотоксический белок сохраняется в неактивной форме за счет связи с кислотным доменом, удерживаемым вместе пептидом, распознающим MMP.

[00224] На **ФИГ. 62В** представлено графическое представление активации белка цитотоксического домена при расщеплении последовательности распознавания MMP с помощью MMP в микроокружении опухоли, что приводит к лизису опухолевой клетки

белком цитотоксического домена.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

[00225] Все термины следует понимать так, как их понимает специалист в данной области техники. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится описание.

[00226] Заголовки разделов, используемые в настоящем документе, предназначены только для организационных целей и не должны толковаться как ограничивающие описываемый объект.

[00227] Хотя различные признаки настоящего описания могут быть описаны в контексте одного варианта осуществления, признаки также могут быть предоставлены по отдельности или в любой подходящей комбинации. И наоборот, хотя настоящее описание может быть описано в настоящем документе в контексте отдельных вариантов осуществления для ясности, описание также может быть реализовано в одном варианте осуществления.

[00228] Ссылка в описании на «некоторые варианты осуществления», «вариант осуществления», «один вариант осуществления» или «другие варианты осуществления» означает, что признак, структура или характеристика, описанные в связи с вариантами осуществления, включены по меньшей мере в некоторые варианты осуществления, но не обязательно во все варианты осуществления настоящего описания.

[00229] Используемые в настоящем описании и пункте(ах) формулы изобретения слова «содержащий» (и любая форма включения, такая как «содержать» и «содержит»), «имеющий» (и любая форма наличия, такая как «иметь» и «имеет»), «включающий» (и любую форму включения, такую как «включает» и «включать») или «содержащий» (и любую форму включения, такую как «содержит» и «содержать») являются включающими или открытыми и не исключают дополнительных, не упомянутых элементов или стадий способа. Предполагается, что любой вариант осуществления, обсуждаемый в настоящем описании, может быть реализован в отношении любого способа или композиции описания, и наоборот. Кроме того, композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для достижения способов по настоящему изобретению.

[00230] Термин «примерно» или «приблизительно», используемый в настоящем документе применительно к измеримому значению, такому как параметр, количество, временная продолжительность и подобные, предназначен для охвата вариаций +/-30% или менее, +/-20% или менее, +/-10% или менее, +/-5% или менее или +/-1% или менее от указанного значения, если такие изменения подходят для выполнения в настоящем описании. Следует понимать, что само значение, на которое указывает модификатор «примерно» или «приблизительно», также конкретно описывается.

[00231] «Агент» может относиться к любой клетке, низкомолекулярному химическому соединению, антители или его фрагменту, молекуле нуклеиновой кислоты или полипептиду.

[00232] «Изменение» или «изменение» может относиться к увеличению или уменьшению. Например, изменение может быть увеличением или уменьшением на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, или на 40%, 50%, 60%, или даже вплоть до 70%, 75%, 80%, 90% или 100%. Например, изменение может быть увеличением или уменьшением в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, или в 40 раз, 50 раз, 60 раз, или даже вплоть до 70 раз, 75 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз.

[00233] «Антигенпрезентирующая клетка» или «АРС», как используется в настоящем документе, включает профессиональные антигенпрезентирующие клетки (например, В-лимфоциты, макрофаги, моноциты, дендритные клетки, клетки Лангерганса), а также другие антигенпрезентирующие клетки (например, кератиноциты, эндотелиальные клетки, астроциты, фибробласты, олигодендроциты, эпителиальные клетки тимуса, эпителиальные клетки щитовидной железы, глиальные клетки (головной мозг), бета-клетки поджелудочной железы и эндотелиальные клетки сосудов). АРС может экспрессировать молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) и может отображать антигены в комплексе с МНС на своей поверхности, которые могут распознаваться Т-клетками и запускать активацию Т-клеток и иммунный ответ. Профессиональные антигенпрезентирующие клетки, особенно дендритные клетки, играют ключевую роль в стимуляции наивных Т-клеток. Не профессиональные антигенпрезентирующие клетки, такие как фибробласты, также могут способствовать этому процессу. АРС также могут перекрестно презентировать пептидные антигены путем процессинга экзогенных антигенов и презентации процессированных антигенов на молекулах МНС класса I. Антигены, которые дают начало белкам, которые распознаются в ассоциации с молекулами МНС класса I, обычно представляют собой белки, которые продуцируются внутри клеток, и эти антигены подвергаются процессингу и связываются с молекулами МНС класса I.

[00234] «Биологический образец» может относиться к любой ткани, клетке, жидкости или другому материалу, полученному из организма.

[00235] Термин «эпитоп» может относиться к любой детерминанте белка, такой как последовательность или структура или аминокислотные остатки, способные связываться с антителом или его связывающим фрагментом, Т-клеточным рецептором и/или антителоподобной молекулой. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. «Т-клеточный эпитоп» может относиться к пептиду или комплексу пептид-МНС, распознаваемому Т-клеточным рецептором.

[00236] Сконструированная клетка, такая как сконструированная миелоидная клетка, может относиться к клетке, которая имеет в клетке по меньшей мере одну экзогенную последовательность нуклеиновых кислот, даже если она временно экспрессируется. Экспрессия экзогенной нуклеиновой кислоты может быть осуществлена различными способами, описанными в другом месте, и включает способы, известные в

данной области техники. Настоящее изобретение относится к получению и использованию сконструированных клеток, например сконструированных миелоидных клеток, таких как сконструированные фагоцитарные клетки. Настоящее изобретение относится, *помимо прочего*, к сконструированной клетке, содержащей экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую, например, химерный слитый белок (СФР).

[00237] Термин «иммунный ответ» включает, но не ограничен ими, опосредуемый Т-клетками, опосредуемый НК-клетками и/или опосредуемый В-клетками иммунный ответ. На эти ответы может влиять модуляция костимуляции Т-клеток и костимуляции НК-клеток. Примеры иммунных ответов включают ответы Т-клеток, например, продуцирование цитокинов и клеточную цитотоксичность. Кроме того, иммунные ответы включают иммунные ответы, на которые косвенно влияет активация НК-клеток, активация В-клеток и/или активация Т-клеток, например, продуцирование антител (гуморальные ответы), и активация чувствительных к цитокинам клеток, например, макрофагов. Иммунные ответы включают адаптивные иммунные ответы. Адаптивная иммунная система может реагировать на чужеродные молекулярные структуры, такие как антигены вторгшегося организма. В отличие от врожденной иммунной системы, адаптивная иммунная система обладает высокой специфичностью к патогену. Адаптивный иммунитет также может обеспечить длительную защиту. Адаптивные иммунные реакции включают гуморальные иммунные реакции и клеточно-опосредованные иммунные реакции. При гуморальных иммунных реакциях антитела, секретируемые В-клетками в телесные жидкости, связываются с антигенами патогенного происхождения, что приводит к элиминации патогена с помощью различных механизмов, например лизиса, опосредованного комплементом. При клеточно-опосредованных иммунных реакциях, активируются Т-клетки, способные разрушать другие клетки. Например, если в клетке присутствуют белки, связанные с заболеванием, они могут быть фрагментированы протеолитически до пептидов внутри клетки. Затем специфические клеточные белки могут присоединяться к антигену или пептиду, образованному таким образом, и транспортировать их на поверхность клетки, где они могут быть презентированы молекулярным защитным механизмом, таким как Т-клетки. Цитотоксические Т-клетки могут распознавать эти антигены и убивать клетки, содержащие эти антигены.

[00238] «Лиганд» может относиться к молекуле, которая способна связываться или образовывать комплекс с другой молекулой, такой как рецептор. Лиганд может включать, но не ограничен ими, белок, гликопротеин, углевод, липопротеин, гормон, жирную кислоту, фосфолипид или любой компонент, который связывается с рецептором. В некоторых вариантах осуществления, рецептор имеет специфический лиганд. В некоторых вариантах осуществления, рецептор может иметь избирательное связывание с лигандом, и в этом случае он может связываться с несколькими лигандами, имеющими по меньшей мере сходство в структурной конфигурации, распределении заряда или любых других физико-химических характеристиках. Лиганд может представлять собой

биомолекулу. Лиганд может представлять собой абиотический материал. Например, лиганд может представлять собой отрицательно заряженную частицу, которая является лигандом для фагоцитарного рецептора MARCO. Например, лигандом может быть  $TiO_2$ , который является лигандом для фагоцитарного рецептора SRA1.

[00239] Термин «главный комплекс гистосовместимости (МНС)», «молекула МНС» или «белок МНС» относится к белку, способному связывать антигенный пептид и презентировать антигенный пептид Т-лимфоцитам. Такие антигенные пептиды могут представлять собой Т-клеточные эпитопы. МНС человека также называют комплексом HLA. Таким образом, термины «лейкоцитарный антиген человека (HLA)», «молекула HLA» или «белок HLA» используются взаимозаменяемо с терминами «главный комплекс гистосовместимости (МНС)», «молекула МНС» и «белок МНС». Белки HLA можно классифицировать как HLA класса I или HLA класса II. Структуры белков двух классов HLA очень похожи; однако у них очень разные функции. Белки HLA класса I присутствуют на поверхности почти всех клеток организма, включая большинство опухолевых клеток. Белки HLA класса I нагружены антигенами, которые обычно происходят из эндогенных белков или патогенов, присутствующих внутри клеток, и затем презентуются наивным или цитотоксическим Т-лимфоцитам (CTL). Белки HLA класса II присутствуют на антигенпрезентирующих клетках (APC), включая, но не ограничиваясь ими, дендритные клетки, В-клетки и макрофаги. В основном они представляют собой пептиды, которые процессируются из внешних источников антигена, например, вне клеток, в хелперные Т-клетки.

[00240] В системе HLA класса II, фагоциты, такие как макрофаги и незрелые дендритные клетки, могут захватывать вещества путем фагоцитоза в фагосомы, хотя В-клетки демонстрируют более общий эндоцитоз в эндосомы, которые сливаются с лизосомами, чьи кислые ферменты расщепляют поглощенный белок на множество различных пептидов. Аутофагия является еще одним источником пептидов HLA класса II. Наиболее изученными генами HLA подкласса II являются: HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA и HLA-DRB1.

[00241] Презентация пептидов молекулами HLA класса II CD4+ хелперным Т-клеткам может привести к иммунным ответам на чужеродные антигены. После активации, CD4+ Т-клетки могут способствовать дифференциации В-клеток и продуцированию антител, и также ответам CD8+ Т-клеток (CTL). CD4+ Т-клетки также могут секретировать цитокины и хемокины, которые активируют и индуцируют дифференциацию других иммунных клеток. Молекулы HLA класса II обычно представляют собой гетеродимеры  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей, которые взаимодействуют с образованием бороздки для связывания пептидов, которая является более открытой, чем бороздки для связывания пептидов класса I.

[00242] Аллели HLA обычно экспрессируются кодоминантным образом. Например, каждый человек несет по 2 аллеля каждого из 3 генов класса I (HLA-A, HLA-B и HLA-C) и, таким образом, может экспрессировать шесть различных типов HLA класса

II. В локусе HLA класса II, каждый человек наследует пару генов HLA-DP (DPA1 и DPB1, которые кодируют  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи), HLA-DQ (DQA1 и DQB1, для  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей), один ген HLA-DR $\alpha$  (DRA1) и один или несколько генов HLA-DR $\beta$  (DRB1 и DRB3, -4 или -5). HLA-DRB1, например, имеет более 400 известных аллелей. Это означает, что один гетерозиготный человек может унаследовать шесть или восемь функционирующих аллелей HLA класса II: по три или более от каждого родителя. Таким образом, гены HLA сильно полиморфны; много разных аллелей существует у разных людей внутри популяции. Гены, кодирующие белки HLA, имеют множество возможных вариаций, что позволяет иммунной системе каждого человека отвечать на широкий спектр чужеродных захватчиков. Некоторые гены HLA имеют сотни идентифицированных версий (аллелей), каждой из которых присвоен определенный номер. В некоторых вариантах осуществления, аллели HLA класса I представляют собой HLA-A\*02:01, HLA-B\*14:02, HLA-A\*23:01, HLA-E\*01:01 (не классические). В некоторых вариантах осуществления, аллели HLA класса II представляют собой HLA-DRB\*01:01, HLA-DRB\*01:02, HLA-DRB\*11:01, HLA-DRB\*15:01 и HLA-DRB\*07:01.

[00243] «Миелоидная клетка» может в широком смысле относиться к клеткам миелоидной линии гемопоэтической клеточной системы и может исключать, например, лимфоцитарную линию. Миелоидные клетки включают, например, клетки линии гранулоцитов и линии моноцитов. Миелоидные клетки дифференцируются из общих предшественников, происходящих из гемопоэтических стволовых клеток костного мозга. Приверженность миелоидным клеточным линиям может регулироваться активацией различных факторов транскрипции, и, соответственно, миелоидные клетки могут быть охарактеризованы как клетки, обладающие уровнем пластичности, который может быть описан как способность к дальнейшей дифференциации в терминальные типы клеток на основе внеклеточных и внутриклеточных стимулов. Миелоидные клетки могут быстро рекрутироваться в местные ткани с помощью различных хемокиновых рецепторов на их поверхности. Миелоидные клетки отвечают на различные цитокины и хемокины.

[00244] Миелоидная клетка, например, может быть клеткой, происходящей в костном мозге из гемопоэтической стволовой клетки под влиянием одного или нескольких цитокинов и хемокинов, таких как G-CSF, GM-CSF, Flt3L, CCL2, VEGF и S100A8/9. В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка представляет собой клетку-предшественник. В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка может быть клеткой, имеющей характеристики общего миелоидного предшественника, или предшественника гранулоцитов, миелобластной клетки или предшественника моноцитарно-дендритных клеток, или их комбинации. Миелоид может включать гранулоцит или моноцит или их клетку-предшественник. Миелоид может включать незрелые гранулоциты, незрелые моноциты, незрелые макрофаги, незрелые нейтрофилы и незрелые дендритные клетки. Миелоид может включать моноцит или премоноцитарную клетку или предшественник моноцита. В некоторых случаях миелоидная клетка, используемая в настоящем документе, может относиться к моноциту, имеющему фенотип

M0, фенотип M1 или фенотип M2. Миелоидные клетки могут включать дендритные клетки (DC), зрелые DC, DC, происходящие из моноцитов, плазмацитоидные DC, пре-дендритные клетки или предшественники DC. Миелоид может включать нейтрофил, который может быть зрелым нейтрофилом, предшественником нейтрофила или полиморфонуклеоцитом (PMN). Миелоид может включать макрофаги, макрофаги, происходящие из моноцитов, тканевые макрофаги, макрофаги фенотипа M0, M1 или M2. Миелоид может включать инфильтрирующий опухоль моноцит (TIM). Миелоид может включать опухолеассоциированный моноцит (TAM). Миелоид может включать супрессорную клетку миелоидного происхождения (MDSC). Миелоид может включать оседлый макрофаг ткани. Миелоид может включать опухолеассоциированные DC (TADC). Соответственно, миелоидная клетка может экспрессировать один или несколько маркеров клеточной поверхности, например, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD38, CCR5, CD66, Lox-1, CD11c, CD64, CD68, CD163, CCR2, CCR5, HLA-DR, CD1c, CD83, CD141, CD209, CD205, P-селектин, интегрины, ICAMS, VCAMS, MHC-II, CD123, CD303, CD304, белок семейства SIGLEC и белок семейства CLEC. В некоторых случаях, миелоидная клетка может характеризоваться высокой или низкой экспрессией одного или нескольких маркеров клеточной поверхности, например, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD66, Lox-1, CD11c, CD64, CD68, CD163, CCR2, CCR5, HLA-DR, CD1c, CD83, CD141, CD209, MHC-II, CD123, CD303, CD304 или их комбинации.

[00245] «Фагоцитоз» используется взаимозаменяемо с «поглощением» и может относиться к процессу, посредством которого клетка поглощает частицу, такую как раковая клетка или инфицированная клетка. Этот процесс может привести к образованию внутреннего компартмента (фагосомы), содержащего частицу. Этот процесс можно использовать для поглощения и/или удаления частиц, таких как раковые клетки или инфицированные клетки, из организма. В процесс фагоцитоза может быть вовлечен фагоцитарный рецептор. Процесс фагоцитоза может быть тесно связан с иммунным ответом и презентацией антигена. Процессинг экзогенных антигенов следует за их поглощением в профессиональные антигенпрезентирующие клетки через некоторые типы эндоцитарных событий. Фагоцитоз также может способствовать презентации антигена. Например, антигены из фагоцитированных клеток или патогенов, включая раковые антигены, могут подвергаться процессингу и презентироваться на клеточной поверхности APC.

[00246] «Полипептид» может относиться к молекуле, содержащей аминокислоты, связанные друг с другом посредством пептидной связи, такой как гликопротеин, липопротеин, клеточный белок или мембранный белок. Полипептид может содержать одну или несколько субъединиц белка. Полипептид может кодироваться рекомбинантной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления, полипептид может содержать более одной пептидной последовательности в одной аминокислотной цепи, которые могут быть разделены спейсером, линкером или последовательностью расщепления пептида. Полипептид может быть слитым полипептидом. Полипептид может

содержать один или несколько доменов, модулей или фрагментов.

[00247] «Рецептор» может относиться к химической структуре, состоящей из полипептида, передающего сигнал, такого как полипептид, передающий внеклеточный сигнал в клетку. Рецептор может служить для передачи информации в клетке, клеточном образовании или организме. Рецептор содержит по меньшей мере одну рецепторную единицу и может содержать две или несколько рецепторных единиц, где каждая рецепторная единица содержит молекулу белка, например молекулу гликопротеина. Рецептор может содержать структуру, которая связывается с лигандом и может образовывать комплекс с лигандом. Сигнальная информация может передаваться посредством конформационного изменения рецептора после связывания с лигандом на поверхности клетки.

[00248] Термин «антитело» относится к классу белков, широко известных как иммуноглобулины, включая, но не ограничиваясь ими, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (включая IgA1 и IgA2), IgD, IgE, IgM и IgY. Термин «антитело» включает, но не ограничен ими, полноразмерные антитела, одноцепочечные антитела, однодоменные антитела (sdAb) и их антигенсвязывающие фрагменты. Антигенсвязывающие фрагменты антител включают, но не ограничены ими, Fab, Fab' и F(ab')<sub>2</sub>, Fd (состоящий из V<sub>H</sub> и C<sub>H</sub>1), одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), одноцепочечные антитела, переменный фрагмент с дисульфидной связью (dsFv) и фрагменты, содержащие домен V<sub>L</sub> и/или домен V<sub>H</sub>. Антитела могут быть любого животного происхождения. Антигенсвязывающие фрагменты антител, включая одноцепочечные антитела, могут содержать переменную(ые) область(и) отдельно или в комбинации с одной или несколькими шарнирными областями, CH1 доменом, CH2 доменом и CH3 доменом. Также включены любые комбинации переменной(ых) области(ей) и шарнирной области, CH1, CH2 и CH3 доменов. Антитела могут быть моноклональными, поликлональными, химерными, гуманизированными и человеческими моноклональными и поликлональными антителами, которые, например, специфически связываются с HLA-ассоциированным полипептидом или комплексом HLA-пептид. Используемый в настоящем документе термин «связующее» представляет собой полипептид, который содержит связывающий домен, который может связываться с мишенью, где мишенью для связующего может быть белок, например, раковый антиген, гликопротеин и т. д. Связующее часто используется для обозначения CFP, например, CAR, и обозначается мишенью, которую он связывает, например, CD5-связующее, которое содержит связывающий домен для антигена CD5. В некоторых случаях, то же самое альтернативно или взаимозаменяемо называется анти-CD5 связующим или анти-TROP2 связующим. Как правило, термин «связующее» относится к любой молекуле, имеющей связывающий домен. В некоторых случаях, при описании в контексте, связующим может быть BiME или TRiME.

[00249] Термин «рекомбинантная нуклеиновая кислота» относится к нуклеиновой кислоте, полученной, экспрессированной, созданной или выделенной рекомбинантными способами. Рекомбинантная нуклеиновая кислота может содержать нуклеотидную

последовательность, не встречающуюся в природе. Рекомбинантная нуклеиновая кислота может быть синтезирована в лаборатории. Рекомбинантная нуклеиновая кислота может быть получена с использованием технологии рекомбинантной ДНК, например, ферментативной модификации ДНК, такой как ферментативное рестрикционное расщепление, лигирование и клонирование ДНК. Рекомбинантная нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК, РНК, их аналоги или их комбинацию. Рекомбинантная ДНК может быть транскрибирована *ex vivo* или *in vitro*, например, для получения матричной РНК (мРНК). Рекомбинантная мРНК может быть выделена, очищена и использована для трансфекции клетки. Рекомбинантная нуклеиновая кислота может кодировать белок или полипептид.

[00250] Процесс введения или включения нуклеиновой кислоты в клетку может осуществляться посредством трансформации, трансфекции или трансдукции. Трансформация представляет собой процесс поглощения чужеродной нуклеиновой кислоты бактериальной клеткой. Этот процесс адаптирован для размножения плазмидной ДНК, продуцирования белков и других применений. Трансформация вводит рекомбинантную плазмидную ДНК в компетентные бактериальные клетки, которые поглощают внеклеточную ДНК из окружающей среды. Некоторые виды бактерий компетентны от природы в определенных условиях окружающей среды, но компетентность искусственно индуцируется в лабораторных условиях. Трансфекция представляет собой введение малых молекул, таких как ДНК, РНК или антитела, в эукариотические клетки. Трансфекция может также относиться к введению бактериофага в бактериальные клетки. «Трансдукция» в основном используется для описания введения частиц рекомбинантного вирусного вектора в клетки-мишени, тогда как «инфекция» относится к естественному заражению людей или животных вирусами дикого типа.

[00251] Термин «вектор» может относиться к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к автономной репликации в клетке-хозяине и позволяющей клонировать молекулы нуклеиновой кислоты. Как известно специалистам в данной области техники, вектор включает, но не ограничен ими, плазмидные, космидные, фагемидные, вирусные векторы, фаговые векторы, дрожжевые векторы, векторы млекопитающих и подобные. Например, вектор для экзогенной генной трансформации может представлять собой плазмиду. В некоторых вариантах осуществления, вектор содержит последовательность нуклеиновых кислот, содержащую точку начала репликации и другие элементы, необходимые для репликации и/или поддержания последовательности нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления, вектор или плазида, предложенные в настоящем документе, представляют собой вектор экспрессии. Векторы экспрессии способны управлять экспрессией генов и/или последовательностью нуклеиновой кислоты, с которой они функционально связаны. В некоторых вариантах осуществления, вектор экспрессии или плазида находится в форме кольцевых двухцепочечных молекул ДНК. Вектор или плазида могут быть интегрированы или не интегрированы в геном клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления,

последовательности нуклеиновых кислот плазмиды не интегрируются в геном или хромосому клетки-хозяина после введения. Например, плазида может содержать элементы для временной экспрессии или стабильной экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот, например, генов или открытых рамок считывания, заключенных в плазмиде, в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой временный вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой стабильно экспрессирующийся вектор, который автономно реплицируется в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления, последовательности нуклеиновых кислот плазмиды интегрируются в геном или хромосому клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина. Векторы экспрессии, которые можно использовать в описанных в настоящем документе способах, включают, но не ограничены ими, плазмиды, эписомы, бактериальные искусственные хромосомы, дрожжевые искусственные хромосомы, бактериофаги или вирусные векторы. Вектор может быть вектором ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления, вектор, предложенный в настоящем документе, представляет собой вектор РНК, который способен интегрироваться в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяин (например, посредством обратной транскрипции), например, ретровирусный вектор или лентивирусный вектор. Другие формы векторов экспрессии, известные специалистам в данной области техники, которые выполняют эквивалентные функции, также могут быть использованы, например, самореплицирующиеся внехромосомные векторы или векторы, способные интегрироваться в геном хозяина. Примерами векторов являются векторы, способные к автономной репликации и/или экспрессии нуклеиновых кислот, с которыми они связаны.

[00252] Термины «спейсер» или «линкер», используемые в отношении слитого белка, относятся к пептидной последовательности, которая соединяет две другие пептидные последовательности слитого белка. В некоторых вариантах осуществления, линкер или спейсер не обладают какой-либо конкретной биологической активностью, кроме как соединять или сохранять некоторое минимальное расстояние или другие пространственные отношения между белками или последовательностями РНК. В некоторых вариантах осуществления, аминокислоты, входящие в состав спейсера, могут быть выбраны так, чтобы влиять на некоторые свойства молекулы, такие как укладка, гибкость, суммарный заряд или гидрофобность молекулы. Подходящие линкеры для применения в варианте осуществления настоящего изобретения хорошо известны специалистам в данной области техники и включают, но не ограничены ими, углеродные линкеры с прямой или разветвленной цепью, гетероциклические углеродные линкеры или пептидные линкеры. В некоторых вариантах осуществления, линкер используется для разделения двух или нескольких полипептидов, например двух антигенных пептидов, на расстояние, достаточное для обеспечения правильной укладки каждого антигенного пептида. Примеры пептидных линкерных последовательностей принимают гибкую вытянутую конформацию и не проявляют склонности к развитию упорядоченной

вторичной структуры. Аминокислоты в области гибкого линкерного белка могут включать Gly, Asn и Ser или любые перестановки аминокислотных последовательностей, содержащие Gly, Asn и Ser. Другие почти нейтральные аминокислоты, такие как Thr и Ala, также могут быть использованы в линкерной последовательности.

[00253] Термины «лечить», «леченный», «лечение», «лечение» и подобные предназначены для обозначения уменьшения, профилактики или облегчения нарушения и/или симптомов, связанных с ним (например, новообразования, опухоли или инфекционного агента или аутоиммунного заболевания). «Лечение» может относиться к введению терапии субъекту после начала или предполагаемого начала заболевания (например, рака или инфекции инфекционным агентом или аутоиммунного заболевания). «Лечение» включает понятие «облегчение», которое может относиться к уменьшению частоты возникновения или рецидива, или тяжести любых симптомов или других вредных эффектов, связанных с заболеванием, и/или побочных эффектов, связанных с терапией. Термин «лечение» также охватывает понятие «управление», которое относится к уменьшению тяжести заболевания или нарушения у пациента, например, к продлению жизни или увеличению выживаемости пациента с заболеванием, или к отсрочке его рецидива, например, удлинению периода ремиссии у больного, перенесшего заболевание. Понятно, что, хотя это и не исключается, лечение нарушения или состояния не требует полного устранения нарушения, состояния или симптомов, связанных с ним. Термин «предотвращать», «профилактика», «профилактика» и их грамматические эквиваленты, используемые в настоящем документе, могут относиться к профилактике или задержке появления симптомов, связанных с заболеванием или состоянием, у субъекта, у которого не развились такие симптомы ко времени начала введения агента или соединения. В некоторых вариантах осуществления, лечение субъекта или пациента, как описано в настоящем документе, включает введение терапевтической композиции, такой как лекарство, метаболит, профилактический компонент, нуклеиновая кислота, пептид или белок, который кодирует или иным образом образует лекарство, метаболит или профилактический компонент. В некоторых вариантах осуществления, лечение включает введение клетки или популяции клеток нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления, лечение включает введение субъекту одной или нескольких сконструированных клеток, описанных в настоящем документе, например, одной или нескольких сконструированных миелоидных клеток, таких как фагоцитарные клетки. Лечение включает лечение заболевания, состояния или синдрома, которое может быть патологическим заболеванием, состоянием или синдромом или латентным заболеванием, состоянием или синдромом. В некоторых случаях, лечение, как используется в настоящем документе, может включать введение терапевтической вакцины. В некоторых вариантах осуществления, сконструированную фагоцитарную клетку вводят пациенту или субъекту. В некоторых вариантах осуществления, клетка, введенная субъекту-человеку, приводит к снижению иммуногенности. Например, сконструированная фагоцитарная клетка может привести к отсутствию или уменьшению реакции «трансплантат против хозяина» (GVHD)

или эффекту взаимоуничтожения. В некоторых вариантах осуществления, сконструированная клетка, вводимая субъекту-человеку, является иммуносовместимой с субъектом (т.е. имеет соответствующий подтип HLA, который экспрессируется у субъекта в природе). Специфические для субъекта аллели HLA или генотип HLA субъекта можно определить любым способом, известным в данной области техники. В типовых вариантах осуществления, способы включают определение типов полиморфных генов, которые могут включать выравнивание прочтений, извлеченных из набора данных секвенирования, с эталонным набором генов, включающим аллельные варианты полиморфного гена, определение первой апостериорной вероятности или полученной апостериорной вероятности оценки для каждого варианта аллеля в выравнивании, идентификацию варианта аллеля с максимальной первой апостериорной вероятностью или оценкой, полученной апостериорной вероятностью, в качестве первого варианта аллеля, идентификацию одного или нескольких перекрывающихся прочтений, которые выровнены с первым вариантом аллеля, и одним или несколькими другими вариантами аллеля, определение второй апостериорной вероятности или получение оценки апостериорной вероятности для одного или нескольких других вариантов аллеля с использованием весового коэффициента, идентификацию второго аллельного варианта путем выбора аллельного варианта с максимальной второй апостериорной вероятностью или полученной оценкой апостериорной вероятностью, первого и второго аллельного варианта, определение типа гена для полиморфного гена и обеспечение вывода варианта первого и второго аллелей.

[00254] «Фрагмент» может относиться к части белка или нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент сохраняет по меньшей мере 50%, 75% или 80%, или 90%, 95% или даже 99% биологической активности эталонного белка или нуклеиновой кислоты.

[00255] Термины «выделенный», «очищенный», «биологически чистый» и их грамматические эквиваленты относятся к материалу, который свободен в той или иной степени от компонентов, которые обычно сопровождают его в нативном состоянии. «Выделять» означает степень отделения от исходного источника или окружения. «Очистить» означает степень разделения, которая выше, чем изоляция. «Очищенный» или «биологически чистый» белок в достаточной степени свободен от других материалов, так что любые примеси не оказывают существенного влияния на биологические свойства белка или не вызывают других неблагоприятных последствий. То есть нуклеиновая кислота или пептид по настоящему изобретению очищены, если они по существу не содержат клеточный материал, вирусный материал или культуральную среду при получении методами рекомбинантной ДНК или химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе. Чистоту и гомогенность обычно определяют с использованием методов аналитической химии, например электрофореза в полиакриламидном геле или высокоэффективной жидкостной хроматографии. Термин «очищенный» может означать, что нуклеиновая кислота или белок дает по существу одну

полосу в электрофоретическом геле. Для белка, который может быть подвергнут модификации, например, фосфорилированию или гликозилированию, различные модификации могут давать разные выделенные белки, которые можно очищать отдельно.

[00256] Термины «новообразование» или «рак» относятся к любому заболеванию, которое вызвано или приводит к неадекватно высоким уровням клеточного деления, неадекватно низким уровням апоптоза или тому и другому. Глиобластома представляет собой один неограничивающий пример новообразования или рака. Термины «рак», «опухоль» или «гиперпролиферативное расстройство» относятся к наличию клеток, обладающих характеристиками, типовыми для клеток, вызывающих рак, такими как неконтролируемая пролиферация, бессмертие, метастатический потенциал, быстрый рост и скорость пролиферации, а также некоторыми характерными морфологическими признаками. Раковые клетки часто находятся в форме опухоли, но такие клетки могут существовать в организме животного сами по себе или могут быть не канцерогенными раковыми клетками, такими как лейкозные клетки.

[00257] Термин «вакцина» следует понимать как означающий композицию для создания иммунитета для профилактики и/или лечения заболеваний (например, новообразования/опухоли/инфекционных агентов/аутоиммунных заболеваний). Соответственно, используемые в настоящем документе вакцины представляют собой лекарственные средства, которые содержат рекомбинантные нуклеиновые кислоты или клетки, содержащие и экспрессирующие рекомбинантную нуклеиновую кислоту, и предназначены для применения у людей или животных для создания специфической защиты и защитного вещества путем вакцинации. «Вакцинная композиция» может включать фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель. Аспекты настоящего описания относятся к использованию технологии при получении вакцины на основе фагоцитарных клеток.

[00258] Термин «фармацевтически приемлемый» относится к одобренным или одобренным регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или перечисленным в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных, включая человека. «Фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель» относится к эксципиенту, носителю или разбавителю, который можно вводить субъекту вместе с агентом, который не разрушает его фармакологическую активность и нетоксичен при введении в дозах, достаточных для доставки терапевтического количества агента.

[00259] Молекулы нуклеиновой кислоты, применимые в способах по настоящему изобретению, включают, но не ограничены ими, любую молекулу нуклеиновой кислоты, обладающую активностью или кодирующую полипептид. Полинуклеотиды, обладающие существенной идентичностью с эндогенной последовательностью, обычно способны гибридизоваться по меньшей мере с одной цепью двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты. «Гибридизация» относится к спариванию молекул нуклеиновой кислоты с образованием двухцепочечной молекулы между комплементарными полинуклеотидными

последовательностями или их частями в различных жестких условиях. (См., например, Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507). Например, точная концентрация соли обычно может составлять менее примерно 750 мМ NaCl и 75 мМ тринатрийцитрата, менее примерно 500 мМ NaCl и 50 мМ тринатрийцитрата или менее примерно 250 мМ NaCl и 25 мМ тринатрийцитрата. Гибридизацию в условиях низкой жесткости можно проводить в отсутствие органического растворителя, например формамида, тогда как гибридизацию с в условиях высокой жесткости можно проводить в присутствии по меньшей мере примерно 35% формамида или по меньшей мере примерно 50% формамида. Жесткие температурные условия обычно могут включать температуры по меньшей мере примерно 30°C, по меньшей мере примерно 37°C или по меньшей мере примерно 42°C. Различные дополнительные параметры, такие как время гибридизации, концентрация детергента, например, додецилсульфата натрия (SDS), и включение или исключение ДНК-носителя, хорошо известны специалистам в данной области техники. Различные уровни жесткости достигаются путем комбинирования этих различных условий по мере необходимости. В типовом варианте осуществления, гибридизация может происходить при 30°C в 750 мМ NaCl, 75 мМ тринатрийцитрата и 1% SDS. В другом иллюстративном варианте осуществления гибридизация может происходить при 37°C в 500 мМ NaCl, 50 мМ тринатрийцитрата, 1% SDS, 35% формамида и 100 мкг/мл денатурированной ДНК спермы лосося (оцДНК). В другом типовом варианте осуществления, гибридизация может происходить при 42°C в 250 мМ NaCl, 25 мМ цитрата натрия, 1% SDS, 50% формамида и 200 мкг/мл одноцепочечной ДНК. Полезные вариации этих условий будут очевидны специалистам в данной области техники. Для большинства применений, стадии промывания, следующие за гибридизацией, также могут различаться по жесткости. Условия жесткости промывания могут быть определены концентрацией соли и температурой. Как указано выше, жесткость промывания можно повысить, уменьшив концентрацию соли или повысив температуру. Например, строгая концентрация соли для стадий промывки может составлять менее примерно 30 мМ NaCl и 3 мМ тринатрийцитрата или менее примерно 15 мМ NaCl и 1,5 мМ тринатрийцитрата. Строгие температурные условия для стадий промывки могут включать температуру по меньшей мере примерно 25°C, по меньшей мере примерно 42°C или по меньшей мере примерно 68°C. В иллюстративных вариантах осуществления, стадии промывания могут проходить при 25°C в 30 мМ NaCl, 3 мМ тринатрийцитрата и 0,1% SDS. В других примерах осуществления стадии промывания могут проходить при 42°C в 15 мМ NaCl, 1,5 мМ тринатрийцитрата и 0,1% SDS. В другом типовом варианте осуществления, стадии промывки могут происходить при 68°C в 15 мМ NaCl, 1,5 мМ тринатрийцитрата и 0,1% SDS. Специалистам в данной области техники будут очевидны дополнительные вариации этих условий. Методы гибридизации хорошо известны специалистам в данной области и описаны, например, у Benton and Davis (*Science* 196:180, 1977); Grunstein and Hogness (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 72:3961, 1975); Ausubel et al. (*Current Protocols in Molecular*

Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York); и Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

[00260] «По существу идентичный» относится к молекуле полипептида или нуклеиновой кислоты, демонстрирующей по меньшей мере 50% идентичность эталонной аминокислотной последовательности (например, любой из описанных в настоящем документе аминокислотных последовательностей) или последовательности нуклеиновых кислот (например, любой из последовательности нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе). Такая последовательность может быть по меньшей мере на 60%, 80% или 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или даже на 99% или более идентичной на уровне аминокислот или нуклеиновых кислот используемой последовательности. для сравнения. Идентичность последовательности обычно измеряют с помощью программного обеспечения для анализа последовательности (например, программного обеспечения Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, программ BLAST, BESTFIT, GAP или PILEUP/PRETTYBOX ). Такое программное обеспечение сопоставляет идентичные или похожие последовательности, присваивая степени гомологии различным заменам, делециям и/или другим модификациям. Консервативные замены обычно включают замены в следующих группах: глицин, аланин; валин, изолейцин, лейцин; аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аспарагин, глутамин; серин, треонин; лизин, аргинин; и фенилаланин, тирозин. В типовом подходе к определению степени идентичности можно использовать программу BLAST с показателем вероятности между  $e^{-3}$  и  $e^{-6}$ , указывающим на близкородственную последовательность. «Эталон» представляет собой стандарт сравнения. Понятно, что нумерация конкретных положений или остатков в соответствующих последовательностях зависит от конкретного белка и используемой схемы нумерации. Нумерация может различаться, например, у предшественников зрелого белка и самого зрелого белка, и различия в последовательностях от вида к виду могут влиять на нумерацию. Специалист в данной области сможет идентифицировать соответствующий остаток в любом гомологичном белке и в соответствующей кодирующей нуклеиновой кислоте способами, хорошо известными в данной области техники, например, путем выравнивания последовательности с эталонной последовательностью и определения гомологичных остатков.

[00261] Термин «субъект» или «пациент» относится к организму, такому как животное (например, человек), который является объектом лечения, наблюдения или эксперимента. Только в качестве примера, субъект включает, но не ограничивается ими, млекопитающее, включая, но не ограничиваясь этим, человека или отличное от человека млекопитающее, такое как не являющийся человеком примат, мышь, крупный рогатый скот, лошадь, собака, овца или кошка.

[00262] Термин «терапевтический эффект» относится к некоторой степени

облегчения одного или нескольких симптомов нарушения (например, новообразования, опухоли или инфекции инфекционным агентом или аутоиммунного заболевания) или связанной с ним патологии. «Терапевтически эффективное количество», как используется в настоящем документе, относится к количеству агента, которое эффективно при однократном или многократном введении дозы в клетку или субъекту для продления выживаемости пациента с таким нарушением, уменьшения одного или нескольких признаков или симптомов нарушения, профилактики или отсрочки, и подобных, сверх ожидаемого в отсутствие такого лечения. «Терапевтически эффективное количество» предназначено для обозначения количества, необходимого для достижения терапевтического эффекта. Врач или ветеринар, обладающий обычными знаниями в данной области техники, может легко определить и прописать «терапевтически эффективное количество» (например, ED50) требуемой фармацевтической композиции.

[00263] В настоящем документе предложены сконструированные миелоидные клетки (включая, но не ограничиваясь ими, нейтрофилы, моноциты, миелоидные дендритные клетки (mDC), тучные клетки и макрофаги), предназначенные для специфического связывания клетки-мишени. Сконструированные миелоидные клетки могут атаковать и убивать клетки-мишени напрямую (например, путем фагоцитоза) и/или косвенно (например, путем активации Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой раковую клетку.

[00264] Хотя рак является одним из типовых примеров осуществления, подробно описанных в настоящем описании, предполагается, что способы и технологии, описанные в настоящем документе, применимы для таргетирования инфицированной или иным образом пораженной клетки внутри организма. Аналогичным образом, в настоящем документе описаны терапевтические и вакцинные композиции с использованием сконструированных клеток.

[00265] В настоящем документе предложены композиции и способы лечения заболеваний или состояний, таких как рак. В композициях и способах, предложенных в настоящем документе, используются миелоидные клетки человека, включая, но не ограничиваясь ими, нейтрофилы, моноциты, миелоидные дендритные клетки (mDC), тучные клетки и макрофаги, для таргетирования больных клеток, таких как раковые клетки. Композиции и способы, предложенные в настоящем документе, можно использовать для элиминации больных клеток, таких как раковые клетки и/или пораженные ткани, с помощью различных механизмов, включая активацию и рекрутирование Т-клеток, активацию эффекторных иммунных клеток (например, активацию CD8 Т-клеток и NK-клеток), перекрестную презентацию антигена, усиленные воспалительные реакции, снижение регуляторных Т-клеток и фагоцитоз. Например, миелоидные клетки можно использовать для поддержания иммунологических ответов против раковых клеток.

[00266] В настоящем документе предложены композиции, содержащие рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок (CFP),

такой как слитый белок фагоцитарного рецептора (PR) (PFP), слитый белок скэвенджер-рецептора (SR) (SFP), слитый белок интегринового рецептора (IR) (IFP) или слитый белок рецептора, рекрутирующего каспазу (каспаза-CAR). CFP, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой, может содержать внеклеточный домен (ECD), содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном клетки-мишени. Внеклеточный домен может быть слит с шарнирным доменом или внеклеточным доменом, полученным из рецептора, такого как CD2, CD8, CD28, CD68, фагоцитарного рецептора, скэвенджер-рецептора или интегринового рецептора. CFP, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой, может дополнительно содержать трансмембранный домен, такой как трансмембранный домен, полученный из CD2, CD8, CD28, CD68, фагоцитарного рецептора, скэвенджер-рецептора или интегринового рецептора. В некоторых вариантах осуществления, CFP, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой, дополнительно содержит внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен, такой как внутриклеточный сигнальный домен, полученный из фагоцитарного рецептора, скэвенджер-рецептора или интегринового рецептора. Например, внутриклеточный домен может содержать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов, полученных из фагоцитарного рецептора, скэвенджер-рецептора или интегринового рецептора. Например, внутриклеточный домен может содержать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов, которые стимулируют фагоцитарную активность, воспалительную реакцию, продуцирование оксида азота, активацию интегрин, усиленную миграцию эффекторных клеток (например, посредством экспрессии хемокинового рецептора), презентацию антигена и/или усиленную перекрестную презентацию. В некоторых вариантах осуществления, CFP представляет собой слитый белок фагоцитарного рецептора (PFP). В некоторых вариантах осуществления, CFP представляет собой слитый белок фагоцитарного скэвенджер-рецептора (PFP). В некоторых вариантах осуществления, CFP представляет собой слитый белок интегринового рецептора (IFP). В некоторых вариантах осуществления, CFP представляет собой слитый белок воспалительного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, CFP, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой, дополнительно содержит внутриклеточный домен, содержащий домен рекрутирования. Например, внутриклеточный домен может содержать один или несколько доменов рекрутирования PI3K, доменов рекрутирования каспазы или доменов активации и рекрутирования каспазы (CARD).

[00267] В настоящем документе предложена композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую CFP, содержащую субъединицу фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR) (например, слитый белок фагоцитарного рецептора (PFP)), содержащий: (i) трансмембранный домен и (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен фагоцитарного рецептора; и внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный к антигену, например, к антигену клетки-мишени или представленному на ней; где

трансмембранный домен и внеклеточный антигенсвязывающий домен функционально связаны так, что связывание антигена с мишенью посредством внеклеточного антигенсвязывающего домена слитого рецептора активируется во внутриклеточном сигнальном домене фагоцитарного рецептора.

[00268] В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен CFP содержит Ig-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен содержит связывающий домен IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, FcR $\gamma$ I, FcR $\gamma$ IIA, FcR $\gamma$ IIIB, FcR $\gamma$ IIIC, FcR $\gamma$ IIIA, FcR $\gamma$ IIIB, FcR $\eta$ , TRIM21, FcRL5. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен CFP содержит внеклеточный домен FcR. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен CFP содержит внеклеточный домен FcR $\alpha$ , FcR $\beta$ , FcR $\epsilon$  или FcR $\gamma$ . В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен содержит внеклеточный домен FcR $\alpha$  (FCAR). В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен содержит внеклеточный домен FcR $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен содержит внеклеточный домен FCER1A. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен содержит внеклеточный домен FDGR1A, FCGR2A, FCGR2B, FCGR2C, FCGR3A или FCGR3B. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен содержит домен интегрин или домен рецептора интегрин. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен содержит один или несколько доменов интегринов  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ IIb,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ 6,  $\alpha$ 7,  $\alpha$ 8,  $\alpha$ 9,  $\alpha$ 10,  $\alpha$ 11,  $\alpha$ D,  $\alpha$ E,  $\alpha$ L,  $\alpha$ M,  $\alpha$ V,  $\alpha$ X,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4,  $\beta$ 5,  $\beta$ 6,  $\beta$ 7 или  $\beta$ 8.

[00269] В некоторых вариантах осуществления, CFP дополнительно содержит внеклеточный домен, функционально связанный с трансмембранным доменом и внеклеточным антигенсвязывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен дополнительно содержит внеклеточный домен рецептора, шарнир, спейсер и/или линкер. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен содержит внеклеточную часть фагоцитарного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточная часть CFP происходит от того же рецептора, что и рецептор, от которого происходит внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен содержит внеклеточный домен скэвенджер-рецептора. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен содержит домен иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, домен иммуноглобулина содержит внеклеточный домен иммуноглобулина или шарнирную область иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен содержит домен фагоцитарного поглощения. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен содержит структуру, способную к мультимерной сборке. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен содержит каркас для мультимеризации. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен имеет длину по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 300, 400 или 500 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, длина внеклеточного домена составляет не более 500, 400, 300, 200 или 100 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный

антигенсвязывающий домен специфически связывается с антигеном клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит домен антитела. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит рецепторный домен, домен антитела, где домен антитела содержит функциональный фрагмент антитела, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), Fab, однодоменное антитело (sdAb), нанотело,  $V_H$  домен,  $V_L$  домен, VNAR домен,  $V_{HH}$  домен, биспецифическое антитело, диатело или их функциональный фрагмент или комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит лиганд, внеклеточный домен рецептора или адаптор. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит один внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный в отношении одного антигена. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере два внеклеточных антигенсвязывающих домена, где каждый из по меньшей мере двух внеклеточных антигенсвязывающих доменов специфичен в отношении другого антигена.

[00270] В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой опухолеассоциированный антиген, антиген клеточной линии дифференциации, патогенный антиген или аутоиммунный антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген содержит вирусный антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой Т-лимфоцитарный антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой внеклеточный антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой внутриклеточный антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген выбран из группы, состоящей из антигена из тимидинкиназы (TK1), гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), орфанного рецептора 1 типа рецепторной тирозинкиназы (ROR1), муцина-1, муцина-16 (MUC16), MUC1, рецептора эпидермального фактора роста  $vIII$  (EGFR $vIII$ ), мезотелина, рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), EBNA-1, LEMD1, фосфатидилсерина, карциноэмбрионального антигена (CEA), антигена созревания В-клеток (BCMA), Глипикана 3 (GPC3), рецептора фолликулостимулирующего гормона, белка активации фибробластов (FAP), эритропоэтин-продуцирующей гепатоцеллюлярной карциномы A2 (EphA2), EphB2, лиганда группы естественных киллеров 2D (NKG2D), дисialogанглиозида 2 (GD2), CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44 $v6$ , CD45, CD56CD79 $b$ , CD97, CD117, CD123, CD133, CD138, CD171, CD179 $a$ , CD213A2, CD248, CD276, PSCA, CS-1, CLECL1, GD3, PSMA, FLT3, TAG72, EPCAM, IL-1, интегринового рецептора, PRSS21, VEGFR2, PDGFR $\beta$ , SSEA-4, EGFR, NCAM, простазаы, PAP, ELF2M, GM3, TEM7R, CLDN6, TSHR, GPRC5D, ALK, Dsg1, Dsg3, IGLL1 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой антиген белка, выбранного из группы, состоящей из CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CCR4, CD8, CD30, CD45 и CD56. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой антиген рака яичников или антиген Т-лимфомы. В некоторых

вариантах осуществления, антиген представляет собой антиген интегринового рецептора. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой антиген интегринового рецептора или интегрин, выбранный из группы, состоящей из  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$ ,  $\alpha 11$ ,  $\alpha D$ ,  $\alpha E$ ,  $\alpha L$ ,  $\alpha M$ ,  $\alpha V$ ,  $\alpha X$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$ ,  $\beta 7$  и  $\beta 8$ . В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой антиген лиганда интегринового рецептора. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой антиген фибронектина, витронектина, коллагена или ламинина. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен может связываться с двумя или несколькими различными антигенами.

[00271] В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен содержит аутоантиген или его фрагмент, такой как Dsg1 или Dsg3. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит домен рецептора или домен антитела, где домен антитела связывается с аутоантигеном, таким как Dsg1 или Dsg3.

[00272] В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и внеклеточный антигенсвязывающий домен функционально связаны через линкер. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и внеклеточный антигенсвязывающий домен функционально связаны через линкер, такой как шарнирная область CD8 $\alpha$ , IgG1 или IgG4.

[00273] В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен содержит каркас мультимеризации.

[00274] В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит трансмембранный домен CD8. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит трансмембранный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит трансмембранный домен CD68. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит трансмембранный домен CD2. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит трансмембранный домен FcR. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит трансмембранный домен FcR $\gamma$ . В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит трансмембранный домен FcR $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит трансмембранный домен FcR $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит трансмембранный домен FcR $\epsilon$ . В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит трансмембранный домен синтаксин, такой как синтаксин 3, или синтаксин 4, или синтаксин 5. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен олигомеризуется с трансмембранным доменом эндогенного рецептора, когда CFP экспрессируется в клетке. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен олигомеризуется с трансмембранным доменом экзогенного рецептора, когда CFP экспрессируется в клетке. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен димеризуется с трансмембранным доменом эндогенного рецептора, когда CFP

экспрессируется в клетке. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен димеризуется с трансмембранным доменом экзогенного рецептора, когда CFP экспрессируется в клетке. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен получен из белка, который отличается от белка, из которого получен внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен получен из белка, отличного от белка, из которого получен внеклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит трансмембранный домен фагоцитарного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и внеклеточный домен происходят из одного и того же белка. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен происходит из того же белка, что и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует домен рекрутирования DAP12. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит трансмембранный домен, который олигомеризуется с DAP12.

[00275] В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен имеет по меньшей мере 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32 аминокислоты в длину. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен имеет не более 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32 аминокислот в длину.

[00276] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из фагоцитарного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из фагоцитарного рецептора, отличного от фагоцитарного рецептора, выбранного из Megf10, MerTk, FcR $\alpha$  или Bai1. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из фагоцитарного рецептора, выбранного из группы, состоящей из TNFR1, MDA5, CD40, лектина, декстина 1, CD206, скэвенджер-рецептора A1 (SRA1), MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L), CD64, CD32a, CD16a, CD89, Fc-альфа рецептора I, CR1, CD35, CD3 $\zeta$ , CR3, CR4, Tim-1, Tim-4 и CD169. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит домен рекрутирования PI3K. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из скэвенджер-рецептора. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит домен ингибирования CD47. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит домен ингибирования Rac, домен ингибирования Cdc42 или домен ингибирования ГТФазы. В некоторых вариантах осуществления, домен ингибирования Rac, домен ингибирования Cdc42 или домен ингибирования ГТФазы ингибирует Rac, Cdc42 или ГТФазу в

фагоцитарной чашечке клетки, экспрессирующей PFP. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит домен активации разборки F-актина, домен активации ARHGAP12, домен активации ARHGAP25 или домен активации SH3BP1. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит домен ингибирования фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит домен ингибирования ARP2/3. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит по меньшей мере один домен ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более доменов ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит по меньшей мере один домен ITAM, выбранный из домена ITAM CD3-дзета, CD3-эпсилон, CD3-гамма, CD3-дельта, цепи рецептора 1 Fc-эпсилон, цепи рецептора 2 Fc-эпсилон, цепи рецептора 1 Fc-гамма, цепи рецептора 2a Fc-гамма, цепи рецептора 2b1 Fc-гамма, цепи рецептора 2b2 Fc-гамма, цепи рецептора 3a Fc-гамма, цепи рецептора 3b Fc-гамма, цепи рецептора 1 Fc-бета, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один домен ITAM содержит сайт фосфорилирования киназ семейства Src. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один домен ITAM содержит домен рекрутинга Syk. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит домен активации деполимеризации F-актина. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен не имеет ферментативной активности.

[00277] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен не содержит домен, полученный из внутриклеточного домена CD3 дзета. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен не содержит домен, полученный из внутриклеточного домена MerTK. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен не содержит домен, полученный из внутриклеточного домена TLR4. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит домен ингибирования CD47. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит домен, активирующий интегрин, такой как внутриклеточная область PSGL-1.

[00278] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит домен, который активирует Rap1 ГТФазы, такой как домен из ERAC и C3G. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен получен из паксиллина. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен активирует киназу фокальной адгезии. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен происходит от одного фагоцитарного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен происходит от одного скэвенджер-рецептора. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит домен, усиливающий фагоцитоз.

[00279] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит провоспалительный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит домен активации киназы или связывающий домен киназы. В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит домен активации сигнального каскада  $\text{IL-1}$ . В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из TLR3, TLR4, TLR7, TLR 9, TRIF, RIG-1, MYD88, MAL, IRAK1, MDA-5, IFN-рецептора, STING, члена семейства NLRP, NLRP1-14, NOD1, NOD2, пирина, AIM2, NLRC4, FCGR3A, FCERIG, CD40, киназы, связывающей Tank1 (TBK), домена каспазы, связывающего домена прокаспазы или любой их комбинации.

[00280] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит сигнальный домен, такой как внутриклеточный сигнальный домен, полученный из белка коннексина (Cx). Например, внутриклеточный домен может содержать сигнальный домен, такой как внутриклеточный сигнальный домен, полученный из Cx43, Cx46, Cx37, Cx40, Cx33, Cx50, Cx59, Cx62, Cx32, Cx26, Cx31, Cx30.3, Cx31.1, Cx30, Cx25, Cx45, Cx47, Cx31.3, Cx36, Cx31.9, Cx39, Cx40.1 или Cx23. Например, внутриклеточный домен может содержать сигнальный домен, такой как внутриклеточный сигнальный домен, полученный из Cx43.

[00281] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит сигнальный домен, такой как внутриклеточный сигнальный домен, полученный из белка SIGLEC. Например, внутриклеточный домен может содержать сигнальный домен, такой как внутриклеточный сигнальный домен, полученный из Siglec-1 (сиалоадгезина), Siglec-2 (CD22), Siglec-3 (CD33), Siglec-4 (MAG), Siglec-5, Siglec-6, Siglec-7, Siglec-8, Siglec-9, Siglec-10, Siglec-11, Siglec-12, Siglec-13, Siglec-14, Siglec-15, Siglec-16 или Siglec-17.

[00282] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит сигнальный домен, такой как внутриклеточный сигнальный домен, полученный из белка лектина С-типа. Например, внутриклеточный домен может содержать сигнальный домен, такой как внутриклеточный сигнальный домен, полученный из рецепторного белка маннозы. Например, внутриклеточный домен может содержать сигнальный домен, такой как внутриклеточный сигнальный домен, полученный из рецепторного белка асиалогликопротеина. Например, внутриклеточный домен может содержать сигнальный домен, такой как внутриклеточный сигнальный домен, полученный из лектина макрофагального типа галактозы (MGL), DC-SIGN (CLEC4L), лангерина (CLEC4K), миелоидного DAP12-соединяющего лектина (MDL)-1 (CLEC5A), белка подсемейства DC-ассоциированного С типа лектина 1 (Dectin1), декстина 1/CLEC7A, DNGR1/CLEC9A, миелоидного лектиноподобного рецептора С типа (M1CL) (CLEC12A), CLEC2 (CLEC1B), CLEC12B, белка подсемейства иммунорецептора DC (DCIR), DCIR/CLEC4A, Dectin 2/CLEC6A, DC антиген 2 крови (BDCA2) (CLEC4C), Mincle (индуцируемого макрофагами лектина С типа) (CLEC4E), NOD-подобного рецепторного белка, трансактиватора NOD-

подобного рецептора МНС класса II (СИТА), IPAF, BIRC1, белка RIG-I-подобного рецептора (RLR), RIG-I, MDA5, LGP2, NAIP5/Birc1e, белка NLRP, NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP4, NLRP5, NLRP6, NLRP7, NLRP89, NLRP9, NLRP10, NLRP11, NLRP12, NLRP13, NLRP14, белка NLR, NOD1 или NOD2 или любой их комбинации.

[00283] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит сигнальный домен, такой как внутриклеточный сигнальный домен, полученный из молекулы клеточной адгезии. Например, внутриклеточный домен может содержать сигнальный домен, такой как внутриклеточный сигнальный домен, полученный из IgCAM, кадгерина, интегрина, белка лектиноподобных доменов С-типа (CTLD) и/или молекулы протеогликана. Например, внутриклеточный домен может содержать сигнальный домен, такой как внутриклеточный сигнальный домен, полученный из E-кадгерина, P-кадгерина, N-кадгерина, R-кадгерина, B-кадгерина, T-кадгерина или M-кадгерина. Например, внутриклеточный домен может содержать сигнальный домен, такой как внутриклеточный сигнальный домен, полученный из селектина, такого как E-селектин, L-селектин или P-селектин.

[00284] В некоторых вариантах осуществления, CFP не содержит полноразмерный внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен имеет длину по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 300, 400 или 500 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, длина внутриклеточного домена составляет не более 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 300, 400 или 500 аминокислот.

[00285] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует внеклеточный домен цепи FcR $\alpha$ , трансмембранный домен цепи FcR $\alpha$  и/или внутриклеточный домен цепи FcR $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует внеклеточный домен цепи FcR $\beta$ , трансмембранный домен цепи FcR $\beta$  и/или внутриклеточный домен цепи FcR $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления, цепь FcR $\alpha$  или цепь FcR $\beta$  образует комплекс с FcR $\gamma$  при экспрессии в клетке. В некоторых вариантах осуществления, цепь FcR $\alpha$  или цепь FcR $\beta$  образует комплекс с эндогенным FcR $\gamma$  при экспрессии в клетке. В некоторых вариантах осуществления, цепь FcR $\alpha$  или цепь FcR $\beta$  не встраивается в клеточную мембрану клетки, которая не экспрессирует FcR $\gamma$ . В некоторых вариантах осуществления, CFP не содержит внутриклеточный сигнальный домен цепи FcR $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления, CFP не содержит внутриклеточный сигнальный домен цепи FcR $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует внеклеточный домен TREM, трансмембранный домен TREM и/или внутриклеточный домен TREM. В некоторых вариантах осуществления, TREM представляет собой TREM1, TREM 2 или TREM 3.

[00286] В настоящем документе предложены способы и композиции для получения терапевтических миелоидных клеток, таких как те, которые сконструированы для таргетирования и уничтожения больной клетки, такой как раковая клетка. Хотя в

описании приводится множество примеров композиций и способов для уничтожения раковых или опухолевых клеток, специалист в данной области техники сможет сконструировать такие макрофаги для таргетирования другой больной клетки, такой как инфицированная клетка, без ненужных экспериментов.

[00287] В некоторых вариантах осуществления, макрофаг выделяют у субъекта, нуждающегося в этом, конструируют для экспрессии представляющего интерес белка или более чем одного белка, и затем вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта имеется рак или опухоль. Макрофаг, выделенный от субъекта, сконструированный для экспрессии представляющего интерес белка или более чем одного белка, и затем введенный субъекту, представляет собой терапевтический макрофаг, который может таргетировать и уничтожать раковую клетку или опухолевую клетку субъекта.

[00288] В одном аспекте, в настоящем документе предложена композиция, содержащая одну или несколько последовательностей рекомбинантных нуклеиновых кислот, содержащих: (А) первую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую экзогенный полипептид; (В) вторую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую слитый белок химерного антигенного рецептора миелоидной клетки (CFP), где CFP содержит: (а) внутриклеточную сигнальную субъединицу, содержащую внутриклеточный сигнальный домен, содержащий тирозиновые остатки, которые фосфорилируются при связывании антигена рецептором; (b) трансмембранный домен и (с) внеклеточный связывающий домен, обладающий специфичностью связывания в отношении компонента на поверхности клетки-мишени, где внеклеточный связывающий домен функционально связан с трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной субъединицей; и (d) домен активатора транскрипции, функционально связанный с внутриклеточной сигнальной субъединицей через последовательность расщепления протеазой, где домен активатора транскрипции способствует транскрипции первой последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей экзогенный полипептид; и (С) третью последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую (а) протеазу, которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, функционально связывающую домен активатора транскрипции с внутриклеточной сигнальной субъединицей; (b) домен, который связывается с тирозиновыми остатками, которые фосфорилируются при активации CFP; где протеаза, которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, и домен, который связывается с тирозиновыми остатками, функционально связаны.

[00289] В некоторых вариантах осуществления, третья последовательность нуклеиновых кислот дополнительно кодирует (с) чувствительный к стимулу элемент. В некоторых вариантах осуществления, чувствительный к стимулу элемент (с) слит с доменом, который связывается с фосфорилированными тирозиновыми остатками. В некоторых вариантах осуществления, чувствительный к стимулу элемент отвечает на микроокружение клетки, которая экспрессирует последовательность нуклеиновых кислот.

В некоторых вариантах осуществления, (с) представляет собой дегрон, функционально связанный с (b). В некоторых вариантах осуществления, дегрон представляет собой дегрон HIF-1a.

[00290] В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько рекомбинантных нуклеиновых кислот экспрессируются в миелоидной клетке. В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка представляет собой клетку-макрофаг. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой раковую клетку.

[00291] В некоторых вариантах осуществления, первая нуклеиновая кислота кодирует профагоцитарный или провоспалительный полипептид, или оба. В некоторых вариантах осуществления, CFP представляет собой слитый белок фагоцитарного рецептора, имеющий один или несколько доменов фагоцитарного рецептора или их фрагментов. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько доменов фагоцитарного рецептора или их фрагментов выбраны из группы, состоящей из лектина, дектина 1, CD206, фагоцитарного рецептора A1 (SRA1), MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIG(L), CD64, CD32a, CD16a, CD89, Fc-альфа рецептора I, CR1, CD35, CR3, CR4, Tim-1, Tim-4 и CD169.

[00292] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен CFP получают из фагоцитарного рецептора.

[00293] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен получают из рецептора, отличного от фагоцитарного рецептора, выбранного из Megf10, MerTk, FcR-альфа или Bai1. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная субъединица, содержащая внутриклеточный сигнальный домен, содержащий тирозиновые остатки, содержит по меньшей мере один домен ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная субъединица содержит более одного домена ITAM. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один домен ITAM выбран из группы: субъединица TCR CD3 дзета, субъединица TCR CD3 эпсилон, субъединица TCR CD3 гамма, субъединица TCR CD3 дельта, цепь TCR дзета, цепь рецептора 1 Fc эпсилон, цепь рецептора 2 Fc эпсилон, цепь рецептора 1 Fc гамма, цепь рецептора 2a Fc гамма, цепь рецептора 2b1 Fc гамма, цепь рецептора 2b2 Fc гамма, цепь рецептора 3a Fc гамма, цепь рецептора 3b Fc гамма, цепь рецептора 1 Fc бета, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, их функциональные фрагменты и их аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один домен ITAM содержит сайт фосфорилирования киназ семейства Src. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один домен ITAM содержит домен рекрутирования Syk.

[00294] В некоторых вариантах осуществления различных аспектов, описанных в

настоящем документе, внутриклеточная сигнальная субъединица дополнительно содержит домен рекрутирования DAP12. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 доменов ITAM.

[00295] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная субъединица дополнительно содержит провоспалительный сигнальный домен, содержащий домен активации сигнального каскада  $\text{I}\kappa\text{B}$ -1. В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из TLR3, TLR4, TLR7, TLR9, TRIF, RIG-1, MYD88, MAL, IRAK1, MDA-5, рецептора IFN, члена семейства NLRP, NLRP1-14, NOD1, NOD2, пирина, AIM2, NLRC4, FCGR3A, FCERIG, CD40, домена каспазы или домена, связывающего прокаспазу, или любой их комбинации.

[00296] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен дополнительно содержит домен, активирующий интегрин, такой как внутриклеточная область PSGL-1.

[00297] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен дополнительно содержит домен, который активирует Rap1 ГТФазы, такой как домен из EPAC и C3G. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен дополнительно содержит домен паксиллина.

[00298] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен активирует киназу фокальной адгезии.

[00299] В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный связывающий домен, обладающий специфичностью связывания в отношении компонента на поверхности клетки-мишени, содержит антитело или его функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный связывающий домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

[00300] В некоторых вариантах осуществления, компонент на поверхности клетки-мишени представляет собой антиген, выбранный из группы, состоящей из тимидинкиназы (TK1), гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), орфанного рецептора 1 типа рецепторной тирозинкиназы (ROR1), Муцина-1, Муцина-16 (MUC16), MUC1, рецептора эпидермального фактора роста  $\nu\text{III}$  (EGFR $\nu\text{III}$ ), мезотелина, рецептора эпидермального фактора роста 2 человека (HER2), мезотелина, EBNA-1, LEMD1, фосфатидилсерина, карциноэмбрионального антигена (CEA), антигена созревания В-клеток (BCMA), Глипикана 3 (GPC3), рецептора фолликулостимулирующего гормона, белка активации фибробластов (FAP), гепатоцеллюлярной карциномы, продуцирующей эритропоэтин A2 (EphA2), EphB2, лиганда группы естественных киллеров 2D (NKG2D), Дисиалоганглиозида 2 (GD2), CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD45, CD56CD79b, CD97, CD117, CD123, CD133, CD138, CD171, CD179a, CD213A2, CD248, CD276, PSCA, CS-1, CLECL1, GD3, PSMA, FLT3, TAG72, EPCAM, IL-1, интегринового рецептора, PRSS21, VEGFR2, PDGFR-бета, SSEA-4,

EGFR, NCAM, простазы, PAP, ELF2M, GM3, TEM7R, CLDN6, TSHR, GPRC5D, ALK, IGLL1 и их комбинаций.

[00301] В некоторых вариантах осуществления, компонент на поверхности клетки-мишени представляет собой антиген, выбранный из группы, состоящей из CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CCR4, CD8, CD30, CD45, CD56.

[00302] В некоторых вариантах осуществления, компонент на поверхности клетки-мишени представляет собой антиген рака яичников или антиген Т-лимфомы.

[00303] В некоторых вариантах осуществления, компонент на поверхности клетки-мишени представляет собой интегриновый рецептор.

[00304] В некоторых вариантах осуществления, компонент на поверхности клетки-мишени представляет собой интегриновый рецептор, выбранный из группы, состоящей из  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 1b$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$ ,  $\alpha 11$ ,  $\alpha D$ ,  $\alpha E$ ,  $\alpha L$ ,  $\alpha M$ ,  $\alpha V$ ,  $\alpha X$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$ ,  $\beta 7$  и  $\beta 8$ .

[00305] В некоторых вариантах осуществления, компонент на поверхности клетки-мишени содержит 2 или несколько различных антигенов.

[00306] В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен имеет по меньшей мере 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32 аминокислоты в длину. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен имеет не более 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит трансмембранный домен, который олигомеризуется с DAP12. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен и внеклеточный антигенсвязывающий домен функционально связаны через линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит пептид. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит шарнирную область CD8 $\alpha$ , IgG1 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления, линкер представляет собой синтетический линкер. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит трансмембранный домен FcR.

[00307] Композиция по любому из вариантов осуществления, описанных выше, где домен активатора транскрипции дополнительно содержит ДНК-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления, ДНК-связывающий домен выбран из ДНК-связывающего домена (DB) Gal4, ZFHD1 или tet-R. В некоторых вариантах осуществления, домен активатора транскрипции содержит домен трансактивации VP64.

[00308] В некоторых вариантах осуществления, протеаза, которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, которая функционально связывает домен активатора транскрипции с внутриклеточной сигнальной субъединицей, представляет собой протеазу NS3 вируса гепатита С (HCV). В некоторых вариантах осуществления, домен, который связывается с тирозиновыми остатками, которые фосфорилируются при активации CFP, представляет собой связывающий домен фосфотирозина (РТВ). В некоторых вариантах осуществления, РТВ представляет собой Shc РТВ.

[00309] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая

кислота представляет собой ДНК.

[00310] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой РНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой мРНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой кольцевую РНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота связана с репликоном РНК.

[00311] В одном аспекте, в настоящем документе предложен вектор, кодирующий одну или несколько рекомбинантных нуклеиновых кислот по любому из вариантов осуществления, описанных выше.

[00312] В одном аспекте, в настоящем документе предложена миелоидной клетке, экспрессирующая вектор варианта осуществления, описанного выше.

[00313] В одном аспекте, в настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая миелоидную клетку по варианту осуществления, описанному выше.

[00314] В одном аспекте, в настоящем документе предложена клетка, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный белок, содержащий: (а) цитотоксический полипептид; (b) последовательность расщепления протеазой; и (с) ингибирующий полипептидный домен, где ингибирующий полипептидный домен ингибирует цитотоксический полипептид; где цитотоксический полипептид, последовательность расщепления протеазой и ингибирующий полипептидный домен функционально связаны.

[00315] В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой миелоидную клетку.

[00316] В некоторых вариантах осуществления, цитотоксический полипептид представляет собой цитотоксический домен главного основного белка эозинофилов человека. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксический полипептид представляет собой кислотный домен главного основного белка эозинофилов человека.

[00317] В некоторых вариантах осуществления, последовательность расщепления протеазой представляет собой последовательность распознавания MMP.

[00318] В некоторых вариантах осуществления, последовательность расщепления протеазой расщепляется MMP.

[00319] В одном аспекте, в настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая любую из клеток вариантов осуществления, описанных в настоящем документе.

[00320] В одном аспекте, в настоящем документе предложена рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе.

[00321] В одном аспекте, в настоящем документе предложен вектор, кодирующий рекомбинантную нуклеиновую кислоту по вариантам осуществления, описанным в

настоящем документе.

[00322] В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ получения терапевтических миелоидных клеток против рака, включающий экспрессию в миелоидных клетках рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей: (A) первую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую экзогенный полипептид; (B) вторую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный антигенный рецептор миелоидной клетки (CFP), где CFP содержит: (a) внутриклеточную сигнальную субъединицу, содержащую внутриклеточный сигнальный домен, содержащий тирозиновые остатки, которые фосфорилируются при активации CFP; (b) трансмембранный домен и (c) внеклеточный связывающий домен, обладающий специфичностью связывания в отношении компонента на поверхности клетки-мишени, где внеклеточный связывающий домен функционально связан с трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной субъединицей; и (d) домен активатора транскрипции, функционально связанный с внутриклеточной сигнальной субъединицей через последовательность расщепления протеазой, где домен активатора транскрипции способствует транскрипции первой последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей экзогенный полипептид; и (C) третью последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую (a) протеазу, которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, функционально связывающую домен активатора транскрипции с внутриклеточной сигнальной субъединицей; (b) домен, который связывается с тирозиновыми остатками, которые фосфорилируются при активации CAR; где протеаза, которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, и домен, который связывается с тирозиновыми остатками, функционально связаны.

[00323] В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ получения терапевтических миелоидных клеток против рака, включающий экспрессию в миелоидных клетках рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный белок, содержащий: (a) кислотный домен главного основного белка эозинофилов человека; (b) последовательность узнавания MMR; и (c) цитотоксический домен главного основного белка эозинофилов человека.

[00324] В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ лечения субъекта, страдающего раком, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе.

[00325] В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ индукции регрессии опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающий внутривенное введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей миелоидные клетки, где миелоидные клетки экспрессируют одну или несколько рекомбинантных нуклеиновых кислот, кодирующих один или несколько полипептидов, и где, по меньшей мере, один из одного или нескольких полипептидов является функционально активным в микроокружении опухоли и функционально неактивным в неопуховом окружении. В

некоторых вариантах осуществления нескольких аспектов, описанных в настоящем документе, фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию по вариантам осуществления, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления нескольких аспектов, описанных в настоящем документе, фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию по пунктам вариантов осуществления, описанных в настоящем документе.

[00326] В некоторых вариантах осуществления нескольких аспектов, описанных в настоящем документе, клетка-мишень представляет собой раковую клетку, которая представляет собой клетку глиобластомы.

[00327] В настоящем документе предложен способ лечения субъекта, страдающего раком, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, способ, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, описанной выше.

[00328] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую провоспалительный полипептид. В некоторых вариантах осуществления, композиция дополнительно содержит провоспалительный нуклеотид или нуклеотид в рекомбинантной нуклеиновой кислоте, например, АТФ, АДФ, УТФ, УДФ и/или УДФ-глюкозе. В некоторых вариантах осуществления, домен активатора транскрипции содержит домен трансактивации VP64. В некоторых вариантах осуществления, протеаза, которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, которая функционально связывает домен активатора транскрипции с внутриклеточной сигнальной субъединицей, представляет собой протеазу NS3 вируса гепатита С (HCV). В некоторых вариантах осуществления, домен, который связывается с тирозиновыми остатками, которые фосфорилируются при активации CFP, представляет собой связывающий домен фосфотирозина (РТВ). В некоторых вариантах осуществления, РТВ представляет собой Shc РТВ. В некоторых вариантах осуществления, третья нуклеиновая кислота кодирует дегрон, который может быть функционально связан с CFP. В некоторых вариантах осуществления, дегрон представляет собой дегрон HIF-1 $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой РНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой мРНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой кольцевую РНК.

[00329] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота связана с репликоном РНК. В настоящем документе предложен способ получения терапевтических миелоидных клеток против рака, включающий экспрессию в миелоидных клетках рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей: (А) первую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую экзогенный полипептид; (В) вторую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный антигенный

рецептор миелоидной клетки (CFP), где CFP содержит: (a) внутриклеточную сигнальную субъединицу, содержащую внутриклеточный сигнальный домен, содержащий тирозиновые остатки, которые фосфорилируются при активации CFP; (b) трансмембранный домен и (c) внеклеточный связывающий домен, обладающий специфичностью связывания в отношении компонента на поверхности клетки-мишени, где внеклеточный связывающий домен функционально связан с трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной субъединицей; и (d) домен активатора транскрипции, функционально связанный с внутриклеточной сигнальной субъединицей через последовательность расщепления протеазой, где домен активатора транскрипции способствует транскрипции первой последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей экзогенный полипептид; и (C) третью последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую (a) протеазу, которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, функционально связывающую домен активатора транскрипции с внутриклеточной сигнальной субъединицей; (b) домен, который связывается с тирозиновыми остатками, которые фосфорилируются при активации CFP; где протеаза, которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, и домен, который связывается с тирозиновыми остатками, функционально связаны. В настоящем документе предложен способ получения терапевтических миелоидных клеток против рака, включающий экспрессию в миелоидных клетках рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный белок, содержащий: (a) кислотный домен главного основного белка эозинофилов человека; (b) последовательность узнавания MMP; и (c) цитотоксический домен главного основного белка эозинофилов человека.

[00330] В настоящем документе предложен способ лечения субъекта, страдающего раком, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, описанной выше. В настоящем документе предложен способ лечения субъекта, страдающего раком, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе. В настоящем документе предложен способ индукции регрессии опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающий внутривенное введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей миелоидные клетки, где миелоидные клетки экспрессируют одну или несколько рекомбинантных нуклеиновых кислот, кодирующих один или несколько полипептидов, и где по меньшей мере один из одного или нескольких полипептидов функционально активен в микроокружении опухоли и не активен в неопуховом окружении.

[00331] В некоторых вариантах осуществления, композиция дополнительно содержит провоспалительный полипептид. В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный полипептид представляет собой хемокин, цитокин. В некоторых вариантах осуществления, хемокин выбран из группы, состоящей из IL-1, IL3, IL5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-23, TNF, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL-18, IL-23, IL-27, CSF, MCSF, GMCSF, IL17, IP-10, RANTES и интерферона. В некоторых вариантах

осуществления, цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1, IL3, IL5, IL-6, IL-12, IL-13, IL-23, TNF, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL-18, IL-23, IL-27, CSF, MCSF, GMCSF, IL17, IP-10, RANTES и интерферона.

[00332] В некоторых вариантах осуществления, миелоидные клетки специально предназначены для доставки. На миелоидные клетки можно воздействовать с помощью специализированных биоразлагаемых полимеров, таких как PLGA (сополимер молочной и гликолевой кислот и/или поливиниловый спирт (PVA)). В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько соединений могут быть селективно включены в такие полимерные структуры для воздействия на функцию миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления, таргетные структуры являются многослойными, например, из одного или нескольких слоев PLGA и одного или нескольких слоев PVA. В некоторых вариантах осуществления, таргетные структуры собраны в порядке, обеспечивающем многоуровневую активность. В некоторых вариантах осуществления, таргетные полимерные структуры организованы в виде компонентов определенной формы, таких как лабильные структуры, которые могут прикрепляться к поверхности миелоидных клеток и доставлять один или несколько компонентов, таких как факторы роста и цитокины, например, для поддержания миелоидной клетки в микроокружении, обеспечивающем специфическую поляризацию. В некоторых вариантах осуществления, полимерные структуры таковы, что они не фагоцитируются миелоидной клеткой, но могут оставаться прикрепленными к поверхности. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько факторов роста могут представлять собой факторы поляризации M1, такие как цитокин. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько факторов роста могут представлять собой фактор поляризации M2, такой как цитокин. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько факторов роста могут представлять собой цитокин, активирующий макрофаги, такой как IFN $\gamma$ . В некоторых вариантах осуществления, полимерные структуры способны к замедленному высвобождению одного или нескольких факторов роста в среде *in vivo*, например, в солидной опухоли.

[00333] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую гомеостатический регулятор воспаления. В некоторых вариантах осуществления, гомеостатический регулятор воспаления представляет собой последовательность в нетранслируемой области (UTR) мРНК. В некоторых вариантах осуществления, последовательность в UTR представляет собой последовательность, которая связывается с РНК-связывающим белком. В некоторых вариантах осуществления, трансляция ингибируется или предотвращается при связывании РНК-связывающего белка с последовательностью в нетранслируемой области (UTR). В некоторых вариантах осуществления, последовательность в UTR содержит консенсусную последовательность WWWU(AUUUA)UUUW, где W представляет собой А или U. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота экспрессируется на бицистронном векторе.

[00334] В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой

клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень включает клетку, инфицированную патогеном. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой раковую клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой раковую клетку, которая представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой раковую клетку, которая представляет собой раковую клетку яичника. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой раковую клетку, которая представляет собой клетку молочной железы. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой раковую клетку, которая представляет собой клетку поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой раковую клетку, которая представляет собой клетку глиобластомы.

[00335] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой РНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой мРНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой не модифицированную мРНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой модифицированную мРНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой кольцевую РНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой тРНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой микроРНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой самореплицирующуюся РНК.

[00336] Также в настоящем документе предложен вектор, содержащий последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую СФР, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор или лентивирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, вектор дополнительно содержит промотор, функционально связанный по меньшей мере с одной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей один или несколько полипептидов. В некоторых вариантах осуществления, вектор является полицистронным. В некоторых вариантах осуществления, каждая из по меньшей мере одной последовательности нуклеиновой кислоты функционально связана с отдельным промотором. В некоторых вариантах осуществления, вектор дополнительно содержит один или несколько участков внутренней посадки рибосомы (IRES). В некоторых вариантах осуществления, вектор дополнительно содержит 5'UTR и/или 3'UTR, фланкирующие по меньшей мере одну последовательность

нуклеиновых кислот, кодирующую один или несколько полипептидов. В некоторых вариантах осуществления, вектор дополнительно содержит одну или несколько регуляторных областей.

[00337] Также в настоящем документе предложен полипептид, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой композиции, описанной в настоящем документе.

[00338] В настоящем документе предложена композиция, содержащая рекомбинантную последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую CFP, содержащую субъединицу фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR) (например, слитый белок фагоцитарного рецептора (PFP)), включающую: субъединицу PR, содержащую: трансмембранный домен и внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, специфичный к антигену клетки-мишени; где трансмембранный домен и внеклеточный домен функционально связаны; и где при связывании CFP с антигеном клетки-мишени активность лизиса или фагоцитоза миелоидных клеток, таких как нейтрофилы, моноциты, миелоидные дендритные клетки (mDC), тучные клетки или макрофаги, экспрессирующие CFP, увеличивается на по меньшей мере более чем 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 950% или 1000% по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP.

[00339] В Таблице 1 показаны типовые последовательности доменов химерных слитых белков и/или их фрагментов, которые не ограничивают объем настоящего изобретения.

**ТАБЛИЦА 1. ТИПОВЫЕ ХИМЕРНЫЕ СЛИТЫЕ БЕЛКИ И РЕЦЕПТОРНЫЕ ДОМЕНЫ**

<b>SEQ ID NO</b>	<b>CFP/Домен</b>	<b>Последовательность</b>
1	CD5-FcR-PI3K	MWLQSLLLLGTVACSISEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCA ASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTY ADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRG YDWYFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVITICRASQDINSYLSWFQQKPGKAPK TLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYY CQQYDESPWTFGGGKLEIKSGGGGSGALSNSIMYFSHFV PVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRLKIQVRK

		AAITSYEKSDGVYTG LSTRNQETYETLKHEKPPQGSYSYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENM
2	HER2-FcR-PI3K	MWLQSLLLLGT VAC S I S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R ASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFLT I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V EIKRTGSTSGSGKPGSGEGSEVQLVESGGGLVQP G G S L R L S CAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDVWGQGT L V T V S S S G G G G S G A L S N S I M Y F S H FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPT I A S Q P L S L R P E A C R P A A G GAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRLKIQV RKA A I T S Y E K S D G V Y T G L S T R N Q E T Y E T L K H E K P P Q G S G S YEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENM
3	CD5-FcR-CD40	MWLQSLLLLGT VAC S I S E I Q L V Q S G G G L V K P G G S V R I S C A ASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTY ADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRG YDWYFDVWGQGT T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q M T QSPSSLSASV G D R V T I T C R A S Q D I N S Y L S W F Q Q K P G K A P K TLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLT I S S L Q Y E D F G I Y Y CQQYDESPWTFGGGTKLEIKSGGGGSGALSNSIMYFSHFV PVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPT I A S Q P L S L R P E A C R P A A G G A VHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRLKIQVRKA A I T S Y E K S D G V Y T G L S T R N Q E T Y E T L K H E K P P Q K K V A K K P TNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVT QEDGKESRISVQERQ
4	CD5-FcR-MDA5	MWLQSLLLLGT VAC S I S E I Q L V Q S G G G L V K P G G S V R I S C A ASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTY ADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRG YDWYFDVWGQGT T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q M T QSPSSLSASV G D R V T I T C R A S Q D I N S Y L S W F Q Q K P G K A P K TLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLT I S S L Q Y E D F G I Y Y CQQYDESPWTFGGGTKLEIKSGGGGSGALSNSIMYFSHFV PVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPT I A S Q P L S L R P E A C R P A A G G A VHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRLKIQVRKA A I T S Y E K S D G V Y T G L S T R N Q E T Y E T L K H E K P P Q G S G S M S N

		GYSTDENFRYLISCFRARVKMYIQVEPVLDTFLPAEVK EQIQRVATSGNMQAVELLSTLEKGVWHLGWTREFVEA LRRTGSPLAARYMNPDLTDLSPSPFENAHDEYLQLLNLLQ PTLVDKLLVRDVLKCMEEELLTIEDRNRIAAENNGNES GVRELLKRIVQKENWFSAFLNVLRQTGNNELVQELTGSD CSESNAEIEN
5	CD5-FcR-TNFR1	MWLQSLLLLGTVACSIQQLVQSGGGLVKPGGSVRISCA ASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTY ADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRG YDWYFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGKAPK TLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYY CQQYDESPWTFGGGKLEIKSGGGGSGALSNSIMYFSHFV PVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRLKIQRKA AITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQGSQSQRW KSKLYSIVCGKSTPEKEGELEGTTKPLAPNPSFSPTPGFTP TLGFSPVPSSTFTSSSTYTPGDCPNFAAPRREVAPPYQGAD PILATALASDPIPPLQKWEDSAHKPQSLDTPATLYAV VENVPPLRWKEFVRRRLGLSDHEIDRLELQNGRCLREAQYS MLATWRRRTPRREATLELLGRVLRDMDLLGCLEDIEEAL CGPAALPPAPSLLR
6	CD5-FcR-TNFR2	MWLQSLLLLGTVACSIQQLVQSGGGLVKPGGSVRISCA ASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTY ADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRG YDWYFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGKAPK TLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYY CQQYDESPWTFGGGKLEIKSGGGGSGALSNSIMYFSHFV PVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRLKIQRKA AITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQGSQSPLC LQREAKVPHLPADKARGTQGPEQQHLLITAPSSSSSSLESS ASALDRRAPTRNQPPAPGVEASGAGEARASTGSSDSSPGG HGTQVNVTCIVNVCSSSDHSSQCSSQASSTMGDTDSSPSE

		SPKDEQVPFSKEECAFRSQLETPETLLGSTEEKPLPLGVDP AGMKPS
7	сигнальный пептид GMCSF	MWLQSLLLLGTVACISIS
8	вариабельный домен тяжелой цепи анти-CD5	EIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQ APGKGLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTFSLDDSKNT AYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDWFYFDVWGQGTTVTV
9	вариабельный домен легкой цепи анти-CD5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPG KAPKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYED FGIYYCQQYDESPWTFGGGKLEIK
10	анти-CD5 scFv	EIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQ APGKGLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTFSLDDSKNT AYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDWFYFDVWGQGTTVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLESGVPSRFSG SGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGKLE EIK
11	анти-CD5 scFv	MWLQSLLLLGTVACISIEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCA ASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTY ADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRG YDWFYFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGKAPK TLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYY CQQYDESPWTFGGGKLEIK
12	вариабельный домен тяжелой цепи анти-HER2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQK PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQHYTTPPTFGQGKVEIKRTGSTSGSGKPGSG EGSEVQLVE
13	вариабельный домен легкой цепи анти-HER2	LVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAE DTAVYYCSRWGGDGFYAMDVWGQGLVTV
14	анти-HER2 scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQK PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQHYTTPPTFGQGKVEIKRTGSTSGSGKPGSG

		EGSEVQLVESSGGGGSGGGGSGGGGSLVQPGGSLRLSCAA SGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADS VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGG DGFYAMDVWGQGTLVTV
15	трансмембранный домен CD8 $\alpha$	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT
16	трансмембранный домен CD8 $\alpha$	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
17	трансмембранный домен CD2	IYLIIGICGGGSLLMVFVALLVFIIT
18	трансмембранный домен CD28	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
19	трансмембранный домен CD68	ILLPLIIGLILLGLLALVLIAFCII
20	шарнирный домен+трансмембранный домен цепи CD8 $\alpha$	ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
21	шарнирный домен+трансмембранный домен цепи CD8 $\alpha$	ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT
22	внутриклеточный сигнальный домен FcR $\gamma$ -цепи	LYCRRLKIQRKAAITSYEKSDGVYTGGLSTRNQETYETLKH EKPPQ
23	внутриклеточный сигнальный домен FcR $\gamma$ -цепи	LYCRLKIQRKAAITSYEKSDGVYTGGLSTRNQETYETLKH EKPPQ
24	внутриклеточный сигнальный домен FcR $\gamma$ -цепи	RLKIQRKAAITSYEKSDGVYTGGLSTRNQETYETLKH EKPPQ

25	внутриклеточный сигнальный домен FcR $\gamma$ -цепи	RLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTG LSTRNQETYETLKHEKP PQ
26	домен рекрутирования PI3K	YEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENM
27	внутриклеточный домен CD40	KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETL HGCQPVTQEDGKESRISVQERQ
28	внутриклеточный домен TNFR1	QRWKSPLYIVCGKSTPEKEGELEGGTTTKPLAPNPSFSPTP GFTPTLGFSPVPSSTFTSSSTYTPGDCPNFAAPRREVAPPYQ GADPILATALASDPIPNPLQKWEDSAHKPQSLDTPATL YAVVENVPPLRWKEFVRRLLGLSDHEIDRLELQNGRCLRE AQYSMLATWRRRTPRREATLELLGRVLRDMDLLGCLEDI EEALCGPAALPPAPSLLR
29	внутриклеточный домен TNFR2	PLCLQREAKVPHLPADKARGTQGPEQQHLLITAPSSSSSSSL ESSASALDRRAPTRNQPPAGVEASGAGEARASTGSSDSS PGGHGTQVNVTCIVNVCSSSDHSSQCSSQASSTMGDTDSS PSESPKDEQVPFSKEECAFRSQLETPETLLGSTEEKPLPLGV PDAGMKPS
30	внутриклеточный домен MDA5	MSNGYSTDENFRYLISCFRARVKMYIQVEPVLDTFLPA EVKEQIQRTVATSGNMQAVELLLSTLEKGVWHLGWTRF VEALRRTGSPLAARYMNPETDLPSPFENAHDEYLQLLN LLQPTLVDKLLVRDVLKCMEEELLTIEDRNRIAAAENNG NESGVRELLKRIVQKENWFS AFLNVL RQTGNNELVQELT GSDCSESNAEIEN
31	внеклеточный связывающий домен анти-CD137	MEFGLSWLFLVAILKGVQCGLDLRQGMFAQLVAQNVL LIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAL ALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTE ARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
32	внеклеточный связывающий домен анти-	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYGMNWVR QAPGQGLEWMGWINTYTG EPTYADAFKGRVTMTTDTST STAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQGT

	CD70	VTVSSGSTSGSGKPGSSEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASN ESGVPDFRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSREV PWTFGQGTKVEIK
33	внечелочный связывающий домен Анти- клаудин 18.2	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGYNWHWIRQ PPGKGLEWIGYIHYTGSTNYNPALRSRVTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARIYNGNSFPYWGQGTTVTVSSGG GGSGGGGGSGGGSDIVMTQSPDSLAYS LGERATINCKSSQ SLFNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD RFSGSGSGTDIFITISLQAEDVAVYYCQNAYSFPYTFGGG TKLEIKR
34	внечелочный связывающий домен анти- TROP2	DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSI A VAWYQQKP GKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKRGGGGSGGGGGSGG GGSQVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTNYGMN WVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLD TSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWFVDVWG QGSLVTVSS
35	внечелочный связывающий домен анти- TROP2	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTNYGMNWVK QAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVS TAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWFVDVWGQGSL VTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVS ITCKASQDVSI A VAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPD RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAG TKVEIKR

[00340] В настоящем документе предложена композиция, содержащая рекомбинантную последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую CFP, содержащую субъединицу фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR) (например, слитый белок фагоцитарного рецептора (PFP)), включающую: субъединицу PR, содержащую: трансмембранный домен и внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и внечелочный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, специфичный к антигену клетки-мишени; где трансмембранный домен и внечелочный домен функционально связаны; и где при связывании CFP с антигеном клетки-мишени активность лизиса или фагоцитоза миелоидных клеток, таких как нейтрофилы, моноциты, миелоидные дендритные клетки (mDC), тучные клетки или макрофаги, экспрессирующие CFP, увеличивается по меньшей

мере 1,1-кратно, 1,5-кратно, 2-кратно, 2,5-кратно, 3-кратно, 3,5-кратно, 4-кратно, 4,5-кратно, 5-кратно, 5,5-кратно, 6-кратно, 6,5-кратно, 7-кратно, 7,5-кратно, 8-кратно, 8,5-кратно, 9-кратно, 9,5-кратно, 10-кратно, 11-кратно, 12-кратно, 13-кратно, 14-кратно, 15-кратно, 16-кратно, 17-кратно, 18-кратно, 19-кратно, 20-кратно, 25-кратно, 30-кратно, 40-кратно, 50-кратно, 75-кратно или 100-кратно по сравнению с клеткой, не экспрессирующей SFP.

### **Связывающий белок и домены CD137**

[00341] В одном аспекте, в настоящем документе предложены рекомбинантные белки, которые могут связываться с CD137 на клетке-мишени. В настоящем документе, такие рекомбинантные белки, способные связывать CD137 на клетке-мишени, называются связующее CD137. В некоторых вариантах осуществления связующие CD137 содержат внеклеточный домен химерного слитого белка (CFP). В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложена последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которая кодирует химерный слитый белок CD137-связывающего рецептора (CFP), называемый CD137-CFP, как используется в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая такой слитый белок химерного рецептора, например, слитый белок CD137-связывающего рецептора, может быть экспрессирована в подходящей клетке, такой как миелоидная клетка. В некоторых вариантах осуществления, при экспрессии CD137-CFP на подходящей клетке, такой как миелоидная клетка, связующее CD137 может связываться с клеткой-мишенью, которая экспрессирует CD137, и миелоидная клетка, экспрессирующая связующее, активируется. В некоторых вариантах осуществления, CD137-CFP при взаимодействии с CD137 активирует внутриклеточный сигнальный домен CD137-CFP, который активирует миелоидную клетку, экспрессирующую рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую CD137-CFP. В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка представляет собой фагоцитирующую клетку. В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка, которая является фагоцитирующей клеткой и экспрессирует связующее CD137, может быть активирована, когда связующее CD137 связывается с CD137, экспрессируемым на другой клетке (клетке-мишени), и фагоцитирует клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень может представлять собой любую клетку, которая экспрессирует CD137. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой Т-лимфоцит (Т-клетку). В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень может быть злокачественной клеткой. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень может представлять собой злокачественную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, связующее CD137 миелоидной клетки, экспрессирующей CFP, можно использовать для создания терапевтической композиции против Т-клеточной лимфомы.

[00342] В настоящем документе предложена рекомбинантная полинуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP),

где белок CFP может связываться с CD137 на Т-лимфоците. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложен CFP, который может связываться с мишенью на Т-клетке, где мишенью является CD137. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетка-мишень представляет собой активированную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, CFP таргетирует активированную Т-клетку, которая экспрессируется при Т-клеточной лимфоме. В настоящем документе предложена рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая CFP, таргетирующий CD137, где CFP содержит: (i) внеклеточный домен, содержащий анти-CD137 связывающий домен, и (ii) трансмембранный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом; и (b) фармацевтически приемлемый носитель; где миелоидная клетка экспрессирует CFP и демонстрирует по меньшей мере 1,1-кратное увеличение фагоцитоза клетки-мишени, экспрессирующей CD137, по сравнению с миелоидной клеткой, не экспрессирующей CFP. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен CD137 представляет собой связывающий белок CD137, который содержит антигенсвязывающий фрагмент антитела, фрагмент Fab, домен scFv или домен sdAb. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен CD137 содержит последовательность лиганда CD137, указанную в SEQ ID NO: 31 или имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 31.

[00343] В настоящем документе предложен рекомбинантный белок, представляющий собой химерный слитый белок, который может связываться с CD137. CD137 представляет собой поверхностный маркер активированных Т-клеток. Таким образом, химерный слитый белок, который может связываться с CD137, может специфически связываться с активированной Т-клеткой, где CFP содержит: (i) внеклеточный домен, содержащий анти-CD137 связывающий домен, и (ii) трансмембранный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен CD137 представляет собой связывающий белок CD137, который содержит антигенсвязывающий фрагмент антитела, фрагмент Fab, домен scFv или домен sdAb. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен CD137 содержит scFv. В настоящем документе предложена миелоидной клетке, экспрессирующая рекомбинантный белок, который представляет собой химерный слитый белок, который может связываться с CD137, экспрессируемым на Т-клетке, где CFP содержит: (i) внеклеточный домен, содержащий анти-CD137 связывающий домен, и (ii) трансмембранный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом; миелоидная клетка способна специфически таргетировать Т-клетку, экспрессирующую CD137, и фагоцитировать, лизировать и, следовательно, лизировать Т-клетку, экспрессирующую CD137. В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка, экспрессирующая рекомбинантный белок, который представляет собой химерный слитый белок, способный связываться с CD137, представляет собой терапевтический агент для CD137+ve рака, такого как Т-клеточная лимфома.

[00344] Как правило, CD137 экспрессируется на активированной иммунной клетке.

CD137 экспрессируется как в врожденных, так и в адаптивных клетках иммунного каскада. У здоровых индивидуумов, Т-клетки могут быть обильными в лимфатических узлах (например, в миндалинах, где Т-клетки находятся в активированном состоянии). CD137<sup>+</sup>ve Т-клетки также являются обильными в опухолях.

[00345] Отмечено, что CD137<sup>+</sup>ve Т-клетки могут быть ответственны за отторжение «трансплантат против хозяина» и «хозяин против трансплантата». В случае аллогенной клеточной терапии, CD137 может быть дополнительно таргетирован на разрушение, чтобы уменьшить отторжение «хозяин против трансплантата». В некоторых вариантах осуществления, способ и композиции, описанные в настоящем документе, включают (i) использование аллогенной миелоидной клетки, экспрессирующей химерный рецептор, который связывается с раковым антигеном и лизировать раковую клетку, экспрессирующую раковый антиген; и (ii) введение миелоидной клетки, которая экспрессирует химерный антиген, который может связываться с CD137 и лизировать CD137<sup>+</sup>ve Т-клетку, тем самым уменьшая уничтожение аллогенной миелоидной клетки CD137<sup>+</sup>ve Т-лимфоцитами хозяина.

[00346] В одном аспекте, в настоящем документе предложен рекомбинантный белок, который представляет собой химерный слитый белок, который может связываться с CD137, и также содержит второй, третий или дополнительный связывающий домен, который связывается со второй, третьей или дополнительными внеклеточными группами, где внеклеточная группа может представлять собой молекулу клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, любой из второго, третьего или дополнительного связывающего домена может содержать связывающий домен для дополнительной молекулы клеточной поверхности на клетке-мишени, например, молекулы клеточной поверхности, отличной от CD137, такой как молекула клеточной поверхности на раковой клетке или активированная Т-клетка. Второй, или третий, или дополнительный связывающий домен может содержать связывающий домен для любой дополнительной молекулы клеточной поверхности на клетке-мишени, такой как CD5, или любого другого антигена на клетке-мишени, описанного где-либо в описании.

[00347] В некоторых вариантах осуществления, любой из второго, третьего или дополнительного связывающих доменов может содержать связывающий домен для молекулы клеточной поверхности на миелоидной клетке. В некоторых вариантах осуществления, любой из второго, или третьего, или дополнительных связывающих доменов, которые содержат связывающий домен для миелоидной клетки, может активировать миелоидную клетку при связывании.

[00348] В некоторых вариантах осуществления, CD137-связывающий белок представляет собой химерный слитый белок, содержащий внеклеточный домен, способный связываться с CD137, и дополнительно содержит шарнирный домен, полученный из CD8, где шарнирный домен функционально связан с трансмембранным доменом на цитоплазматической стороне, и с CD137-связывающим доменом на внеклеточной стороне. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен

содержит последовательность, указанную в любой из последовательностей в SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 или 19. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из трансмембранного домена CD8 альфа (CD8a). В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 15, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из трансмембранного домена CD2. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из трансмембранного домена CD28. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из трансмембранного домена CD68. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 19, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления, ECD CFP содержит аминокислотную последовательность, изображенную в SEQ ID NO: 31, или последовательность, имеющую 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 31, слитый с трансмембранным доменом, выбранным из любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 или 19, или трансмембранным доменом, аминокислотная последовательность которого имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 или 19.

[00349] В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный шарнирный домен и трансмембранный домен содержат последовательность SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21 или имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит

внеклеточный домен, слитый с трансмембранным доменом SEQ ID NO: 20 или имеющим по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, слитый с трансмембранным доменом SEQ ID NO: 21, или имеющим по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит связывающий домен ECD, имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 31, слитый с шарнирным и трансмембранным доменом, имеющим аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20 или 21.

[00350] В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, содержащий последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 31; функционально связанный с доменом TM, содержащим последовательность трансмембранного домена CD16 (например, содержащую короткий шарнирный домен), как указано в таблице 4. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, содержащий последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 31; функционально связанный с доменом TM, содержащим последовательность трансмембранного домена CD64. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, содержащий последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31; функционально связанный с доменом TM, содержащим последовательность трансмембранного домена CD89 (например, содержащий короткий шарнирный домен), как указано в таблице 4. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит ECD с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 31, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 31; домен TM, содержащий последовательность из домена TM белка CD16, или TMD белка CD64, или TMD белка CD89, и соответствующий внутриклеточный домен (ICD) или его часть, например, из белка CD16, белка CD64 или белка CD89, соответственно, необязательно, в дополнение к другим различным ICD, описанным в настоящем документе. Примеры последовательностей ICD CD16 и CD89 представлены в таблице 4.

[00351] В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов, которые содержат внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен фагоцитоза. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный домен фагоцитоза содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из рецептора, отличного от Megf10, MerTk, FcR $\alpha$  и Bai1. В некоторых

вариантах осуществления, сигнальный домен фагоцитоза содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из рецептора, отличного от Megf10, MerTk, FcR и Bai1. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит домен, полученный из рецептора, отличного от CD3ζ. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный домен фагоцитоза содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из FcRγ, FcRα или FcRε.

[00352] В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из белка FcRгамма (цепи FcRγ), содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 22, 23, 24 или 25, или имеющей на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 22, 23, 24 или 25. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов дополнительно содержат провоспалительный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит домен рекрутирования PI3-киназы (PI3K). В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 26 или имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен получен из внутриклеточного сигнального домена CD40. В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 27 или имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен SEQ ID NO: 28 или имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен SEQ ID NO: 29 или имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен SEQ ID NO: 30 или имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 30.

[00353] В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит: (a) внеклеточный домен, содержащий: (i) scFv, который специфически связывает CD137, и (ii) шарнирный домен, полученный из CD8; шарнирный домен, полученный из CD28, или по меньшей мере часть внеклеточного домена из CD68; (b) трансмембранный домен CD8, трансмембранный домен CD28, трансмембранный домен CD2 или трансмембранный домен CD68; и (c) внутриклеточный домен, содержащий по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена, где по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена содержат: (i) первый внутриклеточный сигнальный домен,

полученный из FcR $\alpha$ , FcR $\gamma$  или FcR $\epsilon$ , и (ii) второй внутриклеточный сигнальный домен: (A) содержащий домен рекрутирования PI3K или (B) полученный из CD40. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит в качестве альтернативы (с) вышеизложенному: внутриклеточный домен, содержащий по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена, где по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена содержат: (i) первый внутриклеточный сигнальный домен, полученный из внутриклеточного домена фагоцитарного рецептора, и (ii) второй внутриклеточный сигнальный домен, полученный из внутриклеточного домена скэвенджер-рецептора, фагоцитарного рецептора, содержащий: (A), содержащий домен рекрутирования PI3K, или (B), полученный из CD40. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из внутриклеточного сигнального домена рецептора врожденного иммунитета.

[00354] В некоторых вариантах осуществления, химерный слитый белок может иметь более одного внеклеточного антигенсвязывающего домена.

[00355] В некоторых вариантах осуществления, химерный слитый белок может содержать связывающий домен CD137 и второй связывающий домен для второй молекулы клеточной поверхности, такой как внеклеточный белок или гликопротеин, мембранный белок или гликопротеин, который присутствует на поверхности раковой клетки или клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления, второй связывающий домен связывается с любой описанной в настоящем документе мишенью. В некоторых вариантах осуществления, второй связывающий домен может быть сконструирован таким образом, что второй связывающий домен связывается с белком на внеклеточном матриксе клетки-мишени или соседней клетки. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен может содержать второй связывающий домен, который может связываться с растворимой мишенью, такой как молекула, высвобождаемая во внеклеточное пространство соседней клетки или клетки-мишени.

[00356] В одном аспекте, в настоящем документе предложен химерный слитый белок, который может связываться с CD137 (также известным как 4-1BB) на клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая CFP, который может связываться с CD137, может быть включена в миелоидную клетку, так что миелоидная клетка экспрессирует CD137-связывающий CFP. В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка может представлять собой CD14+ клетку. В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка может представлять собой CD14+/CD16-. В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка может представлять собой CD14+/CD16low. Миелоидную клетку, связывающую CD137, экспрессирующую CFP, можно использовать различными способами, либо отдельно; или в комбинации с другими экспрессирующими CFP миелоидными клетками в терапевтической композиции; или отдельно, по комбинированной терапевтической схеме; и может использоваться отдельно или в комбинации с другими терапевтическими агентами, включающими другие нуклеиновые кислоты, пептиды, белки или

низкомолекулярные терапевтические агенты.

[00357] CD137 является членом 9 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF9) и экспрессируется на поверхности некоторых иммунных клеток. CD137 представляет собой белок клеточной поверхности, который экспрессируется на активированных Т-клетках. Взаимодействие CD137 с его лигандом (CD137L, также известным как TNFSF9 или 4-1BBL) на активированных антигенпрезентирующих клетках (APC) может привести к двунаправленной активации, которая способствует иммунитету против рака. Например, было показано, что сигналы через CD137 рецептор могут приводить к активации и выживанию Т-клеток. И наоборот, задействованный CD137L может воздействовать на экспрессирующие его клетки, такие как миелоидные клетки, дендритные клетки, приводя к их активации и созреванию. Использование агонистических антител к CD137, таких как урелумаб и утомилумаб, рассматривается как перспективный иммунотерапевтический подход к лечению различных типов опухолей. В некоторых вариантах осуществления, CFP, содержащий CD137L, может экспрессироваться в миелоидных клетках и использоваться для противоопухолевой терапии, передача сигналов CD137L в моноциты индуцирует их дифференциацию в CD137L-DC. CD137L-DC преимущественно индуцируют поляризацию Т-хелперов (Th1) 1 типа и сильные ответы CD8<sup>+</sup> Т-клеток 1 типа (Tc1) против опухоли.

[00358] Агонистические антитела к CD137 или их CD137-связывающие области можно использовать для конструирования CFP для активации иммунного ответа *in vivo*. Альтернативно, CD137L или его фрагменты можно использовать для конструирования CFP для активации иммунного ответа *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, CD137-связывающий CFP, содержащий антитело-агонист CD137 или его фрагмент, или CD137L в качестве внеклеточного домена, можно использовать для активации иммунного ответа или в качестве противоопухолевого агента. В настоящем документе предложен химерный слитый белок, содержащий внеклеточный домен, связывающий CD137, который содержит CD137 агонистическое антитело или его фрагмент, где антитело может представлять собой scFv, биспецифическое антитело, Fab, Fab фрагменты, F(ab')<sub>2</sub> фрагменты, моновалентное антитело, scFv фрагменты, scRv-Fc фрагменты, IgNAR, hcIgG, V<sub>HH</sub> антитела, нанотела и альфатела. В некоторых вариантах осуществления, CD137 агонистическое антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело или его фрагменты. В некоторых вариантах осуществления, CD137 агонистическое антитело представляет собой урелумаб или его фрагменты. В настоящем документе предложена конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный слитый белок, который содержит CD137-связывающий внеклеточный домен, содержащий CD137 агонистическое антитело или его фрагмент, где антитело может представлять собой scFv, биспецифическое антитело, Fab, Fab фрагменты, F(ab')<sub>2</sub> фрагменты, моновалентное антитело, scFv фрагменты, scRv-Fc фрагменты, IgNAR, hcIgG, V<sub>HH</sub> антитела, нанотела и альфатела. В настоящем документе предложен химерный слитый белок, который содержит CD137-связывающий внеклеточный домен, содержащий

CD137L или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, терапевтическая клетка может быть получена путем экспрессии полноразмерного белка CD137L, который может быть экспрессирован в клетке, такой как миелоидная клетка, так что миелоидная клетка связывается и активирует лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления, терапевтическую клетку можно получить путем конструирования и экспрессии CFP, который экспрессирует по меньшей мере внеклеточный фрагмент CD137L. В некоторых вариантах осуществления, CFP, содержащий внеклеточный CD137L в качестве CD137-связывающего домена, может дополнительно содержать внутриклеточный домен CD137L. CFP, описанный в параграфе, можно использовать в любых терапевтических целях для стимуляции иммунного ответа при введении субъекту либо в виде терапевтической клетки, экспрессирующей CFP, либо в виде конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей CFP, где конструкцию нуклеиновой кислоты вводят таким образом, чтобы она поглощается клеткой *in vivo*, и клетка экспрессирует CFP. В некоторых вариантах осуществления, вводимая конструкция нуклеиновой кислоты может содержать таргетную группу для таргетирования и захвата конкретным типом клеток или тканью. В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты может кодировать внеклеточный белок, содержащий CD137-связывающий домен, такой как растворимый внеклеточный белок. В некоторых вариантах осуществления, CFP, содержащий CD137-связывающий домен, может быть растворимым внеклеточным белком и может функционировать как иммуностимулирующий белок-агонист CD137, тем самым активируя лимфоциты при введении и экспрессии *in vivo* у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, химерный слитый белок представляет собой рецепторный белок. Соответственно, рецептор CFP, содержащий CD137-связывающий внеклеточный домен, содержит трансмембранный домен и может необязательно содержать внутриклеточный домен. Клетка, экспрессирующая слитый белок, имеющий домен, связывающий агонист CD137, и/или трансмембранный домен, может активировать Т-лимфоциты и может быть использована для активации противоопухолевого ответа *in vivo*.

[00359] В некоторых вариантах осуществления, CD137-связывающий слитый белок может быть сконструирован и экспрессирован в миелоидной клетке, такой как DC-клетка, для получения DC-вакцины, такой как противораковая DC-вакцина. В настоящем документе предложена миелоидной клетке (например, DC), экспрессирующая CFP, содержащий внеклеточный домен, который содержит CD137-связывающий лиганд, такой как CD137L человека или его связывающий фрагмент.

[00360] Однако CD137 может таргетировать CD137+ve раки, такие как Т-клеточные лимфомы. Таргетирующие CD137 миелоидные клетки, сконструированные для экспрессии химерных слитых белков, связывающих CD137, как описано в настоящем документе, могут действовать как сильнодействующие, безопасные и эффективные противоопухолевые агенты в опухолях CD137+ и могут использоваться в адоптивной клеточной терапии при Т-клеточной лимфоме, а также при других видах рака, таких как рак легкого, поджелудочной железы, лейкоцитарный и другие виды рака.

[00361] В некоторых вариантах осуществления, описанный в настоящем документе химерный слитый белок таргетирует связывание с рецептором CD137 на лимфоцитах и NK-клетках. При экспрессии в подходящей миелоидной клетке может быть получена миелоидной клетке-киллер, дополнительно путем выращивания клетки в подходящих условиях культивирования в течение ограниченного периода времени и развития клетки *ex vivo* в качестве терапевтического агента. Миелоидная клетка-киллер, описанная в настоящем документе, экспрессирующая CD137-связывающий CFP, может быть использована для терапии у субъекта со злокачественным новообразованием из клеток CD137 или с возможным заболеванием или состоянием, возникающим из-за функции клеток CD137.

[00362] В некоторых вариантах осуществления, химерный слитый белок, описанный в настоящем документе, представляет собой терапевтический агент, который можно вводить в форме конструкции нуклеиновой кислоты в терапевтической композиции, так что, когда подходящая клетка *in vivo* поглощает нуклеиновую кислоту, химерный слитый белок экспрессируется клеткой *in vivo*, и клетка может связываться с клеткой, экспрессирующей CD137 *in vivo*. Дополнительные домены в CD137-связывающем слитом белке CFP (например, внутриклеточные сигнальные домены) могут сделать клетку, в которой экспрессируется белок, мощной цитотоксической клеткой, например, клеткой с повышенной фагоцитарной активностью, тем самым делая клетку, экспрессирующую белок, «атакующей клеткой» или клеткой-киллером, таргетирующей разрушение клетки, экспрессирующей CD137, такой как лимфоцит или NK-клетка.

[00363] В некоторых вариантах осуществления, CD137-связывающий химерный слитый белок может содержать гетерологичный трансмембранный домен и/или один или несколько гетерологичных внутриклеточных доменов и может быть экспрессирован в подходящей клетке, такой как миелоидная клетка, для получения мощной иммунореактивной клетки. В некоторых вариантах осуществления, связывание CFP, имеющего CD137-связывающее, активирует внутриклеточные домены химерного слитого белка (рецептора), что активирует фагоцитарный ответ, воспалительный ответ и/или цитотоксический ответ в клетке, которая экспрессирует CFP, так что CFP-экспрессирующая клетка разрушает клетку-мишень, экспрессирующую CD137. Примерами клеток-мишеней, экспрессирующих CD137, могут быть лимфоциты, такие как T-лимфоциты или NK-клетки, такие как CD137+ve-клеточный рак, например, рак легкого, лейкоз, рак поджелудочной железы, колоректальный рак и лимфома.

[00364] В некоторых вариантах осуществления, CD137-связывающий CFP может экспрессироваться в подходящей клетке (например, миелоидной клетке), так что CD137-экспрессирующая клетка может действовать как регулятор иммунного ответа путем связывания и уничтожения активированных CD137+ лимфоцитов. В таких вариантах осуществления, CFP, таргетирующий CD137, используется терапевтически для снижения активированного иммунного ответа, такого как аллогенный иммунный ответ.

[00365] В некоторых вариантах осуществления, клетка-киллер, такая как активная

фагоцитарная клетка, сконструированная для экспрессии анти-CD137 внеклеточной группы, может использоваться в качестве дополнительной терапии к нескольким иммунотерапиям на основе не аутологичных клеток. Такую комбинированную терапию можно применять при большом количестве видов рака, включая, но не ограничиваясь ими, меланому, глиобластоме, саркому, почечно-клеточную карциному, рак яичников, рак легких, рак поджелудочной железы, рак молочной железы и многие другие.

[00366] В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты CFP, таргетирующего CD137, может быть включена в миелоидную клетку для экспрессии CFP, и миелоидная клетка, экспрессирующая CD137-связывающий CFP, может использоваться в качестве хелперной клетки в CAR-P (например, фагоцитарная клетка, экспрессирующая CAR или CFP) или CAR-T (Т-клетка, экспрессирующая CAR) терапии, где клетка, экспрессирующая CAR, таргетирует раковый антиген, отличный от CD137, такой как CD5, CD19, CD40 и т. д., так что клетка, экспрессирующая CD137 CFP, снижает или устраняет лимфоциты-супрессоры опухолей, экспрессирующих CD137, усиливая противоопухолевые функции клетки, экспрессирующей CAR, таргетирующей рак (CAR-P или CAR-T). Таким образом, CD137-связывающий CFP можно использовать для разработки хелперных клеток для совместного введения в любой адоптивной клеточной терапии, где хелперная клетка представляет собой цитотоксическую клетку, в которую встроена конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая CD137-связывающий CFP, и клетка экспрессирует CD137-связывающий внеклеточный домен CFP. Клетка, экспрессирующая CD137-связывающий CFP, может быть миелоидной клеткой. Клетка, экспрессирующая CD137-связывающий CFP, может представлять собой фагоцитирующую миелоидную клетку. Клетка, экспрессирующая CD137-связывающий CFP, может представлять собой лимфоидную клетку. Клетка, экспрессирующая CD137-связывающий CFP, может представлять собой цитотоксическую клетку.

[00367] В некоторых вариантах осуществления, CD137-связывающий CFP может экспрессироваться в подходящей клетке (например, миелоидной клетке), так что CD137-экспрессирующая клетка может действовать как регулятор иммунного ответа, например, в ответ на аллогенную клеточную терапию, болезнь «хозяин против трансплантата» или аутоиммунное заболевание или состояние. Например, CD137-связывающий CFP можно использовать в сочетании с CAR-P или CAR-T терапией, где CAR-P или CAR-T представляет собой аллогенную клетку, таргетирующую больную клетку, такую как раковая клетка, экспрессирующая раковый антиген, отличный от CD137, такой как CD5, CD19, CD40. В некоторых вариантах осуществления, CD137-связывающий CFP можно использовать для разработки хелперных клеток для совместного введения в любой адоптивной клеточной терапии, где хелперная клетка представляет собой цитотоксическую клетку, которая содержит CD137-связывающий CFP и экспрессирует внеклеточный домен CD137-связывающий CFP. Клетка, экспрессирующая CD137-связывающий CFP, может быть миелоидной клеткой. Клетка, экспрессирующая CD137-связывающий CFP, может представлять собой фагоцитирующую миелоидную клетку.

Клетка, экспрессирующая CD137-связывающий CFP, может представлять собой лимфоидную клетку. Клетка, экспрессирующая CD137-связывающий CFP, может представлять собой цитотоксическую клетку.

[00368] В некоторых вариантах осуществления, CD137-таргетный CFP может экспрессироваться в миелоидной клетке и использоваться в сочетании с CART терапией, где CART клетка может быть аллогенной или аутогенной. В некоторых вариантах осуществления, CD137-таргетный CFP может экспрессироваться в миелоидной клетке и использоваться в сочетании с CART терапией, таргетирующей раковую клетку, отличную от клетки CD137+, где CART клетка может быть аллогенной или аутогенной. В некоторых вариантах осуществления, CD137-таргетный CFP может быть экспрессирован в миелоидной клетке и использоваться в сочетании с CART терапией, где CART клетка и/или миелоидная клетка могут быть аллогенными или аутогенными. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CD137-таргетный CFP, может быть аллогенной или аутогенной по отношению к субъекту, которому эту клетку вводят в качестве терапии.

[00369] В некоторых вариантах осуществления, CD137-таргетный CFP может содержать внеклеточный CD137-связывающий домен, состоящий из антитела-агониста CD137 или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный CD137-связывающий домен, содержащий антитело-агонист против CD137 или его фрагмент, может содержать scFv, VHH, диатело, биспецифическое антитело или лиганд CD137 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, CD137-таргетный CFP может дополнительно содержать трансмембранный домен (TMD), полученный из трансмембранных доменов CD3 $\zeta$ , CD2, CD8 $\alpha$ , CD28, CD68, Fc $\gamma$ R, FcG, FcR-гамма, FcR-альфа или любых других подходящих доменов. В некоторых вариантах осуществления, CD137-таргетный CFP, описанный выше, может дополнительно содержать внутриклеточный домен, содержащий один или несколько доменов передачи сигнала. В некоторых вариантах осуществления, CD137-таргетный CFP может содержать внутриклеточный домен, полученный из домена рекрутирования PI3K, внутриклеточный сигнальный домен скэвенджер-рецептора, внутриклеточный домен CD40, сигнальный домен, полученный из FcR, внутриклеточный домен TLR, внутриклеточный домен NLRP3, внутриклеточный домен, полученный из CD3, и другие. Настоящее описание в Таблицах 1 и 4 демонстрирует информацию о последовательностях для различных отдельных доменов, описанных в настоящем документе в различных вариантах осуществления, и предполагается, что в рамках описания, различные комбинации одного и того же могут быть включены в единую биомолекулу для разработки химерного слитого белка, используя информацию о последовательности в таблицах 1 и 4 и используя методы молекулярной биологии, известные в данной области техники.

[00370] В некоторых вариантах осуществления, химерный слитый белок (CFP) содержит внеклеточный домен (ECD), таргетирующий связывание с CD137, который может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 или

последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 31.

MEFGLSWLFLVAILKGVQCGLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA  
GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA  
GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGA  
TVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE (SEQ ID NO: 31).

[00371] В одном аспекте, химерный слитый белок может содержать растворимый белок, имеющий связывающий домен, который связывается с CD137. В одном варианте осуществления, химерный слитый белок может содержать растворимый белок, имеющий по меньшей мере один связывающий домен, который связывается с CD137, и один или несколько дополнительных связывающих доменов, по меньшей мере один из которых связывается с молекулой клеточной поверхности миелоидной клетки. В некоторых вариантах осуществления, химерный слитый белок содержит связывающий домен, который может связывать CD137, и связывающий домен, который может связываться с молекулой клеточной поверхности на миелоидной клетке. В некоторых вариантах осуществления, химерный слитый белок содержит связывающий домен, который может связывать CD137, и связывающий домен, который может связываться с молекулой клеточной поверхности на миелоидной клетке. В некоторых вариантах осуществления, CFP также содержит третий или любое количество дополнительных связывающих доменов, которые связываются с третьей или дополнительными внеклеточными группами, где внеклеточная группа может представлять собой молекулу клеточной поверхности или растворимый компонент во внеклеточной среде. В некоторых вариантах осуществления, химерный слитый белок, описанный в настоящем документе, может быть назван биспецифическим рекрутером (например, биспецифическим рекрутером миелоидных клеток, BiME), где биспецифический рекрутер содержит две «рекрутирующие» группы, где рекрутирующие группы представляют собой связывающие домены для двух разных мишеней, где первый связывающий домен связывается, например, с CD137 на любой клетке CD137+, например, на активированной Т-клетке, активированной НК-клетке или раковой клетке, и где второй связывающий домен связывает поверхностную молекулу на миелоидной клетке. В некоторых аспектах, химерный слитый белок, описанный в настоящем документе, называется триспецифическим рекрутером (триспецифическим рекрутером миелоидных клеток, TRiME), где триспецифический рекрутер содержит три рекрутирующие группы, которые представляют собой связывающие домены для трех разных мишеней, где первый связывающий домен связывает, например, CD137 на любой клетке CD137+, такой как активированная Т-клетка, активированная НК-клетка или раковая клетка, экспрессирующая CD137, и где второй связывающий домен связывает молекулу клеточной поверхности на миелоидной клетке, и третий связывающий домен связывается с третьим элементом, где третий элемент может представлять собой другую молекулу клеточной поверхности, отличную от CD137, или молекулу клеточной поверхности миелоидной клетки, с которой связывается второй связывающий домен. В

некоторых вариантах осуществления, третий связывающий домен связывается с молекулой клеточной поверхности, отличной от CD137, на клетке CD137+. В некоторых вариантах осуществления, третий связывающий домен связывается с молекулой клеточной поверхности миелоидной клетки и связывается с молекулой, отличной от той, с которой связывается второй связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления, ViME или TriME сопоставляют клетку-мишень с миелоидной клеткой, так что миелоидная клетка может атаковать, фагоцитировать и лизировать клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления, взаимодействие ViME или TRiME с миелоидной клеткой может не только сблизить миелоидную клетку и клетку-мишень, но также активировать миелоидную клетку для эффективного взаимодействия и уничтожения клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления, второй и/или третий связывающий домен, описанные в настоящем документе, активируют миелоидную клетку при связывании. В некоторых вариантах осуществления, ViME или TriME представляет собой секретируемый слитый белок. В некоторых вариантах осуществления, рекрутер или любой связывающий домен, описанный в настоящем документе, может представлять собой антигенсвязывающий фрагмент (Fab), одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), нанотело,  $V_H$  домен,  $V_L$  домен, однодоменное антитело (sdAb), VNAR домен и  $V_{HH}$  домен, биспецифическое антитело, диатело или функциональный фрагмент любого из них. В некоторых вариантах осуществления, рекрутер может представлять собой лиганд, такой как лиганд CD137 (SEQ ID NO: 31), или его фрагмент, который связывается с CD137.

[00372] В некоторых вариантах осуществления, CFP, содержащий связывающий домен, способный связываться с CD137 на опухолевой клетке, сконструирован для использования в противоопухолевой активности. Рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, содержащий связывающий домен, способный связываться с CD137, экспрессируется в миелоидной клетке, где химерный слитый белок представляет собой трансмембранный белок, и миелоидная клетка представляет собой фагоцитирующую клетку; при взаимодействии CFP с CD137-мишенью, экспрессируемой на клетке, например, опухолевой клетке, миелоидная клетка активируется, фагоцитирует и лизирует клетку-мишень, т.е. опухолевую клетку, и тем самым замедляет или останавливает рост опухоли, уменьшает размер опухоли и/или устраняет опухоль.

[00373] В некоторых вариантах осуществления, CFP, содержащий связывающий домен, способный связываться с CD137 на активированной клетке, экспрессирующей CD137, сконструирован для применения при иммунодепрессии, например, для лечения болезни «хозяин против трансплантата» (HVGd) или состояния, связанного с аллогенной реакцией, или острого или устойчивого тяжелого воспаления. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CD137, представляет собой активированную Т-клетку или НК-клетку. В некоторых вариантах осуществления, лиганд CD137 или его фрагмент на внеклеточном домене CFP, экспрессированном в миелоидной клетке, активирует миелоидную клетку при связывании с CD137 на активированной Т-клетке или

НК-клетке, активирует фагоцитоз и лизует активированную Т-клетку или НК-клетку и уменьшает воспаление.

[00374] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе описан терапевтический агент, такой как фармацевтическая композиция, где фармацевтическая композиция может содержать: (i) CFP, содержащий связывающий домен, способный связываться с CD137; (ii) рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую CFP, содержащую связывающий домен, способный связываться с CD137; или (iii) клетку, экспрессирующую CFP, содержащую связывающий домен, способный связываться с CD137.

[00375] В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент, такой как фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, содержащая CFP, содержащий связывающий домен, способный связываться с CD137; рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую CFP, содержащую связывающий домен, способный связываться с CD137; или клетку, экспрессирующую CFP, содержащую связывающий домен, способный связываться с CD137, можно использовать в комбинации с (i) одним или несколькими дополнительными CFP; или (ii) рекомбинантной нуклеиновой кислотой, кодирующей один или несколько дополнительных CFP; или (iii) клеткой, экспрессирующей один или несколько дополнительных CFP, соответственно, или любой их комбинацией. В качестве одного из примеров вышеизложенного, в настоящем документе может быть описана фармацевтическая композиция, содержащая миелоидные клетки, экспрессирующие CFP, содержащие связывающий домен, способный связываться с CD137, которая может быть использована в комбинации с миелоидными клетками, экспрессирующими CFP, содержащими связывающий домен, способный связываться с CD5, или любой другой связывающий домен, описанный где-либо в описании. Аналогично, любые комбинации композиций, описанных в настоящем документе, рассматриваются как комбинируемые или смешиваемые в терапевтическом агенте, и они будут входить в объем описания.

#### **Связывающие белки и домены CD70**

[00376] CD70 может экспрессироваться на высоком уровне при некоторых видах рака, включая, но не ограничиваясь ими, колоректальный рак (CRC), рак легких, Т-клеточную лимфому, глиому, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак желудка, печени, поджелудочной железы, уротелиальный рак, рак яичников, и меланому. В настоящем документе предложены химерные слитые белки, которые могут связываться с CD70 на раковой клетке и сконструированы для терапевтического применения против заболевания, связанного со сверхэкспрессией CD70, такого как рак.

[00377] В одном аспекте, в настоящем документе предложен химерный слитый белок, имеющий внеклеточный связывающий домен, который может связываться с CD70 (CD70-связывающий CFP). В некоторых вариантах осуществления, CD70-связывающий CFP может содержать внеклеточный связывающий домен, имеющий аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 32** или последовательность, которая по меньшей мере на

80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 32. CD70-связывающий домен может включать антигенсвязывающий фрагмент (Fab), одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), нанотело, V<sub>H</sub> домен, V<sub>L</sub> домен, однодоменное антитело (sdAb), VNAR домен и V<sub>HH</sub> домен, биспецифическое антитело, диатело или функциональный фрагмент любого из них.

[00378] В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен дополнительно содержит шарнирный домен, полученный из CD8, где шарнирный домен функционально связан с трансмембранным доменом на цитоплазматической стороне и с CD70-связывающим доменом на внеклеточной стороне. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в любой из последовательностей в SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 или 19. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из трансмембранного домена CD8 альфа (CD8a). В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 15, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из трансмембранного домена CD2. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из трансмембранного домена CD28. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из трансмембранного домена CD68. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 19, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления, ECD CFP содержит аминокислотную последовательность, изображенную в SEQ ID NO: 32, или последовательность, которая имеет 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 32, слитую с трансмембранным доменом,

выбранным из любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 или 19, или трансмембранным доменом, аминокислотная последовательность которого имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 или 19.

[00379] В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный шарнирный домен и трансмембранный домен содержат последовательность SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21 или имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, слитый с трансмембранным доменом SEQ ID NO: 20 или имеющим по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, слитый с трансмембранным доменом SEQ ID NO: 21, или имеющим по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит связывающий домен ECD, имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 32, слитый с шарнирным и трансмембранным доменом, имеющим аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20 или 21.

[00380] В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, содержащий последовательность, указанную в SEQ ID NO: 32, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 32; функционально связанный с доменом TM, содержащим последовательность трансмембранного домена CD16 (например, содержащую короткий шарнирный домен), как указано в таблице 4. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, содержащий последовательность, указанную в SEQ ID NO: 32, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 32; функционально связанный с доменом TM, содержащим последовательность трансмембранного домена CD64. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, содержащий последовательность, указанную в SEQ ID NO: 32; функционально связанный с доменом TM, содержащим последовательность трансмембранного домена CD89 (например, содержащий короткий шарнирный домен), как указано в таблице 4. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит ECD с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 32, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 32; домен TM, содержащий последовательность домена TM белка CD16, или TMD белка CD64, или TMD белка CD89, и соответствующий внутриклеточный домен (ICD) или его часть, например, из белка CD16, белка CD64 или

белка CD89, соответственно, необязательно, в дополнение к другим различным ICD, описанным в настоящем документе. Примеры последовательностей ICD CD16 и CD89 представлены в таблице 4.

[00381] В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов, которые содержат внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен фагоцитоза. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный домен фагоцитоза содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из рецептора, отличного от Megf10, MerTk, FcR $\alpha$  и Bai1. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный домен фагоцитоза содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из рецептора, отличного от Megf10, MerTk, FcR и Bai1. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит домен, полученный из рецептора, отличного от CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления, сигнальный домен фагоцитоза содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из FcR $\gamma$ , FcR $\alpha$  или FcR $\epsilon$ .

[00382] В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из белка FcRгамма (цепи FcR $\gamma$ ), содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 22, 23, 24 или 25, или последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 22, 23, 24 или 25. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов дополнительно содержат провоспалительный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит домен рекрутирования PI3-киназы (PI3K). В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 26 или имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен происходит из внутриклеточного сигнального домена CD40. В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 27 или имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен SEQ ID NO: 28 или имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен SEQ ID NO: 29 или имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен SEQ ID

NO: 30 или имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 30.

[00383] В настоящем документе предложена рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая CFP, содержащий CD70-связывающий домен (CD70 связующее), как описано выше, который может экспрессироваться в подходящей клетке, такой как миелоидная клетка. Миелоидная клетка может быть фагоцитирующей клеткой. В некоторых вариантах осуществления, CD70 связующее при связывании CD70 с клеткой активирует миелоидную клетку, экспрессирующую CD70-связывающий CFP. В настоящем документе предложена последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которая кодирует слитый белок химерного CD70-связывающего рецептора (CFP), называемый CD70-CFP, как используется в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая такой слитый белок химерного рецептора, например слитый белок CD70-связывающего рецептора, может быть экспрессирована в подходящей клетке, такой как миелоидная клетка. В некоторых вариантах осуществления, CD70-CFP при экспрессии на подходящей клетке, такой как миелоидная клетка, CD70 связующее может связываться с клеткой-мишенью, которая экспрессирует CD70, и активируется миелоидная клетка, экспрессирующая связующее. В некоторых вариантах осуществления, CD70-CFP при взаимодействии с CD70 активирует внутриклеточный сигнальный домен CD70-CFP, который активирует миелоидную клетку, экспрессирующую рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую CD70-CFP. В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка представляет собой фагоцитирующую клетку. В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка, которая является фагоцитирующей клеткой и экспрессирует CD70 связующее, может быть активирована, когда CD70 связующее связывается с CD70, экспрессируемым на другой клетке (клетке-мишени), и фагоцитирует клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень может представлять собой любую клетку, которая экспрессирует CD70. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой Т-лимфоцит (Т-клетку). В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень может быть злокачественной клеткой. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень может представлять собой злокачественную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, миелоидную клетку, экспрессирующую CD70-связывающий CFP, можно использовать для создания терапевтической композиции против Т-клеточной лимфомы.

[00384] В другом варианте осуществления, в настоящем документе предложен рекомбинантный белок, такой как внеклеточный белок, такой как растворимый белок, который может связываться с внеклеточным доменом CD70. В некоторых вариантах осуществления, химерный слитый белок, такой как растворимый белок, описанный в настоящем документе, может быть назван биспецифическим рекрутером (например, биспецифическим рекрутером миелоидных клеток, BiME), где биспецифический рекрутер

содержит две «рекрутирующие» группы, где рекрутирующие группы представляют собой связывающие домены для двух разных мишеней, где первый связывающий домен связывается, например, с CD70 на любой клетке CD70+, например, на активированной Т-клетке, активированной НК-клетке или раковой клетке, и где второй связывающий домен связывает поверхностную молекулу на миелоидной клетке. В некоторых аспектах, химерный слитый белок, описанный в настоящем документе, называется триспецифическим рекрутером (триспецифическим рекрутером миелоидных клеток, TRiME), где триспецифический рекрутер содержит три рекрутирующих группы, которые представляют собой связывающие домены для трех разных мишеней, где первый связывающий домен связывает CD70. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный внеклеточный белок (BiME или TRiME), имеющий домен, который может связываться с CD70, дополнительно содержит второй домен, который может связываться с поверхностным белком миелоидной клетки, такой как фагоцитарная клетка. Поверхностным белком миелоидной клетки может быть белок, экспрессируемый на мембране миелоидной клетки, например, фагоцитарный рецептор, молекула распознавания образов или скэвнджер-рецептор. В настоящем документе предложена рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая внеклеточный белок, такой как растворимый белок, который может связываться с внеклеточным доменом CD70, как описано в настоящем документе.

[00385] В настоящем документе предложен терапевтический агент для лечения заболевания у субъекта, где заболевание связано со сверхэкспрессией белка CD70, где терапевтический агент включает по меньшей мере рекомбинантный белок, имеющий внеклеточный связывающий домен, который может связываться с CD70, такой как любой из CD70-связывающих белков, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложена клетка, которая экспрессирует CD70-связывающий белок. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложен терапевтический агент для лечения заболевания у субъекта, где заболевание связано со сверхэкспрессией CD70, где терапевтический агент содержит по меньшей мере рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую CD70 связующее, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложен терапевтический агент для лечения заболевания у субъекта, где заболевание связано со сверхэкспрессией белка CD70, где терапевтический агент содержит клетку, содержащую рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую CD70 связующее, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой миелоидную клетку. В некоторых вариантах осуществления, заболевание представляет собой рак, например, Т-клеточную лимфому или колоректальный рак (CRC).

[00386] Типовая последовательность CD70 связующего представляет собой SEQ ID NO: 32:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWI

NTYTGEPTYADAFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYGDYGM DY  
 WGQGTTVTVSSGSTSGSGKPGSSEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVST  
 SGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY  
 YCQHSREVPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 32)

[00387] В некоторых вариантах осуществления, химерный слитый белок (CFP) содержит внеклеточный домен (ECD), таргетирующий связывание с CD70, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32 или последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 32.

### **Белки и домены, связывающие Клаудин 18.2 и Клаудин 3**

[00388] Белки семейства Клаудинов являются компонентами плотных клеточных соединений и создают трансклеточный барьер, который контролирует поток молекул между клетками. Трансмембранные домены Клаудинов включают N-конец и C-конец в цитоплазме. Белки Клаудины демонстрируют тканеспецифическую экспрессию, и их измененная функция часто связана с раком конкретных тканей. Было показано, что экспрессия Клаудина-1 имеет прогностическое значение при раке толстой кишки. Клаудин-1 является сильным прогностическим показателем при раке толстой кишки II стадии, и Клаудин-18 является сильным прогностическим показателем при раке желудка. Подавление гена Клаудина-18 было продемонстрировано с помощью серийного анализа данных анализа экспрессии генов при раке желудка с кишечным фенотипом, и подавление Клаудина-10 было продемонстрировано при гепатоцеллюлярной карциноме. Клаудины, будучи поверхностными белками, представляют собой полезную мишень для различных терапевтических стратегий.

[00389] Изоформа 2 Клаудина 18 (Клаудин 18.2) представляет собой высокоселективный маркер клеточного происхождения. Вариант 2 сплайсинга Клаудина-18 представляет собой панраковую мишень, подходящую для разработки терапевтических антител, и демонстрирует сильно ограниченный паттерн экспрессии в нормальных тканях с частой эктопической активацией при различных видах рака человека, включая рак желудка, рак яичников и рак поджелудочной железы.

[00390] Клаудин-3 экспрессируется в плотных соединениях и, как показано, регулируется во время онкогенеза в ряде органов и тканей, таких как молочная железа, яичники, матка, предстательная железа и пищевод. Сверхэкспрессия Клаудина 3 увеличивает резистентность эпителия, измеряемую параклеточной резистентностью, тогда как трансклеточная резистентность существенно не изменяется. Сверхэкспрессия Клаудина-3 приводит к снижению проницаемости как для натрия, так и для хлорида, и экспрессия молекулы Клаудина 3 повышена во многих раковых тканях, таких как ткани рака яичников, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака матки, рака печени, рака легких, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака мочевого пузыря и рака толстой кишки. Было показано, что экспрессия Клаудина 3 и Клаудина 4 особенно повышена при резистентном к химиотерапии раке матки. Клаудин 3 представляет собой

белок с четырьмя трансмембранными областями и имеет структуру, которая выставляет две пептидные петли наружу из клетки.

[00391] В одном аспекте, в настоящем документе предложен химерный слитый белок, имеющий внеклеточный связывающий домен, который может связываться с Клаудином 18.2 (Клаудин 18.2-связывающий CFP).

[00392] В другом аспекте, в настоящем документе предложен химерный слитый белок, который имеет внеклеточный связывающий домен, который может связываться с Клаудином 3.0.

[00393] В одном варианте осуществления, внеклеточный связывающий домен содержит scFv, специфичный к Клаудину 18.2 человека, или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, ECD химерного слитого рецепторного белка содержит связывающий домен, который связывается с внеклеточной петлей Клаудина 18.2 на клетке-мишени.

[00394] В некоторых вариантах осуществления, типовой связывающий домен Клаудина 18.2 может содержать последовательность **SEQ ID NO: 33**; или последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 33.

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGYNWHWIRQPPGKGLEWIGYIHYT  
GSTNYPALRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARIYNGNSFPYWGQGTTV  
TVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAYSLSGERATINCKSSQSLFNSGNQKNYLT  
WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDIFITISLQAEDVAVYYCQNAYSF  
PYTFGGGTKLEIKR (**SEQ ID NO: 33**)

[00395] В некоторых вариантах осуществления, химерный слитый белок (CFP) содержит внеклеточный домен (ECD), таргетирующий связывание с Клаудином 18.2, содержащий аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 33** или последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 33.

[00396] В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, содержащий последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 33**, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную **SEQ ID NO: 33**; функционально связанный с доменом TM, содержащим последовательность трансмембранного домена CD16 (например, содержащую короткий шарнирный домен), как указано в таблице 4. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, содержащий последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 33**, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную **SEQ ID NO: 33**; функционально связанный с доменом TM, содержащим последовательность трансмембранного домена CD64. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, содержащий последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 33**; функционально связанный с доменом TM, содержащим последовательность трансмембранного домена CD89 (например, содержащим короткий шарнирный домен),

как указано в таблице 4. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит ECD с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 33, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 33; домен TM, содержащий последовательность из домена TM белка CD16, или TMD белка CD64, или TMD белка CD89, и соответствующий внутриклеточный домен (ICD) или его часть, например, из белка CD16, белка CD64 или белка CD89, соответственно, необязательно, в дополнение к другим различным ICD, описанным в настоящем документе. Примеры последовательностей ICD CD16 и CD89 представлены в таблице 4.

[00397] В одном варианте осуществления, внеклеточный связывающий домен содержит scFv, специфичный к Клаудину 3.0 человека. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный связывающий домен содержит связывающий домен Клаудина 3, содержащий последовательность, показанную в таблице 2. В таблице 2 показаны типовые последовательности связывающих доменов Клаудина 3.0 человека и/или их фрагментов, которые не ограничивают объем настоящего изобретения.

ТАБЛИЦА 2

Домен	Последовательность	Домен	Последовательность
1HC- CDR1	GYTMN	1LC- CDR1	KSSQSLLYGGSNQKNYL
1HC- CDR2	LINPYNGGTSYNQKFKD	1LC- CDR2	WASTRES
1HC- CDR3	GSYGSSYFDY	1LC- CDR3	QQYYNFPYT
Тяжелая цепь- 1	ELVKPGASMKISCKASGYSFT GYTMNWMKQGHGKNLEWIG LINPYNGGTSYNQKFKDKATL TLDKSSSSAYMELLSLTSEDS AVYYCARGSYGSSYFDYWGQ GTTLTVSS	Легкая цепь-1	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSC KSSQSLLYGGSNQKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIYWASTRESGVPDR FTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLA VYYCQQYYNFPYTFGGGKLEI KR
2HC- CDR1	DYYMN	2LC- CDR1	RASESVDSYGNSFMH
2HC- CDR2	RVNPSNGGTSYNQKFK	2LC- CDR2	RASNLES
2HC- CDR3	GLAYYSNSFVY	2LC- CDR3	QQNNEDPWT
Тяжелая цепь-	EVQLQQSGPELVKPGASVKM SCKASGYTFTDYMNWVKQS	Легкая цепь-2	KIVLTQSPASLAVSLRQRATISCR ASESVDSYGNSFMHWYQQKPG

2	HGKSLEWIGRVNPSNGGTSYN QKFKGKATLTVDKSLSTAYM QLNSLTSEDSAVYYCARGLA YYSNSFVYWGQGTLVTVSA		QPPKLLIYRASNLESGVPARFSG SGSRTDFTLTIDPVEADDAATYY CQQNNEPWTFGGGTKLEIKR
3HC- CDR1	GYFMN	3LC- CDR1	RASKSVSTSSYSYMH
3HC- CDR2	RINPYNGDTFYNQKFKG	3LC- CDR2	FASYLES
3HC- CDR3	SGDWYFDV	3LC- CDR3	PVEEEFPRT
Тяжелая цепь- 3	EVQLQQSGPELVKPGASVKIS CKASGYSFTGYFMNWVKQSH GKSLEWIGRINPYNGDTFYNQ KFKGKATLTVDKSSSTAHME LRSLTSEDSAVYYCARSGDW YFDVWGAGTTVTVSS	Легкая цепь-3	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCR ASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQ PPKLLIKFASYLESVGPARGSGG SGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQ HSREFPRTFGGGTKLEIKR
4HC- CDR1	GYFMN	4LC- CDR1	KASENVVSYVS
4HC- CDR2	RINPYNGDTFYNQKFKG	4LC- CDR2	GASNRYT
4HC- CDR3	GDGYYVTSLAY	4LC- CDR3	GQSYSYPLT
Тяжелая цепь- 4	EVQLQQSGPELVKPGASVKIS CKASGYSFTGYFMNWVKQSH GKSLEWLGRINPYNGDTFYN QKFKGKATLTVDKSSNTAHM ELRSLTSEDSAVYYCARGDGY YVTSLAYWGQGTLVTVSA	Легкая цепь-4	NIVMTQSPKSMMSGVGERVTLS CKASENVVSYVSWFQQKPEQSP KLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGS ATDFTLTISSVQAEDLADYYCGQ SYSYPLTFGAGTKLELKR
5HC- CDR1	DYYMN	5LC- CDR1	RASEVDSYGNFSMH
5HC- CDR2	RVNPSNGGTSYNQKFKG	5LC- CDR2	RASNLES
5HC- CDR3	GLAYYSNSFTY	5LC- CDR3	QNNEDPWT

Тяжелая цепь-5	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYIMNWVKQSHGKSLEWIGRVNPSNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSLSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARGLA YYSNSFTYWGQGLVTVSA	Легкая цепь-5	KIVLTQSPASLAVSLRQRATISCRASESVDSYGNFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNEDPWTFGGGGTKLEIKR
6HC-CDR1	GYFMN	6LC-CDR1	RASESVEYYGTSLMQ
6HC-CDR2	RINPYNGDTFYNQKFKG	6LC-CDR2	GASNVES
6HC-CDR3	SGNYVMDY	6LC-CDR3	QQRKVPWT
Тяжелая цепь-6	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYSFTGYFMNWVKQSHGKSLEWIGRVNPSNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAHMELRSLTSEDSALYYCARSGNYVMDYWGQGLVTVSS	Легкая цепь-6	DIVLTQSPASLAVSLGQSVTISCRASESVEYYGTSLMQWYQQKPGQPPKLLIYGASNVESGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFCQQRKVPWTFGGGGTKLEIKR

[00398] Связывающий домен Клаудина 3 может содержать одну или несколько последовательностей из таблицы 2. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен Клаудина 3 содержит ScFv, содержащий последовательность из таблицы 2. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен содержит антигенсвязывающий фрагмент (Fab), одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), нанотело, VH домен, VL домен, однодоменное антитело (sdAb), VNAR домен и VHH домен, биспецифическое антитело, диатело или функциональный фрагмент любого из них, содержащий последовательность из таблицы 2. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент (Fab), одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), нанотело, VH домен, VL домен, однодоменное антитело (sdAb), VNAR домен и VHH домен, биспецифическое антитело, диатело или функциональный фрагмент любого из них специфически связываются с одним или несколькими антигенами.

[00399] В некоторых вариантах осуществления, химерный слитый белок представляет собой рецептор, содержащий внеклеточный связывающий домен, такой как антигенсвязывающий домен; где внеклеточный связывающий домен может содержать последовательность, которая может связывать белок Клаудин 18.2, как описано в настоящем документе; или может связывать белок Клаудин 3, как описано в настоящем документе; и может дополнительно содержать трансмембранный домен с шарнирным доменом или без него между внеклеточным антигенсвязывающим доменом и

внутриклеточным доменом. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен дополнительно содержит шарнирный домен, полученный из CD8, где шарнирный домен функционально связан с трансмембранным доменом на цитоплазматической стороне и с доменом, связывающим Клаудин 18.2, на внеклеточной стороне. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в любой из последовательностей в SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 или 19. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из трансмембранного домена CD8 альфа (CD8a). В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 15, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из трансмембранного домена CD2. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из трансмембранного домена CD28. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из трансмембранного домена CD68. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 19, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления, ECD CFP содержит аминокислотную последовательность, указанную в последовательностях из таблицы 2, или последовательность, которая имеет 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с любой из последовательностей в таблице 2, слитую с трансмембранным доменом, выбранным из любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 или 19, или трансмембранным доменом, аминокислотная последовательность которого имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 или 19.

[00400] В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный шарнирный домен и трансмембранный домен содержат последовательность SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21 или имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, слитый с трансмембранным доменом SEQ ID NO: 20 или имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, слитый с трансмембранным доменом SEQ ID NO: 21, или имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит связывающий домен ECD, имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с любой из последовательностей в таблице 2, слитый с шарнирным и трансмембранным доменом, имеющим аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20 или 21.

[00401] В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов, которые содержат внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен фагоцитоза. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный домен фагоцитоза содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из рецептора, отличного от Megf10, MerTk, FcR $\alpha$  и Bai1. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный домен фагоцитоза содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из рецептора, отличного от Megf10, MerTk, FcR и Bai1. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит домен, полученный из рецептора, отличного от CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления, сигнальный домен фагоцитоза содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из FcR $\gamma$ , FcR $\alpha$  или FcR $\epsilon$ .

[00402] В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из белка FcRгамма (цепи FcR $\gamma$ ), содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 22, 23, 24 или 25 или последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности любой из SEQ ID NO: 22, 23, 24 или 25. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов дополнительно содержат провоспалительный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит домен рекрутирования PI3-киназы (PI3K). В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит

последовательность SEQ ID NO: 26 или имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен получен из внутриклеточного сигнального домена CD40. В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 27 или имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен SEQ ID NO: 28 или имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен SEQ ID NO: 29 или имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен SEQ ID NO: 30 или имеющий по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 30.

[00403] В настоящем документе предложена рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая CFP, содержащий связывающий домен Клаудина 18.2 (Клаудин 18.2 связующее), как описано выше, который может экспрессироваться в подходящей клетке, такой как миелоидная клетка. Миелоидная клетка может быть фагоцитирующей клеткой. В некоторых вариантах осуществления, Клаудин 18.2 связующее при связывании Клаудина 18.2 с клеткой активирует миелоидную клетку, экспрессирующую Клаудин 18.2-связывающий CFP. В настоящем документе предложена последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которая кодирует химерный слитый белок рецептора, связывающего Клаудин 18.2 (CFP). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая такой слитый белок химерного рецептора, например слитый белок рецептора, связывающего Клаудин 18.2, может быть экспрессирована в подходящей клетке, такой как миелоидная клетка. В некоторых вариантах осуществления, Клаудин 18.2-CFP при экспрессии на подходящей клетке, такой как миелоидная клетка, Клаудина 18.2 связующее может связываться с клеткой-мишенью, экспрессирующей Клаудин 18.2, и активируется миелоидная клетка, экспрессирующая связующее. В некоторых вариантах осуществления, Клаудин 18.2-CFP при взаимодействии с Клаудином 18.2 активирует внутриклеточный сигнальный домен Клаудина 18.2-CFP, который активирует миелоидную клетку, экспрессирующую рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую Клаудин 18.2-CFP. В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка представляет собой фагоцитирующую клетку. В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка, которая является фагоцитирующей клеткой и экспрессирует CD137 связующее, может быть активирована, когда Клаудин 18.2 связующее связывается с Клаудином 18.2, экспрессируемым на другой

клетке (клетке-мишени), и фагоцитирует клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень может представлять собой любую клетку, которая экспрессирует Клаудин 18.2. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой Т-лимфоцит (Т-клетку). В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень может быть злокачественной клеткой. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень может представлять собой злокачественную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, миелоидную клетку, экспрессирующую CFP, связывающий Клаудин 18.2, можно использовать для создания терапевтической композиции против Т-клеточной лимфомы.

[00404] В некоторых вариантах осуществления, химерный слитый белок, связывающий Клаудин 18.2, представляет собой внеклеточный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с Клаудином 18.2. В настоящем документе предложен рекомбинантный белок, такой как внеклеточный белок, такой как растворимый белок, который может связываться с Клаудином 18.2. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный белок содержит антитело или его фрагмент, который может связываться с Клаудином 18.2, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный белок или растворимый белок дополнительно содержит второй домен, который может связываться с поверхностным белком миелоидной клетки, такой как фагоцитарная клетка. Поверхностным белком миелоидной клетки может быть белок, экспрессируемый на мембране миелоидной клетки, например, фагоцитарный рецептор, молекула распознавания образов или скэвенджер-рецептор.

[00405] В настоящем документе предложена рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая внеклеточный белок, такой как растворимый белок, который может связываться с внеклеточным доменом Клаудина 18.2, как описано в настоящем документе.

[00406] В некоторых вариантах осуществления, Клаудин 3 связующее представляет собой внеклеточный белок. В настоящем документе предусмотрен рекомбинантный белок, такой как внеклеточный белок, такой как растворимый белок, который может связываться с Клаудином 3. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный белок содержит антитело или его фрагмент, который может связываться с Клаудином 3, такой как любая одна или несколько последовательностей, представленных в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный белок, связывающий Клаудин 3, дополнительно содержит второй домен, который может связываться с поверхностным белком миелоидной клетки, такой как фагоцитарная клетка. Поверхностным белком миелоидной клетки может быть белок, экспрессируемый на мембране миелоидной клетки, например, фагоцитарный рецептор, молекула распознавания образов или скэвенджер-рецептор. В настоящем документе предложена рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая внеклеточный белок, такой как растворимый белок, который может связываться с внеклеточным доменом Клаудина 3, как описано в настоящем документе.

[00407] В настоящем документе предложен терапевтический агент для лечения

заболевания у субъекта, где заболевание связано со сверхэкспрессией белка Клаудина, например, белка Клаудина 18.2 или белка Клаудина 3, где терапевтический агент содержит по меньшей мере рекомбинантный белок, имеющий внеклеточный связывающий домен, который может связываться с Клаудином 18.2 или Клаудином 3, соответственно, такой как любой из белков, связывающих Клаудин 18.2 или Клаудин 3, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложена клетка, которая экспрессирует связывание Клаудина 18.2 или связывание Клаудина 3. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложен терапевтический агент для лечения заболевания у субъекта, где заболевание связано со сверхэкспрессией белка Клаудина, например, белка Клаудина 18.2 или белка Клаудина 3, где терапевтический агент содержит по меньшей мере рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую Клаудин 18.2 связующее или Клаудин 3 связующее, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложен терапевтический агент для лечения заболевания у субъекта, где заболевание связано со сверхэкспрессией белка Клаудина, например, белка Клаудина 18.2 или белка Клаудина 3, где терапевтический агент содержит клетку, содержащую рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую Клаудин 18.2 связующее или Клаудин 3 связующее, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой миелоидную клетку.

#### **Белки и домены, связывающие TROP2**

[00408] TROP2, также известный как эпителиальный гликопротеин-1, желудочно-кишечный антиген 733-1, поверхностный маркер-1 мембранного компонента и анти-опухолеассоциированный трансдуктор сигнала кальция-2, является белковым продуктом гена TACSTD2. Он представляет собой трансмембранный гликопротеин, который функционирует в различных клеточных сигнальных путях и впервые был обнаружен как трансдуктор внутриклеточного кальциевого сигнала. Было показано, что экспрессия TROP2 зависит от большого количества факторов транскрипции. TROP2 регулирует пролиферацию и самообновление посредством передачи сигналов  $\beta$ -катенина, и передача сигналов TROP2 усиливает свойства раковых клеток, подобные стволовым клеткам. TROP2 может играть роль в прогрессировании опухоли, учитывая участие в нескольких молекулярных путях, традиционно связанных с развитием рака. Высокая экспрессия TROP2 коррелирует с плохим прогнозом при внутривисцеральной холангиокарциноме поджелудочной железы, раке шейки матки, раке желудка и других заболеваниях (Fong D et al., Br J Cancer. 2008;99(8):1290-1295; Ning S. et al., J Gastrointest Surg. 2013;17(2):360-368; Liu T, et al., PLoS One. 2013;8(9):e75864; Zhao W, et al., Oncotarget. 2016;7(5):6136-6145). TROP2 сверхэкспрессируется в самых разных опухолях, с повышенной экспрессией по сравнению с нормальными клетками, он может стать мишенью для новых терапевтических разработок.

[00409] В настоящем документе предложен химерный белок, который может связываться с раковой клеткой, экспрессирующей TROP2. В настоящем документе

предложен химерный белок, который связывается с внеклеточным доменом TROP2 (TROP2 связующее). В некоторых вариантах осуществления, химерный белок представляет собой химерный белок-рецептор с внеклеточным белком, способным связываться с внеклеточным доменом TROP2, трансмембранным доменом и/или цитоплазматическим доменом. В некоторых вариантах осуществления, химерный белок представляет собой белок, который представляет собой внеклеточный растворимый белок, способный связываться с внеклеточным доменом TROP2. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный растворимый химерный белок, способный связываться с внеклеточным доменом TROP2, может содержать другой домен, способный связываться с внеклеточным доменом белка, экспрессируемого на поверхности миелоидной клетки, такой как фагоцитарная клетка. Химерный белок, описанный в настоящем документе (TROP2 связующее), как описано в настоящем документе, может быть использован для получения терапевтического агента, включающего фармацевтическую композицию, содержащую TROP2 связующее, для лечения заболевания, связанного со сверхэкспрессией белков TROP2, такого как рак. Такие виды рака включают, но не ограничены ими, рак поджелудочной железы, внутригрудную холангиокарциному, рак шейки матки и рак желудка.

[00410] В одном аспекте, в настоящем документе предложен белок химерного слитого рецептора (CFP), имеющий внеклеточный связывающий домен TROP2 (TROP2-связывающий CFP). В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный связывающий домен представляет собой антигенсвязывающий домен антитела, способного связываться с TROP2, или фрагмент одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), нанотело, VH домен, VL домен, однодоменное антитело (sdAb), VNAR домен и VHH домен, биспецифическое антитело, диатело или функциональный фрагмент любого из них. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент (Fab), одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), нанотело, VH домен, VL домен, однодоменное антитело (sdAb), VNAR домен и VHH домен, биспецифическое антитело, диатело или функциональный фрагмент любого из них специфически связываются с одним или несколькими антигенами. В некоторых вариантах осуществления, связующее представляет собой природный лиганд для рецептора TROP2.

[00411] В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен дополнительно содержит шарнирный домен, полученный из CD8, где шарнирный домен функционально связан с трансмембранным доменом на цитоплазматической стороне и с TROP2-связывающим доменом на внеклеточной стороне. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в любой из последовательностей в SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 или 19. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из CD8 альфа (CD8a) трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 15, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из трансмембранного домена CD2. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из трансмембранного домена CD28. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из трансмембранного домена CD68. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 19, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления, ECD CFP содержит аминокислотную последовательность, указанную в последовательностях таблицы 2, или последовательность, которая имеет 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности любой из последовательностей в таблице 2, слитую с трансмембранным доменом, выбранным из любой из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 или 19, или трансмембранным доменом, аминокислотная последовательность которого имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 или 19.

[00412] В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный шарнирный домен и трансмембранный домен содержат последовательность SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21 или имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, слитый с трансмембранным доменом SEQ ID NO: 20 или имеющим по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, слитый с трансмембранным доменом SEQ ID NO: 21, или имеющим по меньшей мере с 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит связывающий домен ECD, имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности любой из последовательностей в таблице 2, слитый с шарнирным и трансмембранным доменом, имеющим аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20 или 21.

[00413] В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, содержащий последовательность, указанную в SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35, или в обеих, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35; функционально связанный с доменом ТМ, содержащим последовательность трансмембранного домена CD16 (например, содержащую короткий шарнирный домен), как указано в таблице 4. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, содержащий последовательность, указанную в SEQ ID NO: 34. или 35, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 34 или 35; функционально связанный с доменом ТМ, содержащим последовательность трансмембранного домена CD64. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, содержащий последовательность, указанную в SEQ ID NO: 34 или 35; функционально связанный с доменом ТМ, содержащим последовательность трансмембранного домена CD89 (например, содержащий короткий шарнирный домен), как указано в таблице 4. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит ECD с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 34 или 35, или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 34 или 35; домен ТМ, содержащий последовательность из домена ТМ белка CD16, или TMD белка CD64, или TMD белка CD89, и соответствующий внутриклеточный домен (ICD) или его часть, например, из белка CD16, белка CD64 или белка CD89, соответственно, необязательно, в дополнение к другим различным ICD, описанным в настоящем документе. Примеры последовательностей ICD CD16 и CD89 представлены в таблице 4.

[00414] В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов, которые содержат внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен фагоцитоза. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный домен фагоцитоза содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из рецептора, отличного от Megf10, MerTk, FcR $\alpha$  и Bai1. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный домен фагоцитоза содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из рецептора, отличного от Megf10, MerTk, FcR и Bai1. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит домен, полученный из рецептора, отличного от CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах

осуществления, сигнальный домен фагоцитоза содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из FcR $\gamma$ , FcR $\alpha$  или FcR $\epsilon$ .

[00415] В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из белка FcRгамма (цепь FcR $\gamma$ ), содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 22, 23, 24 или 25 или последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 22, 23, 24 или 25. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов дополнительно содержат провоспалительный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит домен рекрутирования PI3-киназы (PI3K). В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 26 или имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен происходит из внутриклеточного сигнального домена CD40. В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 27 или имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен SEQ ID NO: 28 или имеющий по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен SEQ ID NO: 29 или имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен SEQ ID NO: 30 или имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 30.

[00416] В настоящем документе предложена рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая CFP, содержащую связывающий домен TROP2 (TROP2 связующее), как описано выше, который может экспрессироваться в подходящей клетке, такой как миелоидная клетка. Миелоидная клетка может быть фагоцитирующей клеткой. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая CFP, содержит связывающий домен TROP2, как описано выше, внутриклеточный домен, который содержит одну или несколько последовательностей из SEQ ID NO: 21-30; и трансмембранный домен, содержащий последовательность, имеющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 15-21.

[00417] В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен рекомбинантный белок, такой как внеклеточный белок, такой как растворимый белок,

который может связываться с внеклеточным доменом TROP2. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный внеклеточный белок, имеющий домен, который может связываться с TROP2, например, домен, который может связываться с внеклеточным доменом TROP2, дополнительно содержит второй домен, который может связываться с поверхностным белком миелоидной клетки, таким как фагоцитарная клетка. Поверхностным белком миелоидной клетки может быть белок, экспрессируемый на мембране миелоидной клетки, например, фагоцитарный рецептор, молекула распознавания образов или скэвенджер-рецептор. В настоящем документе предложена рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая внеклеточный белок, такой как растворимый белок, который может связываться с внеклеточным доменом TROP2, как описано в настоящем документе.

[00418] В настоящем документе предложен терапевтический агент для лечения заболевания у субъекта, где заболевание связано со сверхэкспрессией белка TROP2, где терапевтический агент содержит по меньшей мере рекомбинантную полинуклеиновую кислоту, кодирующую белок, имеющий внеклеточный связывающий домен, который может связываться с TROP2, такой как любой из белков, связывающих TROP2, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная полинуклеиновая кислота, кодирующая белок, представляет собой мРНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная полинуклеиновая кислота, кодирующая белок, представляет собой ДНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная полинуклеиновая кислота кодирует белок, связывающий TROP2, который представляет собой химерный белок рецептора слияния (CFP), содержащий внеклеточный связывающий домен TROP2, необязательный трансмембранный домен и один или несколько внутриклеточных доменов. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько внутриклеточных доменов содержат один или несколько клеточных сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов содержат домен рекрутирования PI3-киназы, внутриклеточный домен CD40, домен FcR, как описано в описании. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная полинуклеиновая кислота содержится в клетке. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная мРНК, содержащая последовательность, кодирующую связывающий TROP2 CFP, экспрессируется в миелоидной клетке. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлена клетка, которая экспрессирует связывающий белок TROP2. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложен терапевтический агент для лечения заболевания у субъекта, где заболевание связано со сверхэкспрессией TROP2, где терапевтический агент содержит по меньшей мере рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую связующее вещество TROP2, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложен терапевтический агент для лечения заболевания у субъекта, где заболевание связано со сверхэкспрессией белка TROP2, где терапевтический агент содержит клетку, содержащую рекомбинантную нуклеиновую кислоту,

кодирующую связующее вещество TROP2, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой миелоидную клетку. В некоторых вариантах осуществления, заболевание представляет собой рак, включая, но не ограничиваясь ими, рак поджелудочной железы, внутрипротоковую холангиокарциному, рак шейки матки, рак желудка, рак легких. В некоторых вариантах осуществления, заболевание представляет собой мелкоклеточную карциному легкого.

[00419] В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент, описанный в настоящем документе, содержит по меньшей мере рекомбинантный химерный слитый белок (CFP) или полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный CFP, имеющий внеклеточный связывающий домен, который может связываться с TROP2, необязательно, шарнирный домен CD8 и трансмембранный домен, который может связываться с эндогенным белком в миелоидной клетке для правильной экспрессии и локализации на мембране миелоидной клетки. Например, в некоторых вариантах осуществления, TROP2 связующее содержит трансмембранную область, которая димеризуется или олигомеризуется с другим трансмембранным белком миелоидной клетки. В некоторых вариантах осуществления, TROP2 связующее содержит трансмембранный белок, который димеризуется с рецептором Fc-гамма на мембране миелоидных клеток и, таким образом, может экспрессироваться только в миелоидных клетках. В некоторых вариантах осуществления, TROP2 связующее разработано таким образом, что белок является функциональным, только если он димеризуется (или олигомеризуется) с эндогенным белком, который экспрессируется только в миелоидной клетке. В некоторых вариантах осуществления, TROP2 связующее содержит трансмембранный домен Fc-альфа. В некоторых вариантах осуществления, TROP2 связующее содержит трансмембранный домен, выбранный из трансмембранного домена белка CD64 (Fc $\gamma$ R1), трансмембранного домена белка CD89 (Fc $\alpha$ R1), трансмембранного домена CD16a (Fc $\gamma$ RIIA). В некоторых вариантах осуществления, TROP2 связующее содержит трансмембранный домен Fc-эпсилон. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложен TROP2-связывающий CFP (TROP2 связующее), который содержит внеклеточный связывающий домен TROP2, необязательно, короткую шарнирную область, например, содержащую шарнирный домен CD8, трансмембранный домен CD89, необязательно, внутриклеточную область CD89, слитую с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными доменами, такими как внутриклеточный домен CD40 и домен рекрутирования PI3-киназы. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложен TROP2-связывающий CFP (TROP2 связующее), который содержит внеклеточный связывающий домен TROP2, необязательно, короткую шарнирную область, например, содержащую шарнирный домен CD8, трансмембранный домен CD64, необязательно, внутриклеточную область CD64, слитый с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными доменами, такими как внутриклеточный домен CD40 и домен рекрутирования PI3-киназы. TROP2 CFP может содержать один или несколько человеческих или гуманизированных доменов. В настоящем документе предложен

полинуклеотид, например, мРНК или ДНК, содержащий последовательность, кодирующую конструкцию TROP2 CFP, содержащую анти-TROP2 ScFv (TROP2-антигенное связующее), слитое с шарнирным доменом CD8, который функционально связан с трансмембранным доменом CD89, и внутриклеточный домен.

[00420] В некоторых вариантах осуществления, TROP2 CFP, описанный в настоящем документе, демонстрирует экспрессию, специфичную для миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления, CFP TROP2, описанный в настоящем документе, демонстрирует Fc-гамма-зависимую экспрессию. В некоторых вариантах осуществления, TROP2 CFP, описанный в настоящем документе, демонстрирует неопределяемую экспрессию в Т-клетке, В-клетке, эпителиальной клетке, мышечной клетке, нейронной клетке или любой не миелоидной клетке при введении полинуклеотида *in vivo*. В одном варианте осуществления, TROP2 связующее, имеющее трансмембранный домен CD16, CD89 или CD64, как описано в настоящем документе, кодируемое полинуклеотидом, описанным в настоящем документе, экспрессируется преимущественно в клетке CD14+ при введении полинуклеотида *in vivo*. В одном варианте осуществления, TROP2 связующее, имеющее трансмембранный домен CD16, CD89 или CD64, кодируемый полинуклеотидом, описанным в настоящем документе, экспрессируется только в клетке CD14+ при введении полинуклеотида *in vivo*.

[00421] В настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая клетку CD14+, экспрессирующую CFP, имеющую связывающий домен TROP2. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция содержит клеточную популяцию, в которой по меньшей мере 50% клеток представляют собой CD14+ клетки, которые экспрессируют TROP2-связывающий CFP. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере 50% CD14+ и CD16- клеток. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере 50% клеток, которые экспрессируют CD14+ клетки, которые являются CD16- и экспрессируют TROP2-CFP (CFP, имеющие внеклеточный домен, связывающий TROP2).

[00422] В настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный полинуклеотид (полинуклеиновую кислоту), кодирующий трансмембранный полипептид, содержащий трансмембранный домен CD64, или CD89, или CD16a, и где рекомбинантный полинуклеотид инкапсулирован в LNP. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный полипептид представляет собой CFP, имеющий внеклеточный связывающий домен, специфичный для связывания антигена на раковой клетке. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный связывающий домен, специфичный для связывания TROP2.

[00423] В настоящем документе предложена фармацевтическая композиция для лечения рака у человека, которая содержит клетку, например, миелоидную CD14+ клетку, экспрессирующую связывающий TROP2 CFP, как описано в настоящем документе, где рак представляет собой рак легкого. В некоторых вариантах осуществления, рак легкого

представляет собой NSCLC.

[00424] В настоящем документе предложена фармацевтическая композиция для лечения рака у человека, которая содержит рекомбинантную полинуклеиновую кислоту, кодирующую CFP, содержащую связывающий TROP2 внеклеточный домен, способный экспрессироваться в миелоидных клетках *in vivo*; где CFP, содержащий внеклеточный домен, связывающий TROP2, содержит трансмембранный домен CD64, CD16a или CD89, как описано в настоящем документе, где рекомбинантная полинуклеиновая кислота инкапсулирована в LNP, где рак представляет собой рак легкого. В некоторых вариантах осуществления, рак легкого представляет собой NSCLC.

[00425] Типовая последовательность связывающего домена TROP2 может представлять собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 34.

DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSI AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY  
TGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQH YITPLTFGAGTKVEIKRGGGGSGG  
GGSGGGGSQVQLQQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWM  
GWINTYTG EPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWY  
FDVWGQGS LVTVSS (SEQ ID NO: 34).

[00426] В некоторых вариантах осуществления, химерный слитый белок (CFP) содержит внеклеточный домен (ECD), таргетирующий связывание с TROP2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 34.

[00427] Типовой связывающий домен TROP2 может представлять собой последовательность, изображенную в SEQ ID NO: 35.

[00428]

QVQLQQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTG  
EPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQG  
SLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSI AVAWYQ  
QKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQH YITPLTF  
GAGTKVEIKR (SEQ ID NO: 35).

[00429] В некоторых вариантах осуществления, химерный слитый белок (CFP) содержит внеклеточный домен (ECD), предназначенный для связывания с TROP2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 или последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 35.

### **Связывающие белки и домены TMPRSS3**

[00430] Приблизительно в 50% случаев рака предстательной железы имеется слияние генов, связывающее регулируемый андрогенами ген трансмембранной протеазы, серин 2 (TMPRSS2), с факторами транскрипции семейства трансформирующих последовательностей (ETS) вируса эритробластоэза E26, обычно ген, специфичный для

трансформации эритробластов (ERG). Недавно было продемонстрировано, что слияние TMPRSS2:ERG обычно происходит на ранних стадиях развития опухоли и часто однородно распределяется по объему опухоли. В недавнем исследовании, противоречивые результаты ERG наблюдались в лимфатических узлах у 30% из 84 случаев рака предстательной железы. Слитый белок TMPRSS2:ERG может быть оптимальной мишенью для новой терапии, поскольку он обладает высокой специфичностью в отношении клеток рака предстательной железы. В одном аспекте, в настоящем документе предложен белок химерного слитого рецептора (CFP), имеющий внеклеточный связывающий домен TMPRSS (TMPRSS-связывающий CFP).

[00431] В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный связывающий домен представляет собой антигенсвязывающий домен антитела, способного связываться с TMPRSS, или фрагмент одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), нанотело, VH домен, VL домен, однодоменное антитело (sdAb), VNAR домен и VHH домен, биспецифическое антитело, диатело или функциональный фрагмент любого из них. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент (Fab), одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), нанотело, VH домен, VL домен, однодоменное антитело (sdAb), VNAR домен и VHH домен, биспецифическое антитело, диатело или функциональный фрагмент любого из них специфически связываются с одним или несколькими антигенами.

[00432] В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен дополнительно содержит шарнирный домен, полученный из CD8, где шарнирный домен функционально связан с трансмембранным доменом на цитоплазматической стороне и со связывающим TMPRSS доменом на внеклеточной стороне. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в любой из последовательностей в SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 или 19. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из CD8 альфа (CD8a) трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 15, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из трансмембранного домена CD2. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит

последовательность, полученную из трансмембранного домена CD28. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из трансмембранного домена CD68. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 19, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления, ECD CFP содержит аминокислотную последовательность, указанную в последовательностях таблицы 2, или последовательность, которая имеет 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с любой из последовательностей в таблице 2, слитый с трансмембранным доменом, выбранным из любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 или 19, или трансмембранным доменом, аминокислотная последовательность которого имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности любой из SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 или 19.

[00433] В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный шарнирный домен и трансмембранный домен содержат последовательность SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21 или имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, слитый с трансмембранным доменом SEQ ID NO: 20 или имеющим по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внеклеточный домен, слитый с трансмембранным доменом SEQ ID NO: 21, или имеющим по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит связывающий домен ECD, имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности любой из последовательностей в таблице 2, слитый с шарнирным и трансмембранным доменом, имеющим аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20 или 21.

[00434] В некоторых вариантах осуществления, CFP, содержащий домен ECD, который может связываться с белком TMPRSS, или его часть, содержит TMD и шарнирный домен, необязательно короткий цитоплазматический домен белка CD16, CD64

или CD89, необязательно с одним или несколькими другими ICD, описанными в настоящем документе.

[00435] В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов, которые содержат внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен фагоцитоза. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный домен фагоцитоза содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из рецептора, отличного от Megf10, MerTk, FcR $\alpha$  и Bai1. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный домен фагоцитоза содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из рецептора, отличного от Megf10, MerTk, FcR и Bai1. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит домен, полученный из рецептора, отличного от CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления, сигнальный домен фагоцитоза содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из FcR $\gamma$ , FcR $\alpha$  или FcR $\epsilon$ .

[00436] В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из белка FcRгамма (цепь FcR $\gamma$ ), содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 22, 23, 24 или 25, или последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности любой из SEQ ID NO: 22, 23, 24 или 25. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов дополнительно содержат провоспалительный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит домен рекрутирования PI3-киназы (PI3K). В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 26 или имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен происходит из внутриклеточного сигнального домена CD40. В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 27 или имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен SEQ ID NO: 28 или имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен SEQ ID NO: 29 или имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный сигнальный домен SEQ ID NO: 30 или имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,

95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 30.

[00437] В настоящем документе предложена рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая CFP, содержащую связывающий домен TMPRSS (TMPRSS связующее), как описано выше, который может экспрессироваться в подходящей клетке, такой как миелоидная клетка. Миелоидная клетка может быть фагоцитирующей клеткой. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая CFP, содержит связывающий домен TMPRSS, как описано выше, внутриклеточный домен, который содержит одну или несколько последовательностей из SEQ ID NO: 21-30; и трансмембранный домен, содержащий последовательность, имеющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 15-21.

[00438] В другом варианте осуществления, в настоящем документе предложен рекомбинантный белок, такой как внеклеточный белок, такой как растворимый белок, который может связываться с внеклеточным доменом TMPRSS. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный внеклеточный белок, имеющий домен, который может связываться с TMPRSS, например, домен, который может связываться с внеклеточным доменом TMPRSS, дополнительно содержит второй домен, который может связываться с поверхностным белком миелоидной клетки, такой как фагоцитарная клетка. Поверхностным белком миелоидной клетки может быть белок, экспрессируемый на мембране миелоидной клетки, например, фагоцитарный рецептор, молекула распознавания образов или скэвенджер-рецептор. В настоящем документе предложена рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая внеклеточный белок, такой как растворимый белок, который может связываться с внеклеточным доменом TMPRSS, как описано в настоящем документе.

[00439] В настоящем документе предложен терапевтический агент для лечения заболевания у субъекта, где заболевание связано со сверхэкспрессией белка TMPRSS, где терапевтический агент включает по меньшей мере рекомбинантный белок, имеющий внеклеточный связывающий домен, который может связываться с TMPRSS, такой как любой из белков, связывающих TMPRSS, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложена клетка, которая экспрессирует белок, связывающий TMPRSS. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложен терапевтический агент для лечения заболевания у субъекта, где заболевание связано со сверхэкспрессией TMPRSS, где терапевтический агент содержит по меньшей мере рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую TMPRSS связующее, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложен терапевтический агент для лечения заболевания у субъекта, где заболевание связано со сверхэкспрессией белка TMPRSS, где терапевтический агент содержит клетку, содержащую рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую TMPRSS связующее, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой миелоидную клетку. В некоторых вариантах осуществления, заболевание представляет собой рак, такой как рак предстательной

железы.

### **Структуры ViME и TRiME**

[00440] В настоящем документе предложены биспецифические рекрутеры (ViME) или триспецифические рекрутеры (TRiME), содержащие любой из связывающих доменов терапевтических агентов, описанных выше, где связывающие домены содержат связывающий домен антитела, функциональный фрагмент антитела, его переменный домен,  $V_H$  домен,  $V_L$  домен, VNAR домен, VHH домен, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), Fab, однодоменное антитело (sdAb), нанотело, биспецифическое антитело, диатело или функциональный фрагмент или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, антиген на клетке-мишени, с которым связывается первый связывающий домен, представляет собой раковый антиген или патогенный антиген на клетке-мишени или аутоиммунный антиген. В некоторых вариантах осуществления, первый терапевтический агент содержит полипептид длиной менее 1000 аминокислот или 1000 нм. В некоторых вариантах осуществления, первый терапевтический агент содержит полипептид длиной менее 500 аминокислот или 500 нм. В некоторых вариантах осуществления, первый терапевтический агент содержит полипептид длиной 200-1000 аминокислот или 200-1000 нм.

[00441] В некоторых вариантах осуществления, взаимодействие связывающих доменов первого терапевтического агента связывает раковую клетку с миелоидной клеткой. В некоторых вариантах осуществления, второй связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой и способствует фагоцитарной активности миелоидной клетки. В некоторых вариантах осуществления, второй связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой и способствует передаче сигналов воспаления миелоидной клеткой. В некоторых вариантах осуществления, второй связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой или молекулой адгезии и способствует адгезии миелоидной клетки к клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления, второй связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой и ингибирует антифагоцитарную активность миелоидной клетки, опосредованную клеткой-мишенью. В некоторых вариантах осуществления, второй связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой и ингибирует противовоспалительную активность миелоидной клетки, опосредованную клеткой-мишенью. В некоторых вариантах осуществления, второй и/или третий связывающий домен способствует фагоцитарной активности миелоидной клетки. В некоторых вариантах осуществления, второй и/или третий связывающий домен способствует передаче сигналов воспаления миелоидной клетки. В некоторых вариантах осуществления, второй и/или третий связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой или молекулой адгезии и способствует адгезии миелоидной клетки к клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления, второй и/или третий связывающий домен ингибирует антифагоцитарную активность миелоидной клетки, опосредованную клеткой-мишенью. В некоторых

вариантах осуществления, второй и/или третий связывающий домен ингибирует противовоспалительную активность миелоидной клетки, опосредованную клеткой-мишенью.

[00442] В некоторых вариантах осуществления, третий связывающий домен или дополнительный терапевтический агент содержит антагонист CD47, блокатор CD47, антитело, химерный рецептор CD47, сиалидазу, цитокин, провоспалительный ген, прокаспазу или противораковый агент. В некоторых вариантах осуществления, первый связывающий домен, второй связывающий домен и третий связывающий домен связываются с различными не идентичными антигенами-мишенями. В некоторых вариантах осуществления, первый связывающий домен, второй связывающий домен или третий связывающий домен представляет собой лигандсвязывающий домен.

[00443] В некоторых вариантах осуществления, первый, второй или третий связывающие домены функционально связаны одним или несколькими линкерами. В некоторых вариантах осуществления, линкер представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления, линкер представляет собой функциональный пептид. В некоторых вариантах осуществления, линкер представляет собой лиганд для рецептора. В некоторых вариантах осуществления, линкер представляет собой лиганд для рецептора моноцитов или макрофагов. В некоторых вариантах осуществления, линкер активирует рецептор. В некоторых вариантах осуществления, линкер ингибирует рецептор. В некоторых вариантах осуществления, линкер представляет собой лиганд для рецептора макрофага M2. В некоторых вариантах осуществления, линкер представляет собой лиганд для рецептора TLR, такого как TLR4. В некоторых вариантах осуществления, линкер активирует рецептор TLR. В некоторых вариантах осуществления, первый, второй и/или третий связывающие домены связаны с маской, которая связывается со связывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления, маска представляет собой ингибитор, который ингибирует взаимодействие связывающего домена с его мишенью, когда маска остается связанной с соответствующим связывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления, маска связана со связывающим доменом через пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер содержит расщепляемую группу. В некоторых вариантах осуществления, расщепляемая группа расщепляется белком или ферментом, избирательно присутствующим в очаге рака или опухоли.

#### **Лечебные композиции**

[00444] В одном из аспектов настоящего изобретения предложена миелоидной клетке, такая как CD14+ клетка, CD14+/CD16- клетка, CD14+/CD16+ клетка, CD14-/CD16+ клетка, CD14-/CD16- клетка, дендритная клетка, макрофаг M0, макрофаг M2, макрофаг M1 или мозаичная миелоидная клетка/макрофаг/дендритная клетка. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложена терапевтическая композиция, содержащая по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50% CD14+ клеток. В некоторых вариантах

осуществления, терапевтическая композиция содержит по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50% CD14+/CD16-клеток. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложена терапевтическая композиция, содержащая менее 20%, менее 15%, менее 10% или менее 5% дендритных клеток. Миелоидная клетка для терапевтической композиции, как описано в настоящем документе, содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, которая кодирует химерный слитый белок, кодирующий белок-рецептор CFP или белок-рекрутер, как описано в настоящем документе. Миелоидная клетка для терапевтической композиции, как описано в настоящем документе, экспрессирует CFP, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой, или экспрессирует белок-рекрутер, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой, как описано в настоящем документе.

[00445] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложена терапевтическая композиция, содержащая химерный слитый белок, такой как химерный слитый рецепторный белок (CFP), CFP содержит: (a) внеклеточный домен, содержащий: (i) scFv, который специфически связывается с любой из мишеней, описанных в настоящем документе, и (ii) шарнирный домен, полученный из CD8, шарнирный домен, полученный из CD28, или по меньшей мере часть внеклеточного домена из CD68; (b) трансмембранный домен CD8, трансмембранный домен CD28, трансмембранный домен CD2 или трансмембранный домен CD68; и (c) внутриклеточный домен, содержащий по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена, где по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена содержат: (i) первый внутриклеточный сигнальный домен, полученный из FcR $\gamma$  или FcR $\epsilon$ , и (ii) второй внутриклеточный сигнальный домен, который: (A) содержит домен рекрутирования PI3K или (B) происходит от CD40.

[00446] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложена терапевтическая композиция, содержащая биспецифический или триспецифический рекрутер, как описано в настоящем документе.

[00447] В одном из аспектов настоящего документа, предложена одна или несколько рекомбинантных полинуклеиновых кислот, кодирующих один или несколько рекомбинантных белков, которые могут представлять собой химерный слитый белок, такой как рецептор, или активатор, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная(ые) полинуклеиновая(ые) кислота(ы) представляет собой мРНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная полинуклеиновая кислота содержит кольцевую РНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная полинуклеиновая кислота входит в состав вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная полинуклеиновая кислота доставляется с помощью вирусного вектора.

[00448] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложена терапевтическая композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок, такой как химерный слитый рецепторный

белок (CFP), CFP содержит: (a) внеклеточный домен, содержащий: (i) scFv, который специфически связывает любую из мишеней, описанных в настоящем документе, и (ii) шарнирный домен, полученный из CD8, шарнирный домен, полученный из CD28, или по меньшей мере часть внеклеточного домена из CD68; (b) трансмембранный домен CD8, трансмембранный домен CD28, трансмембранный домен CD2 или трансмембранный домен CD68; и (c) внутриклеточный домен, содержащий по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена, где по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена содержат: (i) первый внутриклеточный сигнальный домен, полученный из FcR $\gamma$  или FcR $\epsilon$ , и (ii) второй внутриклеточный сигнальный домен, который: (A) содержит домен рекрутирования PI3K или (B) происходит от CD40.

[00449] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложена терапевтическая композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифический или триспецифический рекрутер, как описано в настоящем документе.

#### **Другие терапевтические композиции для совместного введения**

[00450] В некоторых вариантах осуществления, терапевтическая композиция дополнительно содержит дополнительный терапевтический агент, выбранный из группы, состоящей из агониста CD47, агента, ингибирующего Rac, агента, ингибирующего Cdc42, агента, ингибирующего ГТФазу, агента, способствующего разборке F-актина, агента, способствующего рекрутированию PI3K в PFP, агента, способствующего активности PI3K, агента, способствующего продуцированию фосфатидилинозит-3,4,5-трифосфата, агента, способствующего активности ARHGAP12, агента, способствующего активности ARHGAP25, агента, способствующего активности SH3BP1, агента, способствующего секвестрации лимфоцитов в первичных и/или вторичных лимфоидных органах, агента, увеличивающего концентрацию наивных Т-клеток и Т-клеток центральной памяти во вторичных лимфоидных органах, и любую их комбинацию.

[00451] В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка дополнительно содержит: (a) эндогенный пептид или белок, который димеризуется с CFP, (b) не эндогенный пептид или белок, который димеризуется с CFP; и/или (c) вторую последовательность рекомбинантной полинуклеиновой кислоты, где вторая последовательность рекомбинантной полинуклеиновой кислоты содержит последовательность, кодирующую пептид или белок, который взаимодействует с CFP; где димеризация или взаимодействие потенцируют фагоцитоз миелоидной клеткой, экспрессирующей CFP, по сравнению с миелоидной клеткой, которая не экспрессирует CFP.

[00452] В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка демонстрирует (i) увеличение эффекторной активности, перекрестную презентацию, респираторный бурст, продуцирование ROS, продуцирование iNOS, медиаторы воспаления, продуцирование внеклеточных везикул, продуцирование фосфатидилинозит-3,4,5-трифосфата, трогоцитоз с клеткой-мишенью, экспрессирующей антиген, резистентность к

опосредованному CD47 ингибированию фагоцитоза, резистентность к опосредованному LILRB1 ингибированию фагоцитоза или любой их комбинации; и/или (ii) увеличение экспрессии IL-1, IL3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-23, TNF $\alpha$ , семейства цитокинов TNF, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL-18, IL-23, IL-27, CSF, MCSF, GMCSF, IL-17, IP-10, RANTES, интерферон, белок MHC класса I, белок MHC класса II, CD40, CD48, CD58, CD80, CD86, CD112, CD155, рецептор смерти семейства TRAIL/TNF, TGF $\beta$ , B7-DC, B7-H2, LIGHT, HVEM, TL1A, 41BBL, OX40L, GITRL, CD30L, TIM1, TIM4, SLAM, PDL1, MMP (например, MMP2, MMP7 и MMP9) или любую их комбинацию.

[00453] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен получен из фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления, или где внутриклеточный сигнальный домен содержит домен активации фагоцитоза. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен происходит от рецептора, отличного от фагоцитарного рецептора, выбранного из Megf10, MerTk, FcR-альфа или Bai1. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен происходит от белка, такого как рецептор (например, фагоцитарный рецептор), выбранного из группы, состоящей из TNFR1, MDA5, CD40, лектина, дектина 1, CD206, скэвенджер-рецептора A1 (SRA1), MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L), CD64, CD32a, CD16a, CD89, Fc $\alpha$ -рецептора I, CR1, CD35, CD3 $\zeta$ , рецептора комплемента, CR3, CR4, Tim-1, Tim-4 и CD169. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит провоспалительный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит провоспалительный сигнальный домен, который не является доменом рекрутирования P3K.

[00454] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен получен из домена ITAM, содержащего рецептор. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный внутриклеточный сигнальный домен содержит первую часть, полученную из фагоцитарного, и вторую часть, полученную из не фагоцитарного рецептора, где вторая часть, полученная из не фагоцитарного рецептора, содержит сайт фосфорилирования. В некоторых вариантах осуществления, сайт фосфорилирования содержит аминокислотные последовательности, подходящие для сайта аутофосфорилирования. В некоторых вариантах осуществления, фосфорилируемый аминокислотный остаток представляет собой тирозин. В некоторых вариантах осуществления, сайт фосфорилирования содержит аминокислотные последовательности, подходящие для фосфорилирования киназами семейства Src. В некоторых вариантах осуществления, сайт фосфорилирования содержит аминокислотные последовательности, которые при фосфорилировании способны связываться с SH2-доменами киназы. В некоторых вариантах осуществления, рецепторный тирозинкиназный домен слит с цитоплазматическим концом химерного рецептора в дополнение к первой

цитоплазматической части.

[00455] В некоторых вариантах осуществления, сайт фосфорилирования представляет собой сайт фосфорилирования тирозина.

[00456] В некоторых вариантах осуществления, второй внутриклеточный домен представляет собой иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). Типовые мотивы ITAM присутствуют в белках иммуноглобулина  $\alpha$  и  $\beta$  млекопитающих, рецепторах TCR $\gamma$ , субъединицах рецепторов FCR $\gamma$ , рецепторах цепей CD3 и молекуле активации NFAT.

[00457] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит один мотив ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит более одного мотива ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит два или более мотивов ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит три или более мотивов ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит четыре или более мотивов ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит пять или более мотивов ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит шесть или более мотивов ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит семь или более мотивов ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит восемь или более мотивов ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит девять или более мотивов ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит десять или более мотивов ITAM.

[00458] В настоящем документе предложена композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую CFP, такую как слитый белок (PFP) фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), включающую: субъединицу PR, содержащую: трансмембранный домен, и внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, специфичный к антигену клетки-мишени; где трансмембранный домен и внеклеточный домен функционально связаны; и где внутриклеточный сигнальный домен происходит от фагоцитарного рецептора, отличного от фагоцитарного рецептора, выбранного из Megf10, MerTk, FcR $\alpha$  или Bai1.

[00459] В некоторых вариантах осуществления, при связывании CFP с антигеном клетки-мишени активность клетки, экспрессирующей CFP, увеличивается по меньшей мере более чем на 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 950% или 1000% по сравнению с клеткой, не экспрессирующей

CFP. В некоторых вариантах осуществления, CFP функционально включается в клеточную мембрану клетки, когда CFP экспрессируется в клетке. В некоторых вариантах осуществления, при связывании CFP с антигеном клетки-мишени активность клетки, экспрессирующей CFP, увеличивается по меньшей мере 1,1-кратно, 1,5-кратно, 2-кратно, 2,5-кратно, 3-кратно, 3,5-кратно, 4-кратно, 4,5-кратно, 5-кратно, 5,5-кратно, 6-кратно, 6,5-кратно, 7-кратно, 7,5-кратно, 8-кратно, 8,5-кратно, 9-кратно, 9,5-кратно, 10-кратно, 11-кратно, 12-кратно, 13-кратно, 14-кратно, 15-кратно, 16-кратно, 17-кратно, 18-кратно, 19-кратно, 20-кратно, 25-кратно, 30-кратно, 40-кратно, 50-кратно, 75-кратно или 100-кратно по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP.

[00460] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен происходит от рецептора, такого как фагоцитарный рецептор, выбранного из группы, состоящей из TNFR1, MDA5, CD40, лектина, дектина 1, CD206, скэвенджер-рецептора A1 (SRA1), MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L), CD64, CD32a, CD16a, CD89, Fcα рецептора I, CR1, CD35, CD3ζ, CR3, CR4, Tim-1, Tim-4 и CD169. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит провоспалительный сигнальный домен.

[00461] В настоящем документе предложена композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую CFP, такую как слитый белок (PFP) фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), включающий: субъединицу PR, содержащую: трансмембранный домен, и внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, специфичный к антигену клетки-мишени; где трансмембранный домен и внеклеточный домен функционально связаны; и где внутриклеточный сигнальный домен получен из рецептора, такого как фагоцитарный рецептор, выбранный из группы, состоящей из TNFR1, MDA5, CD40, лектина, дектина 1, CD206, фагоцитарного рецептора A1 (SRA1), MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L), CD64, CD32a, CD16a, CD89, Fcα рецептора I, CR1, CD35, CD3ζ, CR3, CR4, Tim-1, Tim-4 и CD169.

[00462] В некоторых вариантах осуществления, при связывании CFP с антигеном клетки-мишени, активность клетки, экспрессирующей CFP, увеличивается по меньшей мере более чем на 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 950% или 1000% по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен получен из фагоцитарного рецептора, отличного от фагоцитарного рецептора, выбранного

из *Megf10*, *MerTk*, *FcR $\alpha$*  или *Vai1*. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит провоспалительный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит домен рекрутирования РІЗК, такой как домен рекрутирования РІЗК, полученный из CD19. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит провоспалительный сигнальный домен, который не является доменом рекрутирования РІЗК.

[00463] В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CFP, демонстрирует усиление фагоцитоза клетки-мишени, экспрессирующей антиген, по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CFP, демонстрирует по меньшей мере 1,1-кратное увеличение фагоцитоза клетки-мишени, экспрессирующей антиген, по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CFP, демонстрирует по меньшей мере 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное, 6-кратное, 7-кратное, 8-кратное, 9-кратное, 10-кратное, 20-кратное, 30-кратное или 50-кратное увеличение фагоцитоза клетки-мишени, экспрессирующей антиген, по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CFP, демонстрирует увеличение продуцировании цитокина по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP. В некоторых вариантах осуществления, цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1, IL3, IL-6, IL-12, IL-13, IL-23, TNF, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL-18, IL-23, IL-27, CSF, MCSF, GMCSF, IL17, IP-10, RANTES, интерферона и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CFP, демонстрирует повышенную эффекторную активность по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CFP, демонстрирует повышенную перекрестную презентацию по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP. В некоторых вариантах осуществления, в клетке, экспрессирующей CFP, наблюдается увеличение экспрессии белка МНС класса II по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CFP, демонстрирует повышенную экспрессию CD80 по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CFP, демонстрирует повышенную экспрессию CD86 по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CFP, демонстрирует повышенную экспрессию белка МНС класса I по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CFP, демонстрирует повышенную экспрессию рецепторов смерти семейства TRAIL/TNF по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CFP, демонстрирует повышенную экспрессию B7-H2 по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CFP, демонстрирует повышенную экспрессию LIGHT по сравнению с



продуцирования iNOS по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CFP, демонстрирует увеличение продуцировании внеклеточных везикул по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CFP, демонстрирует увеличение трофоцитоза с клеткой-мишенью, экспрессирующей антиген, по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CFP, демонстрирует повышенную устойчивость к опосредованному CD47 ингибированию фагоцитоза по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CFP, демонстрирует повышенную резистентность к опосредованному LILRB1 ингибированию фагоцитоза по сравнению с клеткой, не экспрессирующей CFP. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая CFP, демонстрирует увеличение продуцирования фосфатидилинозит-3,4,5-трифосфата.

[00464] Также в настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая описанную в настоящем документе композицию, такую как описанная в настоящем документе рекомбинантная нуклеиновая кислота, описанный в настоящем документе вектор, описанный в настоящем документе полипептид или описанная в настоящем документе клетка; и фармацевтически приемлемый эксципиент.

[00465] В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция дополнительно содержит дополнительный терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный терапевтический агент выбран из группы, состоящей из агониста CD47, агента, ингибирующего Rac, агента, ингибирующего Cdc42, агента, ингибирующего ГТФазу, агента, способствующего разборке F-актина, агента, способствующего рекрутированию PI3K в PFP, агента, способствующего активности PI3K, агента, способствующего выработке фосфатидилинозит-3,4,5-трифосфата, агента, способствующего активности ARHGAP12, агента, способствующего активности ARHGAP25, агента, способствующего активности SH3BP1 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтически приемлемый эксципиент включает бессывороточную среду, липид или наночастицу.

[00466] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой мРНК или кольцевую РНК.

[00467] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложена терапевтическая композиция, содержащая клетку, где клетка содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, как описано в любом месте в описании. В некоторых вариантах осуществления, терапевтическая композиция содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, экспрессирующую химерный белок, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка представляет собой CD14<sup>+</sup> клетку, CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup> клетку, CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> клетку, CD14<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup> клетку, CD14<sup>-</sup>/CD16<sup>-</sup> клетку, дендритную клетку, макрофаг M0, макрофаг M2, макрофаг M1 или мозаичную миелоидную клетку/макрофаг/дендритную клетку.

**Способы создания новых конструкций слитых белков химерных рецепторов (CFP)**

[00468] В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ создания новых белков химерных рецепторов, включающий, например, идентификацию новых доменов, которые могут быть полезны для усиления функции миелоидной клетки, так что, когда слитый рецептор экспрессируется в миелоидной клетке, он функционирует в качестве эффекторной миелоидной клетки из описанных в настоящем документе спецификаций. Создание слитых белков, как описано в настоящем документе, может быть выполнено с использованием хорошо известных способов молекулярного клонирования, и последовательности могут быть проверены после получения рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

[00469] Получение рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR: Получают конструкции рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которые кодируют химерный антигенный рецептор (CAR), и включают в плазмидные векторы для амплификации и/или тестирования экспрессии в эукариотической клетке. Рекомбинантные CAR конструируют с использованием методов молекулярного клонирования, известных в данной области техники. Рекомбинантный белок CAR содержит внутриклеточный домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен. Каждый домен или часть домена может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты, которая создается с помощью ПЦР из гетерологичных исходных последовательностей и объединяется путем индивидуального клонирования в вектор или лигируется в более длинную нуклеиновую кислоту, которая затем вставляется в сайты мульти-клонирования подходящей плазмиды или вектора с соответствующими промотором и 3'-регуляторными элементами для амплификации. Коротко, типовой CAR получают путем включения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или несколько сигнальных доменов (например, рекрутирующий домен PI3-киназы), последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей шарнирный и трансмембранный домен CD8, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей внеклеточный домен, имеющий последовательность, кодирующую scFv, связывающий антиген-мишень, на внеклеточном конце. Некоторые конструкции включают последовательность пептида FLAG на внеклеточном конце, сконструированную таким образом, что она не препятствует связыванию scFv с антигеном-мишенью. Эти компоненты лигированы вместе в последовательность, которая кодирует полностью функциональный трансмембранный CAR. Субъединицы нуклеиновой кислоты, кодирующие отдельные домены рекомбинантного белка, предназначены для включения промежуточных коротких гибких линкерных последовательностей между двумя доменами. Конструкцию лигируют в плазмиду, имеющую промотор и 3'-стабилизирующие структурные единицы. В одном варианте, конструкция помещается в элемент ретротранспозона Alu, который кодирует ORF2p и имеет соответствующие последовательности 5'- и 3'-UTR, промотор CMV. Плазмиду амплифицируют в *E. coli*, подтверждают секвенированием или хранят при (-)

80°C.

Получение мРНК: мРНК может быть получена путем транскрипции *in vitro* с использованием расщепленной плазмиды в качестве матрицы, и очищена для удаления загрязняющей ДНК и полиаденилирована. Продукт РНК очищают, ресуспендируют до концентрации 1 мг/мл в воде, не содержащей РНКазы, и хранят в криопробирках.

[00470] Идентификацию полезных CFP ECD, TM, ICD и антигенсвязывающих доменов для создания новых CFP можно проводить с использованием описанного в настоящем документе способа. Коротко, большое количество потенциальных белков-кандидатов может быть подвергнуто скринингу на предмет усиленных фагоцитарных свойств и их соответствующих внутриклеточных сигналов, связанных с фагоцитозом. Затем полезные домены можно использовать для создания новых CFP. Скрининг можно разделить на две части: *A. Скрининг доменов фагоцитарного рецептора (PR); B. Скрининг внеклеточных антигенсвязывающих доменов.*

Скрининг доменов PR:

[00471] В одном варианте осуществления, примерно 5800 белков плазматической мембраны подвергали скринингу на предмет их фагоцитарного потенциала в соответствии с описанным в настоящем документе общим способом. Клетки макрофагов J774 могут быть временно трансфицированы библиотекой из 5800 белков плазмы. Для оценки различных потенциальных функций плазматических мембран можно настроить высокопроизводительные мультиплексные анализы (начиная от 6-луночных планшетов и заканчивая 384-луночными планшетами с роботизированной обработкой). Примеры анализов включают, но не ограничены ими, анализ фагоцитоза, анализ продуцирования цитокинов, анализ активации воспаления и анализ активации iNOS. Примерные упрощенные способы могут быть описаны в следующих параграфах. Также могут быть использованы вариации каждого способа, которые могут быть понятны специалисту в данной области техники. Также могут быть использованы вариации каждого метода, которые могут быть понятны специалисту в данной области техники. Примеры протестированных внутриклеточных сигнальных доменов включают, но не ограничены ими, CD40-FcR $\gamma$ ; FcR $\gamma$ -CD40; NLRP3; FcR $\gamma$ -SH2-Прокаспазу; FcR $\gamma$ -Myd88; FcR $\gamma$ -IFN рецептор; FcR-TNFR1; FcR $\gamma$ -TNFR2; FcR-AIM2; FcR $\gamma$ -TRIFN; FcR $\gamma$ -Прокаспазу; TRIFC; RIG1; MDA5; TBK; CD64; CD16A; CD89; FcR $\epsilon$ ; SIRP $\beta$  (два последовательных внутриклеточных домена могут быть представлены через дефис, например, FcR $\gamma$ -Myd88 относится к внутриклеточному домену, содержащему внутриклеточный сигнальный домен FcR $\gamma$  в качестве сигнального домена 1, и внутриклеточный сигнальный домен Myd88 в качестве сигнального домена 2). Подвергнутые скринингу внеклеточные линкерные домены включают, но не ограничены ими, CD64, CD16A, CD89, SIRP $\alpha$ , FcR $\epsilon$ , шарнир CD8. Тестируемые трансмембранные домены включают, но не ограничены ими, CD8, CD64, CD16A, CD89, FcR $\epsilon$ , SIRP $\alpha$ , TNFR1 и CD40. Также подвергают скринингу домены MDA5.

Анализ фагоцитоза:

[00472] Для скрининга макрофагов используют связанные с антигеном кремнеземные или полистироловые микроносители диаметром 1 нм, 5 нм или 10 нм. Инертные микроносители покрывают липидным бислоем на подложке, и антигены лигируют в липидный бислой. Получают клеточные линии макрофагов J774, где каждая клеточная линия экспрессирует клонированный рекомбинантный белок плазматической мембраны. Рекомбинантный белок плазматической мембраны может также экспрессировать флуоресцентную метку. Линии клеток поддерживают и размножают в полных средах RPMI с инактивированной нагреванием сывороткой и антибиотиками (пенициллином/стрептомицином). В день анализа клетки высевают с плотностью  $1 \times 10^6$  клеток/мл на лунку в 6-луночные планшеты или в относительной пропорции в 12- или 24-луночные планшеты и инкубируют в течение 2-6 часов. Затем клетки один раз промывают в фосфатно-солевом буфере, и микроносители добавляют в питательную среду, обедненную сывороткой или комплементом. Клетки визуализируют с помощью световой микроскопии через 30 минут и через 2 часа после добавления микроносителей. Иммунофлуоресцентную реакцию проводят с использованием меченого антитела, и флуоресцентную конфокальную микроскопию используют для обнаружения взаимодействия и совместной локализации клеточных белков при поглощении. Уровни достоверности определяют с помощью теста Крускала-Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения.

[00473] В некоторых примерах, опухолевые клетки, нагруженные красителем, скармливают клеточным линиям макрофагов, и фагоцитоз оценивают с помощью микроскопии.

#### Продуцирование цитокинов:

[00474] Клеточные линии макрофагов культивируют, как описано выше. В одном анализе, каждую клеточную линию J774, экспрессирующую белок плазматической мембраны, высевают в многолуночные планшеты и заражают антигенсвязанными гранулами, и продуцирование цитокинов анализируют путем сбора супернатантов через 4 часа и 24 часа. Цитокины анализируют из супернатанта с помощью ELISA. В другой фракции, клетки собирают через 4 и 24 часа после инкубации с гранулами и проводят проточную цитометрию для обнаружения цитокинов. В каждом случае, в мультиплексном формате можно анализировать несколько цитокинов, которые могут быть выбраны из: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, CXCL1, CXCL3, CXCL9, CXCL-10, MIP1- $\alpha$  и MIP-2. Используют набор массивов воспалительных цитокинов макрофагов (R&D Systems).

[00475] Внутриклеточный сигнальный путь активации воспалительного гена и цитокинов определяют с помощью вестерн-блоттинга на фосфорилирование MAP-киназ, JNK, сигнального пути Akt, пути активации интерферона, включая фосфорилирование и активацию STAT-1.

#### Функциональные анализы

##### Анализ активации инфламмосомы:

[00476] Активацию инфламмосомы NLRP3 анализируют с помощью ELISA, обнаруживая повышенное продуцирование IL-1 и обнаруживая активацию каспазы-1 с помощью вестерн-блоттинга, обнаруживая расщепление прокаспазы с образованием более короткой каспазы. В мультиплексной настройке микропланшета, Caspase-Glo (Promega Corporation) используют для более быстрого считывания активации каспазы 1.

Анализ активации iNOS:

[00477] Активацию потенциала оксидантной реакции можно измерить по активации iNOS и продуцированию NO с помощью набора для анализа активности NOS (AbCAM) с помощью флуориметрического анализа.

Анализ уничтожения раковых клеток:

[00478] В-клетки Raji используют в качестве клеток, презентующих раковый антиген. Клетки Raji инкубируют с цельноклеточным неочищенным экстрактом раковых клеток и совместно инкубируют с клеточными линиями макрофагов J774. Макрофаги могут разрушать клетки через 1 час после заражения, что обнаруживают с помощью микроскопии или анализа гибели клеток.

Скрининг высокоаффинных антигенсвязывающих доменов:

[00479] Лиганды рака подвергают скринингу на наличие переменных доменов легкой цепи и тяжелой цепи антитела для создания внеклеточных связывающих доменов для CFP. Полноразмерные антитела человека или библиотеки scFv подвергают скринингу. Также потенциальные лиганды используют для иммунизации ламы для разработки новых связывающих доменов иммуноглобулина у ламы и получения однодоменных антител.

[00480] Конкретные полезные домены, идентифицированные в результате скрининга, затем подвергают обратной транскрипции и клонируют в лентивирусные векторы экспрессии для создания конструкций CFP. Рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую CFP, получают с использованием одного или нескольких доменов из внеклеточной, ТМ и цитоплазматической областей высокофагоцитарных рецепторов, полученных при скрининге. Коротко, можно идентифицировать рецепторы плазматической мембраны, демонстрирующие высокие активаторы продуцирования провоспалительных цитокинов и активации инфламмосомы. Биоинформатические исследования могут быть проведены для идентификации функциональных доменов, включая внеклеточные домены активации, трансмембранные домены и внутриклеточные сигнальные домены, например, сайты активации специфических киназ, сайты рекрутирования SH2. Затем эти прошедшие скрининг функциональные домены клонируют в модульные конструкции для создания новых CFP. Это могут быть CFP-кандидаты, и каждую из этих химерных конструкций тестируют на фагоцитарное усиление, продуцирование цитокинов и хемокинов и/или уничтожение опухолевых клеток *in vitro* и/или *in vivo*. Анализ фагоцитоза на основе микрочастиц используют для изучения изменений в фагоцитозе. Коротко, связанные со стрептавидином микрочастицы флуоресцентного полистирола (диаметром 6 мкм) конъюгируют с биотинилированным рекомбинантно экспрессируемым и очищенным раковым лигандом. Миелоидные клетки,

экспрессирующие новый CFP, инкубируют с микрочастицами, покрытыми лигандом, в течение 1-4 часов, и степень фагоцитоза анализируют и количественно определяют с помощью проточной цитометрии. Затем получают плазмидные или лентивирусные конструкции сконструированных CFP и тестируют их в клетках макрофагов на лизис раковых клеток.

### **Конкретные дизайны для клеточно-таргетных CFP**

[00481] Одним аспектом развития рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор для доставки *in vivo*, является обеспечение специфичного для макрофагов захвата, экспрессии и функции CFP в моноцитарных клетках и недопущение экспрессии в не миелоидных клетках, не обладающих фагоцитарной способностью. Соответственно, в одном аспекте CFP сконструирован таким образом, что экспрессия CFP зависит от специфического миелоидного белка. Например, в настоящем документе рассматривается концепция применения миелоидных специфических промоторов для экспрессии CFP. Миелоидный специфический промотор может быть закодирован в векторе или иным образом в рекомбинантной нуклеиновой кислоте в положении выше, и функционально связан с последовательностью, кодирующей CFP. Некоторые промоторы, специфичные для миелоидных клеток, описаны в данной области техники. Например, промотор CD68S представляет собой миелоид-специфический промотор (Scharenberg et al., Nat Commun. **11**, 3327 (2020).)

[00482] В одном аспекте, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой мРНК. В настоящем документе рассматриваются способы специфичной для миелоидных клеток экспрессии, которые можно использовать независимо от того, доставляется ли нуклеиновая кислота в виде мРНК или ДНК. Соответственно, в одном аспекте CFP сконструирован таким образом, что он использует присутствие миелоидного эндогенного белка для собственной экспрессии и функциональности. В одном аспекте, миелоид-специфическая экспрессия CFP достигается за счет конструкции, в которой CFP экспрессируется в мембране только тогда, когда он димеризуется (или мультимеризуется) с одним моноцит-специфичным белком. В некоторых вариантах осуществления, миелоид-специфическая функциональность CFP достигается за счет конструкции, в которой CFP экспрессируется на мембране только тогда, когда он димеризуется (или мультимеризуется) с моноцит-специфичным белком. Рецепторы FcR альфа олигомеризуются с гамма-рецепторами FcR для мембранной экспрессии на миелоидных клетках и/или функции. Несколько рецепторов Fc (FcR) эндогенно экспрессируются в моноцитах и миелоидных клетках. После их перекрестного связывания иммунными комплексами, FcR играют различные роли, такие как модулирование иммунного ответа высвобождаемыми цитокинами или фагоцитоз. FcR-альфа рецепторы и FcR-гамма рецепторы олигомеризуются через трансмембранные домены.

[00483] В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит трансмембранный домен и/или внутриклеточный домен Fc рецептора, которые олигомеризуются с эндогенным FcR.

[00484] FcR и характер их клеточной экспрессии показаны ниже в таблице 3:

**Таблица 3.**

<b>Рецептор</b>	<b>Экспрессируется в (тип клетки)</b>	<b>Характеристика олигомеризации или ассоциации на клеточной мембране</b>
FcγR1 (CD64)	Моноциты/макрофаги	Димер цепи FcRγ
FcγRIIA (CD32a)	Моноциты/макрофаги	нет
FcγRIIB (CD32b)	В-клетки, DC, тучные клетки	нет
FcγRIIC (CD32c)	НК-клетки/моноциты/макрофаги/нейтрофилы	нет
FcγRIIA (CD16)	НК-клетки/моноциты/макрофаги	Димер цепи FcRγ
FcγRIIB (CD16b)	Нейтрофилы, эозинофилы, базофилы	нет
FcαR1 (CD89)	Моноциты/макрофаги/нейтрофилы/DC/клетки Купфера	Димер цепи FcRγ
FcμR	Лимфоциты	нет
FcεR1	Базофилы, тучные клетки	Димер цепи FcRγ и β-цепи

[00485] Типовые последовательности FcR доменов, используемые при конструировании химерных рецепторов слитых белков, описанных в настоящем документе, представлены в таблице 4.

[00486] Таблица 4

1a	<b>Последовательность ТМ CD16 человека, встроенная в CFP (включает внеклеточный шарнирный домен)</b>	
	GLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSV	
	Внеклеточный шарнирный домен	GLAVSTISSFFPPGYQV
	ТМ домен	SFCLVMVLLFAVDTGLYFSV
1b	<b>Цитоплазматический домен CD16 человека</b>	
	KTNIRSSTRDWKDNKFKWRKDPQDK	
2a	<b>Последовательность ТМ CD89 человека, встроенная в CFP (включает внеклеточный шарнирный домен)</b>	
	IHQDYTTQNLIRMAVAGLVLLAILV	

	Внеклеточный шарнирный домен	IHQDYTTQN
	ТМ домен	LIRMAVAGLVLVALLAILV
2b	<b>Цитоплазматический домен CD89 человека</b>	
	ENWHSHTALNKEASADVAEPSWSQQMCQPGLTFARTPSVCK	

[00487] В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит трансмембранный домен, полученный из трансмембранного домена белка, выбранного из FcγR1 (CD64). В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит трансмембранный домен, полученный из трансмембранного домена белка, выбранного из FcγRIIA (CD16). В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит трансмембранный домен, полученный из трансмембранного домена белка, выбранного из FcγRIIA (CD32a). В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит трансмембранный домен, полученный из трансмембранного домена белка, выбранного из FcαR1 (CD89). Любой из доменов в CFP, описанных в настоящем документе, может происходить от подходящего млекопитающего либо в зависимости от происхождения любых других соседних доменов, либо независимо от него. Трансмембранные домены млекопитающих, отличных от человека, рассматриваются в объеме настоящего описания.

[00488] В некоторых вариантах осуществления, CFP может содержать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных остатков белка, из которого получен TMD, во внеклеточном домене. В некоторых вариантах осуществления, CFP может содержать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 или более аминокислотных остатков из белка, из которого получен TMD, во внутриклеточном домене.

[00489] В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит внутриклеточный домен белка FcγR1 (CD64), FcγRIIA (CD16) или FcγRIIA (CD32a), из которого получен TMD. В некоторых вариантах осуществления, TMD имеет последовательность, идентичную последовательности TMD белка FcγR1 (CD64), FcγRIIA (CD16) или FcγRIIA (CD32a).

[00490] Конструкции CFP, специфичные для миелоидных клеток, предназначены для включения трансмембранного домена, который димеризуется с эндогенным Fc-гамма рецептором, который специфически экспрессируется в миелоидной клетке, тем самым становясь функционально активным в результате димеризации.

[00491] В некоторых вариантах осуществления, конструкции CFP, специфичные для миелоидных клеток, содержат трансмембранный домен FcαR1 (CD89). В некоторых вариантах осуществления, конструкции CFP, специфичные для миелоидных клеток, содержат трансмембранный домен FcαR1 (CD89) человека. В некоторых вариантах осуществления, конструкции CFP, специфичные для миелоидных клеток, содержат трансмембранный домен FcαR1 (CD89) мыши. В некоторых вариантах осуществления, конструкции CFP, специфичные для миелоидных клеток, содержат трансмембранный домен FcαR1 (CD89) грызунов. В некоторых вариантах осуществления, конструкции CFP,

специфичные для миелоидных клеток, содержат трансмембранный домен Fc $\alpha$ R1 (CD89) лошади. В некоторых вариантах осуществления, конструкции CFP, специфичные для миелоидных клеток, содержат трансмембранный домен Fc $\alpha$ R1 (CD89) свиньи. В некоторых вариантах осуществления, конструкции CFP, специфичные для миелоидных клеток, содержат трансмембранный домен Fc $\alpha$ R1 (CD89) овцы. В некоторых вариантах осуществления, CD89 TMD по меньшей мере на 80% гомологичен CD89 TMD человека или мыши. В некоторых вариантах осуществления, CD89 TMD по меньшей мере на 85% гомологичен CD89 TMD человека или мыши. В некоторых вариантах осуществления, CD89 TMD по меньшей мере на 90% гомологичен CD89 TMD человека или мыши. В некоторых вариантах осуществления, CD89 TMD по меньшей мере на 95% гомологичен CD89 TMD человека или мыши.

[00492] В некоторых вариантах осуществления, конструкции CFP, специфичные для миелоидных клеток, содержат трансмембранный домен Fc $\gamma$ RIII (CD16). В некоторых вариантах осуществления, конструкции CFP, специфичные для миелоидных клеток, содержат трансмембранный домен Fc $\gamma$ RIII (CD16) человека. В некоторых вариантах осуществления, конструкции CFP, специфичные для миелоидных клеток, содержат трансмембранный домен Fc $\gamma$ RIII (CD16) мыши. В некоторых вариантах осуществления, конструкции CFP, специфичные для миелоидных клеток, содержат трансмембранный домен Fc $\gamma$ RIII (CD16) грызунов. В некоторых вариантах осуществления, конструкции CFP, специфичные для миелоидных клеток, содержат трансмембранный домен Fc $\gamma$ RIII (CD16) лошади. В некоторых вариантах осуществления, конструкции CFP, специфичные для миелоидных клеток, содержат трансмембранный домен Fc $\gamma$ RIII (CD16) свиньи. В некоторых вариантах осуществления, конструкции CFP, специфичные для миелоидных клеток, содержат трансмембранный домен Fc $\gamma$ RIII (CD16) овцы. В некоторых вариантах осуществления, CD16 TMD по меньшей мере на 80% гомологичен CD16 TMD человека или мыши. В некоторых вариантах осуществления, CD16TMD по меньшей мере на 85% гомологичен CD16 TMD человека или мыши. В некоторых вариантах осуществления, CD16 TMD по меньшей мере на 90% гомологичен CD16 TMD человека или мыши. В некоторых вариантах осуществления, CD16 TMD по меньшей мере на 95% гомологичен CD16 TMD человека или мыши. В одном варианте осуществления Fc  $\gamma$ RIII представляет собой Fc $\gamma$ RIIIA (CD16a).

[00493] В настоящем документе предполагается, что любой CFP, специфичный для миелоидных клеток, может быть сконструирован или получен с использованием TMD из молекулы CD89, молекулы CD16, молекулы CD64 или молекулы CD32a, и CFP, специфичный для миелоидных клеток, имеющий желаемый антигенсвязывающий домен, может быть создан на основе композиций и способов, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, CFP демонстрирует специфичную для миелоидных клеток экспрессию. В некоторых вариантах осуществления, специфичная для миелоидных клеток экспрессия представляет собой зависимую от Fc-гамма экспрессию, то есть, если клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, содержащую конструкцию CFP,

эндогенно экспрессирует Fc-гамма, CFP будет коэкспрессироваться в клетке. В некоторых вариантах осуществления, CFP, даже если он экспрессируется в клетке, отличной от миелоидной клетки, делает это только временно и может быть не поддающимся обнаружению. В некоторых вариантах осуществления, только миелоидная клетка экспрессирует функциональный CFP зависимым от Fc-гамма образом, то есть CFP не является функциональным в клетке, которая эндогенно не экспрессирует Fc-гамма. В некоторых вариантах осуществления, CFP, специфичный для миелоидных клеток, содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном-мишенью, специфичным для раковых клеток, и внутриклеточную область, содержащую 1, 2, 3 или более доменов, например, внутриклеточный сигнальный домен клетки, например, домен рекрутирования киназы PI3. Например, CFP, специфичный для миелоидных клеток, содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном-мишенью CD5. Соответствующий CFP сконструирован в настоящем документе и содержит: внеклеточный домен, содержащий анти-CD5 антитело или его часть, например, анти-CD5 ScFv, шарнирный домен, например, шарнирный домен CD8, трансмембранный домен, способный к димеризации с рецептором Fc-гамма, эндогенно экспрессируемый миелоидной клеткой, и внутриклеточную область, содержащую 1, 2, 3 или более доменов, например, внутриклеточный сигнальный домен клетки, включающий, например, внутриклеточный сигнальный домен CD40 и/или домен рекрутирования киназы PI3.

[00494] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложен TROP2-связывающий CFP (TROP2 связующее), который содержит внеклеточный домен, связывающий TROP2, необязательно короткую шарнирную область, например, содержащую шарнирный домен CD8, трансмембранный домен CD89, необязательно внутриклеточную область CD89, слитую с одним или несколькими внутриклеточным сигнальным доменам, такими как внутриклеточный домен CD40 и домен рекрутирования киназы PI3. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложен TROP2-связывающий CFP (TROP2 связующее), который содержит внеклеточный домен, связывающий TROP2, необязательно короткую шарнирную область, например, содержащую шарнирный домен CD8, трансмембранный домен CD16, необязательно внутриклеточную область CD16, слитый с одним или несколькими внутриклеточным сигнальным доменам, таким как внутриклеточный домен CD40 и домен рекрутирования PI3-киназы. TROP2 CFP может содержать один или несколько человеческих или гуманизированных доменов. В настоящем документе предложен полинуклеотид, например, мРНК или ДНК, содержащий последовательность, кодирующую конструкцию TROP2 CFP, содержащую анти-TROP2 ScFv (TROP2 антиген связующее), слитую с шарнирным доменом CD8, который функционально связан с трансмембранным доменом CD16 или CD89, и внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления, TROP2 CFP, описанный в настоящем документе, демонстрирует экспрессию, специфичную для миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления, CFP TROP2, описанный в настоящем документе, демонстрирует зависимость от Fc-гамма

экспрессию. В некоторых вариантах осуществления, TROP2 CFP, описанный в настоящем документе, демонстрирует неопределяемую экспрессию в Т-клетке, В-клетке, эпителиальной клетке, мышечной клетке, нейронной клетке или любой не миелоидной клетке при введении полинуклеотида *in vivo*. В одном варианте осуществления, TROP2 связующее, имеющее трансмембранный домен CD16, CD89 или CD64, как описано в настоящем документе, кодируемый полинуклеотидом, описанным в настоящем документе, экспрессируется преимущественно в CD14+ клетке при введении полинуклеотида *in vivo*. В одном варианте осуществления TROP2 связующее, имеющее трансмембранный домен CD16, CD89 или CD64, кодируемый полинуклеотидом, описанным в настоящем документе, экспрессируется только CD14+ в клетке при введении полинуклеотида *in vivo*.

[00495] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложен GPC3-связывающий CFP (GPC3 связующее), который содержит внеклеточный GPC3-связывающий домен, необязательно, короткую шарнирную область, например, содержащую шарнирный домен CD8, трансмембранный домен CD89, необязательно, внутриклеточную область CD89, слитую с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными доменами, такими как внутриклеточный домен CD40 и домен рекрутирования PI3-киназы. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложен GPC3-связывающий CFP (GPC3 связующее), который содержит внеклеточный GPC3-связывающий домен, необязательно, короткую шарнирную область, например, содержащую шарнирный домен CD8, трансмембранный домен CD16, необязательно, внутриклеточную область CD16, слитый с одним или несколькими внутриклеточным сигнальным доменам, таким как внутриклеточный домен CD40 и домен рекрутирования PI3-киназы. GPC3 CFP может содержать один или несколько человеческих или гуманизированных доменов. В некоторых вариантах осуществления, GPC3-CFP дополнительно содержит внутриклеточный домен, индуцирующий интерферон.

[00496] В настоящем документе предложен полинуклеотид, например, мРНК или ДНК, содержащий последовательность, кодирующую конструкцию GPC3 CFP, содержащую анти-GPC3 ScFv (связывающий антиген GPC3), слитый с шарнирным доменом CD8, который функционально связан с трансмембранным доменом CD16 или CD89 и внутриклеточным доменом. В некоторых вариантах осуществления, GPC3 CFP, описанный в настоящем документе, демонстрирует специфическую экспрессию миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления, GPC3 CFP, описанный в настоящем документе, демонстрирует зависимость от Fc-гамма экспрессию. В некоторых вариантах осуществления, описанный в настоящем документе GPC3 CFP демонстрирует неопределяемую экспрессию в Т-клетке, В-клетке, эпителиальной клетке, мышечной клетке, нейронной клетке или любой не миелоидной клетке при введении полинуклеотида *in vivo*. В одном варианте осуществления GPC3 связующее, имеющее трансмембранный домен CD16, CD89 или CD64, как описано в настоящем документе, кодируемый

полинуклеотидом, описанным в настоящем документе, экспрессируется преимущественно в CD14+ клетке при введении полинуклеотида *in vivo*. В одном варианте осуществления, GPC3 связывающее, имеющее трансмембранный домен CD16, CD89 или CD64, кодируемый полинуклеотидом, описанным в настоящем документе, экспрессируется только в CD14+ клетке при введении полинуклеотида *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, GPC3 CFP дополнительно содержит внутриклеточный домен, индуцирующий интерферон.

[00497] В настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая. В некоторых вариантах осуществления, GPC3 связывающее, описанное в настоящем документе, используется для лечения рака у субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления, GPC3 связывающее используется для лечения гепатоцеллюлярной карциномы (HCC).

[00498] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложен GP75-связывающий CFP (GP75 связывающее), который содержит внеклеточный связывающий домен GP75, необязательно, короткую шарнирную область, например, содержащую шарнирный домен CD8, трансмембранный домен CD89, необязательно, внутриклеточную область CD89, слитый с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными доменами, такими как внутриклеточный домен CD40 и домен рекрутирования PI3-киназы. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложен GP75-связывающий CFP (GP75 связывающее), который содержит внеклеточный связывающий домен GP75, необязательно, короткую шарнирную область, например, содержащую шарнирный домен CD8, трансмембранный домен CD16, необязательно, внутриклеточную область CD16, слитый с одним или несколькими внутриклеточным сигнальным доменам, таким как внутриклеточный домен CD40 и домен рекрутирования PI3-киназы. CFP GP75 может содержать один или несколько человеческих или гуманизированных доменов. В настоящем документе предложен полинуклеотид, например, мРНК или ДНК, содержащий последовательность, кодирующую конструкцию GP75 CFP, содержащую анти-GP75 ScFv (связывающий антиген GP75), слитый с шарнирным доменом CD8, который функционально связан с трансмембранным доменом CD16 или CD89 и внутриклеточным доменом. В некоторых вариантах осуществления, CFP GP75, описанный в настоящем документе, демонстрирует экспрессию, специфичную для миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления, CFP GP75, описанный в настоящем документе, демонстрирует зависимость от Fc-гамма экспрессию. В некоторых вариантах осуществления, GP75 CFP, описанный в настоящем документе, демонстрирует неопределяемую экспрессию в Т-клетке, В-клетке, эпителиальной клетке, мышечной клетке, нейронной клетке или любой не миелоидной клетке при введении полинуклеотида *in vivo*. В одном варианте осуществления, GP75 связывающее, имеющее трансмембранный домен CD16, CD89 или CD64, как описано в настоящем документе, кодируемый полинуклеотидом, описанным в настоящем документе, экспрессируется преимущественно в CD14+ клетке при введении

полинуклеотида *in vivo*. В одном варианте осуществления GP75 связующее, имеющее трансмембранный домен CD16, CD89 или CD64, кодируемый описанным в настоящем документе полинуклеотидом, экспрессируется только в CD14+ клетке при введении полинуклеотида *in vivo*.

[00499] В некоторых вариантах осуществления, любая из конструкций CFP, описанных в этом разделе, содержит по меньшей мере внутриклеточный сигнальный домен CD40. В некоторых вариантах осуществления, любая из конструкций CFP, описанных в этом разделе, содержит по меньшей мере домен рекрутирования и сигнальный домен PI3-киназы. В некоторых вариантах осуществления, любая из конструкций CFP, описанных в этом разделе, содержит по меньшей мере внутриклеточный сигнальный домен CD40 и домен рекрутирования PI3-киназы. В некоторых вариантах осуществления, конструкции CFP, специфичные для миелоидных клеток, описанные в этом разделе, содержат по меньшей мере три внутриклеточных домена, включая, например, внутриклеточный сигнальный домен CD40 и домен рекрутирования PI3-киназы, а также третий внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, любая из конструкций CFP, описанных в этом разделе, содержит по меньшей мере один внутриклеточный домен, который индуцирует активацию NF-каппа В при активации рецептора. В некоторых вариантах осуществления, любая из конструкций CFP, описанных в этом разделе, содержит по меньшей мере один внутриклеточный домен, который стимулирует продуцирование интерферона при активации рецептора. В некоторых вариантах осуществления, любая из конструкций CFP, описанных в этом разделе, содержит по меньшей мере один внутриклеточный домен, который индуцирует активацию NF-каппа В, и содержит по меньшей мере один внутриклеточный домен, который стимулирует продуцирование интерферона при активации рецептора.

### **Способ получения миелоидных клеток субъекта**

#### **Выделение миелоидных клеток из РВМС:**

[00500] Мононуклеарные клетки периферической крови можно отделить от нормальных донорских лейкоцитарных пленок центрифугированием в градиенте плотности с использованием Histopaque 1077 (Sigma). После промывки, моноциты CD14+ выделяют из фракции мононуклеарных клеток с использованием микрогранул CD14 CliniMACS GMP класса и магнитных колонок для разделения LS (Miltenyi Biotec). Коротко, клетки ресуспендируют до соответствующей концентрации в буфере PEA (фосфатно-солевом буфере [PBS] плюс 2,5 ммоль/л этилендиаминтетрауксусной кислоты [ЭДТК] и сывороточного альбумина человека [0,5% конечного объема Albugex 20%, Octopharma]), инкубируют с микроносителями CliniMACS CD14 в соответствии с инструкциями производителя, затем промывают и пропускают через намагниченную колонку LS. После промывки, очищенные моноциты элюируют из размагниченной колонки, промывают и повторно суспендируют в соответствующей среде для культивирования. Выделение CD14+ клеток из лейкофереза: РВМС могут быть собраны

лейкаферезом от доноров с циррозом печени, которые дали информированное согласие на участие в исследовании. Лейкаферез периферической крови на мононуклеарные клетки (MNC) проводят с помощью системы афереза Optia методом стерильного сбора. Используют стандартную программу сбора для MNC, обрабатывающую 2,5 объема крови. Выделение клеток CD14 проводят с помощью функционально закрытой системы, соответствующей требованиям GMP (системы CliniMACS Prodigy, Miltenyi Biotec). Коротко, продукт лейкафереза отбирают для подсчета клеток и берут аликвоту для проточной цитометрии перед разделением. Определяют долю моноцитов (CD14+) и абсолютное число клеток, и, при необходимости, объем корректируют в соответствии с требуемыми критериями отбора ( $\leq 20 \times 10^9$  общего количества лейкоцитов;  $< 400 \times 10^6$  лейкоцитов/мл;  $\leq 3,5 \times 10^9$  клеток CD14, объем 50-300 мл). Выделение и разделение клеток CD14 проводят с использованием CliniMACS Prodigy с микрогранулами CliniMACS CD14 (класс медицинских устройств III), набором трубок TS510 и программой LP-14. В конце процесса, селектированные CD14+ положительные моноциты промывают в буфере PBS/EDTA (буфер CliniMACS, Miltenyi), содержащем 0,5% альбумина человека фармацевтической степени чистоты (Alburex), затем повторно суспендируют в среде TechMACS (или сравнимой) для культивирования..

*Количество клеток и чистота:*

[00501] Подсчет клеток всех MNC и выделенных фракций моноцитов проводят с использованием автоматического анализатора Sysmex XP-300 (Sysmex). Оценку числа макрофагов проводят с помощью проточной цитометрии с использованием пробирок TruCount (Becton Dickinson) для определения абсолютного числа клеток, поскольку Sysmex постоянно занижает количество моноцитов. Чистоту разделения оценивают с помощью проточной цитометрии (FACSCanto II, BD Biosciences) с панелью антител против лейкоцитов человека (CD45-VioBlue, CD15-FITC, CD14-PE, CD16-APC), и качество продукта оценивают путем определения количество загрязнений нейтрофилами (CD45int, CD15pos).

*Культура клеток - разработка культур с образцами здоровых доноров.*

[00502] Исследуют оптимальную культуральную среду для дифференциации макрофагов, и три кандидата тестируют с использованием клеточного продукта. Кроме того, исследуют влияние криоконсервации моноцитов на получение миелоидных клеток и макрофагов для терапевтического использования. Функциональные анализы проводят для количественной оценки фагоцитарной способности миелоидных клеток и макрофагов и их способности к дальнейшей поляризации, и фагоцитарного потенциала, как описано в другом месте в описании.

*Полномасштабная валидация процесса с использованием рассматриваемых образцов*

[00503] Моноциты, культивированные в результате лейкафереза из выделения Prodigy, культивируют в концентрации  $2 \times 10^6$  моноцитов на  $\text{cm}^2$  и на мл в культуральных пакетах (пакеты для дифференциации MACS GMP, Miltenyi) с TechMACS класса GMP

(Miltenyi) и 100 нг/мл M-CSF. Моноциты культивируют с 100 нг/мл рекомбинантного M-CSF человека, соответствующего требованиям GMP (R&D Systems). Клетки культивируют во влажной атмосфере при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 7 дней. Во время культивирования, дважды (2 и 4 дни) пополняют 50% объема среды, удаляя 50% среды, затем подкармливают свежей средой с добавлением 200 нг/мл M-CSF (для восстановления конечной концентрации 100 нг/мл).

*Сбор клеток:*

[00504] Для нормальных макрофагов донорского происхождения, клетки удаляют из лунок на 7 день с использованием буфера для диссоциации клеток (Gibco, Thermo Fisher) и пасты. Клетки ресуспендируют в PEA буфере и подсчитывают, затем для проточной цитометрии окрашивают примерно  $1 \times 10^6$  клеток на тест. Макрофаги, полученные в результате лейкофереза, удаляют из культуральных мешков на 7 день с использованием буфера PBS/EDTA (буфер CliniMACS, Miltenyi), содержащего 0,5% альбумина человека из сыворотки фармацевтической степени чистоты (HAS; Alburex). Собранные клетки ресуспендируют в эксципиенте, состоящем из двух лицензированных продуктов: 0,9% солевого раствора для инфузии (Baxter) с 0,5% альбумина человека (Alburex).

*Характеризация проточной цитометрией:*

[00505] Экспрессию маркеров клеточной поверхности моноцитов и макрофагов анализируют с помощью проточного цитометра FACSCanto II (BD Biosciences) или MACSQuant 10 (Miltenyi). Как правило, для каждого образца получают приблизительно 20000 событий. Экспрессию лейкоцитарных маркеров на клеточной поверхности в свежeweделенных и созревших на 7 день клетках осуществляют путем инкубации клеток со специфическими антителами (конечное разведение 1:100). Клетки инкубируют в течение 5 мин с блоком FcR (Miltenyi), затем инкубируют при 4°C в течение 20 мин с коктейлями антител. Клетки промывают в PEA и добавляют краситель для исключения мертвых клеток DRAQ7 (BioLegend) в соотношении 1:100. Клетки окрашивают на ряд поверхностных маркеров: CD45-VioBlue, CD14-PE или CD14-PerCP-Vio700, CD163-FITC, CD169-PE и CD16-APC (все Miltenyi), CCR2-BV421, CD206-FITC, CXCR4-PE и CD115-APC (все BioLegend), и 25F9-APC и CD115-APC (eBioscience). И моноциты, и макрофаги гейтируют для исключения дублета, дублетов и мертвых клеток с использованием прямого и бокового рассеяния и дискриминатора мертвых клеток DRAQ7 (BioLegend) и анализируют с помощью программного обеспечения FlowJo (Tree Star). На основе первоначального подробного фенотипирования, разрабатывают панель критериев высвобождения (CD45-VB/CD206-FITC/CD14-PE/25F9 APC/DRAQ7), которая определяет развитие функциональных макрофагов из моноцитов. Макрофаги определяют как имеющие среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) в пять раз превышающую уровень моноцитов в 0 день как для 25F9, так и для CD206. Разрабатывают вторую панель, которая оценивает другие маркеры как часть расширенной панели, состоящей из CCR2-BV421/CD163-FITC/CD169-PE/CD14-PerCP-Vio700/CD16-APC/DRAQ7), но не

используют как часть Критериев выпуска клеточного продукта.

[00506] Моноциты и макрофаги выделяют из слоя лейкоцитарной пленки, образованного в образце центрифугирования в градиенте сахарозы выделенных клеток периферической крови. Клетки CD14 проверяют на фагоцитарное поглощение с использованием микроносителей pH-Rodo, которые флуоресцируют только при попадании в кислые эндосомы. Коротко, моноциты или макрофаги культивируют с 1-2 мкл биочастиц pH-Rodo Escherichia coli (Life Technologies, Thermo Fisher) в течение 1 ч, затем среду удаляют и клетки промывают для удаления не фагоцитированных частиц. Фагоцитоз оценивают с помощью микроскопа EVOS (Thermo Fisher), получают изображения и количественно определяют клеточное поглощение микроносителей с использованием программного обеспечения ImageJ (NIH). Способность к поляризации в сторону определенных дифференцированных макрофагов исследуют путем обработки макрофагов 7 дня с IFN $\gamma$  (50 нг/мл) или IL-4 (20 нг/мл) в течение 48 часов, чтобы вызвать поляризацию в сторону фенотипа M1 или M2 (или M[IFN $\gamma$ ] к M[IL-4], соответственно). Через 48 часов клетки визуализируют с помощью микроскопии светлого поля EVOS, затем собирают и фенотипируют, как выше. Дальнейший анализ проводят на профиле секреции цитокинов и факторов роста макрофагами после генерации и в ответ на воспалительные стимулы. Макрофаги могут быть получены из лейкоцитарных пленок здоровых доноров, как выше, и либо оставлены без обработки, либо стимулированы TNF $\alpha$  (50 нг/мл, Peprotech) и полиинозиновой:полицитидиловой кислотой (поли I:C, вирусным гомологом, который связывает TLR3, 1 мкг/мл, Sigma) для имитации условий, присутствующих в воспаленной печени, или липополисахаридом (LPS, 100 нг/мл, Sigma) плюс IFN $\gamma$  (50 МЕ/мл, Peprotech) для обеспечения максимальной активации макрофагов. Макрофаги 7 дня инкубируют в течение ночи, и супернатанты собирают и центрифугируют для удаления дебриса, и затем хранят при -80°C до тестирования. Анализ секрета проводят с использованием набора 27-plex цитокинов человека и набора 9-plex матриксных металлопротеаз, запускаемых на мультиплексном ридере планшетов для иммуноферментного анализа Magpix (BioRad).

*Стабильность продукта:*

[00507] Во время разработки процесса можно протестировать различные эксципиенты, включая буфер PBS/ЭДТК; буфер PBS/ЭДТК с 0,5% HAS (Alburex), 0,9% солевой раствор отдельно или солевой раствор с 0,5% HAS. Было обнаружено, что 0,9% солевой раствор (Baxter) с 0,5% эксципиентом HAS поддерживает оптимальную жизнеспособность клеток и фенотип (данные не показаны). Стабильность макрофагов от доноров с циррозом после сбора исследуют в трех прогонах оптимизации процесса и в более ограниченном диапазоне моментов времени, оцениваемых в прогонах валидации процесса (n=3). После сбора и ресуспендирования в эксципиенте (0,9% солевой раствор для инфузии, 0,5% сывороточный альбумин человека), пакеты хранят при температуре окружающей среды (21-22°C), и образцы берут через 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 30 и 48 ч после сбора. Панель антител с критериями высвобождения анализируют для каждого образца, и

жизнеспособность и среднее кратное изменение с 0 дня измеряют из геометрической MFI 25F9 и CD206.

*Статистический анализ:*

[00508] Результаты могут быть выражены как среднее значение  $\pm$  CO. Статистическую значимость различий оценивают, где это возможно, с помощью непарного двустороннего t-критерия с использованием GraphPad Prism 6. Результаты можно считать статистически значимыми, если значение  $P < 0,05$ .

[00509] Также в настоящем документе предложена клетка, содержащая описанную в настоящем документе композицию, описанный в настоящем документе вектор или описанный в настоящем документе полипептид. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой фагоцитирующую клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку, происходящую из стволовой клетки, миелоидную клетку, макрофаг, дендритную клетку, лимфоцит, тучную клетку, моноцит, нейтрофил, микроглию или астроцит. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой аутологичную клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой аллогенную клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку M1. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку M2. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку макрофага M1. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку макрофага M2. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой миелоидную клетку M1. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой миелоидную клетку M2.

[00510] Также в настоящем документе предложен способ лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой солидный рак. В некоторых вариантах осуществления, солидный рак выбран из группы, состоящей из рака яичников, подходящие виды рака включают рак яичников, рак почки, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак печени, рак головного мозга, лимфому, лейкоз, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак легких. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления, гемобластоз представляет собой лейкоз или лимфому. В некоторых вариантах осуществления, гемобластоз представляет собой Т-клеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления, заболевание представляет собой Т-клеточное злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой NSCLC. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой HCC.

[00511] В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение субъекту дополнительного терапевтического агента. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный терапевтический агент выбран из группы, состоящей из

агониста CD47, агента, ингибирующего Ras, агента, ингибирующего Cdc42, агента, ингибирующего ГТФазу, агента, способствующего разборке F-актина, агента, способствующего рекрутированию PI3K в PFP, агента, способствующего активности PI3K, агента, способствующего выработке фосфатидилинозит-3,4,5-трифосфата, агента, способствующего активности ARHGAP12, агента, способствующего активности ARHGAP25, агента, способствующего активности SH3BP1 и любой их комбинации.

[00512] В некоторых вариантах осуществления, введение включает инфузию или инъекцию. В некоторых вариантах осуществления, введение включает введение непосредственно в солидный рак. В некоторых вариантах осуществления, введение включает процедуру доставки на основе кольцевой РНК, процедуру доставки на основе мРНК, инкапсулированной без частиц, процедуру доставки на основе мРНК, процедуру доставки на основе вируса, процедуру доставки на основе частиц, процедуру доставки на основе липосом или процедуру доставки на основе экзосом. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта индуцируется CD4<sup>+</sup> Т-клеточный ответ или CD8<sup>+</sup> Т-клеточный ответ.

[00513] В настоящем документе также предложен способ получения клетки, включающий контакт клетки с композицией, описанной в настоящем документе, вектором, описанным в настоящем документе, или полипептидом, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, контакт включает трансдукцию. В некоторых вариантах осуществления, контакт включает химическую трансфекцию, электропорацию, нуклеофекцию или вирусную инфекцию или трансдукцию.

[00514] В настоящем документе предложен способ введения терапевтического агента, включающего любую из композиций, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент вводят парентеральным путем.

[00515] В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент вводят внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент вводят внутривенным путем. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент вводят путем подкожного введения.

[00516] В настоящем документе также предложен способ приготовления фармацевтической композиции, содержащей одну или несколько рекомбинантных нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе, и липид в водной композиции, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит вектор, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, липид включает формирование липидной наночастицы.

#### **Доставка рекомбинантной нуклеиновой кислоты *in vitro* и *in vivo***

[00517] В одном аспекте, рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая химерный антигенный рецептор, инкапсулирована в подходящую липидную наночастицу, которая входит в состав терапевтической композиции для доставки *in vivo*. Рекомбинантная нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК, кольцевую РНК

или мРНК. В некоторых вариантах осуществления, для введения нуклеиновой кислоты внутрь клетки можно использовать «голую» ДНК или матричную РНК (мРНК). В некоторых вариантах осуществления, ДНК или мРНК, кодирующие химерный слитый белок, вводят в фагоцитирующую клетку путем инкапсуляции липидных наночастиц (LNP). мРНК может быть оптимизирована по кодонам. В некоторых вариантах осуществления, мРНК может содержать одно или несколько модифицированных или не существующих в природе оснований, таких как 5'-метилцитозин или псевдоуридин. мРНК может иметь длину 50-10000 оснований. В одном аспекте, трансген доставляется в виде мРНК. мРНК может содержать более примерно 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 оснований. В некоторых вариантах осуществления, мРНК может иметь длину более 10000 оснований. В некоторых вариантах осуществления, мРНК может иметь длину примерно 11000 оснований. В некоторых вариантах осуществления, мРНК может иметь длину примерно 12000 оснований.

[00518] В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция, доставляемая субъекту локально или системно, содержит матричную РНК, кодирующую химерный слитый белок, описанный в настоящем документе, связанный с одним или несколькими липидными компонентами. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько липидных компонентов могут содержать катионный липид. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько липидных компонентов могут содержать не катионный липид. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько липидных компонентов могут содержать полярный липид и/или не полярный липид. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько липидных компонентов могут содержать нейтральный липид. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько липидных компонентов могут содержать конъюгированный липид. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько липидных компонентов могут содержать липосому вокруг мРНК. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько липидных компонентов могут содержать липидную наночастицу, инкапсулирующую мРНК.

[00519] Инкапсулированная LNP ДНК или РНК может быть использована для трансфекции миелоидных клеток, таких как моноциты или макрофаги, или может быть введена субъекту. LNP может быть разработана для таргетной доставки для поглощения миелоидной клеткой при локальной или системной доставке субъекту. В некоторых вариантах осуществления, LNP может содержать один или несколько таргетных групп, таких как антитело или лиганд, или биомолекула, или ее часть, которая связывается с поверхностным элементом миелоидной клетки и способствует поглощению мРНК, инкапсулированной в LNP, миелоидными клетками. В некоторых вариантах осуществления, LNP может таргетировать ткань с помощью одного или нескольких антител, лигандов, связывающих агентов, аптамеров, которые могут быть связаны или включены в LNP.

[00520] В одном варианте осуществления, LNP содержит один или несколько полимеров.

[00521] В одном варианте осуществления, LNP содержит синтетический полимер.

[00522] В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит катионный липид. В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит не катионный липид. В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит нейтральный липид. В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит один или несколько ПЭГилированных липидов. В некоторых вариантах осуществления, LNP имеет диаметр от примерно 100 нм до примерно 200 нм. В некоторых вариантах осуществления, LNP имеет диаметр примерно 150 нм, например 80-120 нм, 100-140 нм, 100-130 нм, 70-140 нм, 80-150 нм или 90-180 нм. В некоторых вариантах осуществления, LNP имеет диаметр менее 100 нм, например менее 90 нм или менее 80 нм.

[00523] В некоторых вариантах осуществления, средство доставки представляет собой любой из липидных носителей, как описано выше, например, свободно связанные липидные компоненты с рекомбинантными нуклеиновыми кислотами, инкапсулирующие липосомы или LNP, и где мРНК сконструирована для предпочтительной экспрессии в миелоидных клетках, как описано в другом месте в спецификации.

[00524] В некоторых вариантах осуществления, мРНК с носителем для доставки, описанным где-либо в описании, используется для составления композиции для *in vitro* доставки мРНК, кодирующей CFP, в миелоидную клетку, такую как моноцит, в популяции клеток, содержащей моноцит, где миелоидную клетку, содержащую мРНК, кодирующую CFP, вводят в состав фармацевтической композиции для доставки субъекту-млекопитающему, такому как субъект-человек. В некоторых вариантах осуществления, мРНК содержит CFP, который содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с TROP2, как описано в спецификации. В некоторых вариантах осуществления, мРНК с носителем для доставки, описанным где-либо в описании, используется для составления фармацевтической композиции для доставки субъекту-млекопитающему, такому как субъект-человек. В некоторых вариантах осуществления, мРНК содержит последовательность, кодирующую CFP, который содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с TROP2, как описано в описании. В некоторых вариантах осуществления, мРНК, содержащая последовательность, кодирующую TROP2-связывающий CFP, и средство доставки, специфически поглощается миелоидной клеткой в гетерогенной популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления, мРНК, содержащая последовательность, кодирующую TROP2-связывающий CFP, специфически поглощается миелоидными и не миелоидными клетками в гетерогенной популяции клеток, но экспрессируется и/или функционирует только в миелоидных клетках в гетерогенной популяции клеток.

[00525] В некоторых вариантах осуществления, мРНК, описанная выше, подвергается электропорации в клетку. В некоторых вариантах осуществления, композиция, содержащая мРНК, подвергается электропорации в клетку *in vitro*. В

некоторых вариантах осуществления, мРНК связана с одним или несколькими липидными компонентами, как описано выше, например, в LNP. В некоторых вариантах осуществления, композицию, содержащую мРНК (содержащую, например, один или несколько липидных компонентов), подвергают электропорации в миелоидную клетку в гетерогенной популяции клеток *in vitro*, сконструированной и оптимизированной для доставки в миелоидную клетку.

#### **Модификации конструкции CFP для функциональных улучшений**

[00526] В одном аспекте, в настоящем документе предложена композиция, содержащая одну или несколько последовательностей рекомбинантных нуклеиновых кислот, содержащих: (A) первую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую экзогенный полипептид; (B) вторую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую слитый белок химерного антигенного рецептора (CFP), где CFP содержит: (a) внутриклеточную сигнальную субъединицу, содержащую внутриклеточный сигнальный домен, имеющий один или несколько тирозиновых остатков, которые фосфорилируются при связывании антигена с помощью рецептора; (b) трансмембранный домен и (c) внеклеточный связывающий домен, обладающий специфичностью связывания в отношении компонента на поверхности клетки-мишени, где внеклеточный связывающий домен функционально связан с трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной субъединицей; и (d) домен активатора транскрипции, функционально связанный с внутриклеточной сигнальной субъединицей последовательностью расщепления протеазой, где домен активатора транскрипции способствует транскрипции первой последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей экзогенный полипептид; и (C) третью последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую (i) протеазу, которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, функционально связывающую домен активатора транскрипции с внутриклеточной сигнальной субъединицей; (ii) домен, который связывается с тирозиновыми остатками, которые фосфорилируются при активации CFP; где протеаза, которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, и домен, который связывается с тирозиновыми остатками, функционально связаны. В некоторых вариантах осуществления, третья последовательность нуклеиновых кислот дополнительно кодирует (iii) чувствительный к стимулу элемент. В некоторых вариантах осуществления, чувствительный к стимулу элемент (iii) слит с доменом, который связывается с фосфорилированными тирозиновыми остатками. В некоторых вариантах осуществления, чувствительный к стимулу элемент (iii) отвечает на микроокружение клетки, которая экспрессирует последовательность нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько рекомбинантных нуклеиновых кислот экспрессируются в миелоидной клетке.

[00527] В некоторых вариантах осуществления, чувствительный к стимулу элемент (iii) слит с доменом, который связывается с фосфорилированными тирозиновыми остатками. В некоторых вариантах осуществления, чувствительный к стимулу элемент

отвечает на микроокружение клетки, которая экспрессирует последовательность нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления, (iii) представляет собой дегрон, функционально связанный с (ii). В некоторых вариантах осуществления, дегрон представляет собой дегрон HIF-1a.

[00528] В некоторых вариантах осуществления, домен активатора транскрипции содержит домен трансактивации VP64. В некоторых вариантах осуществления, протеаза, которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, которая функционально связывает домен активатора транскрипции с внутриклеточной сигнальной субъединицей, представляет собой протеазу NS3 вируса гепатита С (HCV). В некоторых вариантах осуществления, домен, который связывается с тирозиновыми остатками, которые фосфорилируются при активации CFP, представляет собой связывающий домен фосфотирозина (РТВ). В некоторых вариантах осуществления, РТВ представляет собой Sch РТВ.

[00529] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой РНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой мРНК. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой кольцевую РНК.

[00530] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота связана с репликоном РНК. В настоящем документе предложен способ получения терапевтических миелоидных клеток против рака, включающий экспрессию в миелоидных клетках рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей: (А) первую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую экзогенный полипептид; (В) вторую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный антигенный рецептор миелоидной клетки (CFP), где CFP содержит: (а) внутриклеточную сигнальную субъединицу, содержащую внутриклеточный сигнальный домен, содержащий тирозиновые остатки, которые фосфорилируются при активации CFP; (b) трансмембранный домен и (с) внеклеточный связывающий домен, обладающий специфичностью связывания в отношении компонента на поверхности клетки-мишени, где внеклеточный связывающий домен функционально связан с трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной субъединицей; и (d) домен активатора транскрипции, функционально связанный с внутриклеточной сигнальной субъединицей последовательностью расщепления протеазой, где домен активатора транскрипции способствует транскрипции первой последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей экзогенный полипептид; и (С) третью последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую (i) протеазу, которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, функционально связывающую домен активатора транскрипции с внутриклеточной сигнальной субъединицей; (ii) домен, который связывается с тирозиновыми остатками, которые фосфорилируются при активации CFP; где протеаза,

которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, и домен, который связывается с тирозиновыми остатками, функционально связаны.

[00531] В настоящем документе предложен способ получения терапевтических миелоидных клеток против рака, включающий экспрессию в миелоидных клетках рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный белок, содержащий: (а) кислотный домен главного основного белка эозинофилов человека; (b) последовательность узнавания MMP; и (с) цитотоксический домен главного основного белка эозинофилов человека.

[00532] В настоящем документе предложен способ лечения субъекта, страдающего раком, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, описанной выше. В настоящем документе предложен способ лечения субъекта, страдающего раком, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе. В настоящем документе предложен способ индукции регрессии опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающий внутривенное введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей миелоидные клетки, где миелоидные клетки экспрессируют одну или несколько рекомбинантных нуклеиновых кислот, кодирующих один или несколько полипептидов, и где по меньшей мере один из одного или нескольких полипептидов функционально активен в микроокружении опухоли и неактивен в не опухолевом окружении.

*Химерные антигенные рецепторы с модульным распознаванием и внутренними программируемыми переключателями*

[00533] Основные цели при конструировании иммунотерапевтического агента охватывают (1) специфичность заболевания, которая заключается в том, что терапевтический агент будет активным в очаге заболевания и будет действовать специфически на больные клетки; (2) программируемость, которая включает в себя то, что терапевтический агент может быть запрограммирован или предназначен для выполнения его желаемой функции в желаемое время и в желаемом месте.

[00534] В одном аспекте, настоящее изобретение охватывает разработку химерных антигенных рецепторов, которые могут воспринимать и использовать микроокружение заболевания и превращать его в создание выходной функции, противодействующей заболеванию. В одном варианте осуществления, это упоминается как функция переключения. В основном, представляющие интерес рекомбинантные белки, описанные в настоящем документе, используют передачу сигнала в системе заболевания, такой как микроокружение опухоли (ТМЕ), для осуществления переключения. Например, ТМЕ богат матричной металлопротеиназой (ММР), которая используется в качестве триггера для расщепления пептида, который активирует компонент химерного белка и обеспечивает его функцию. Это гарантирует, что функция иммунотерапевтической клетки является специфической и не распространяется на все клетки в организме, что снижает вероятность токсичности, связанной с иммунотерапией.

Создание таргетных программируемых химерных конструкций для терапии миелоидных клеток

[00535] В настоящем документе предложен способ получения миелоидной клетки для иммунотерапии, где миелоидная клетка экспрессирует экзогенную рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок, который индуцируется в микроокружении опухоли. Например, миелоидная клетка для иммунотерапии содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, которая экспрессирует химерный рецептор, по меньшей мере, часть которого активируется в микроокружении опухоли (ТМЕ). В некоторых вариантах осуществления, миелоидная клетка для иммунотерапии содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, которая кодирует провоспалительный белок, или проапоптотический белок, или литический белок, экспрессия которых находится под контролем индуцируемого активатора транскрипции. В состоянии покоя, активатор транскрипции остается слитым с не-ядерным белком. Достигнув окружения опухоли, активатор транскрипции высвобождается для ядерной локализации и трансактивации нуклеиновой кислоты, кодирующей провоспалительный белок, или проапоптотический белок, или литический белок, путем отщепления от слитого белка. Такой функциональный результат может быть достигнут путем модульного конструирования рекомбинантных белков и их экспрессии в миелоидной клетке.

[00536] В одном варианте осуществления, расщепляемый активатор транскрипции может быть сконструирован путем вставки расщепляемой последовательности, которая расщепляется не эндогенной протеазой. В некоторых вариантах осуществления, активатор транскрипции слит с трансмембранным белком, например, химерным рецептором (CFP). В некоторых вариантах осуществления, CFP содержит ICD с одним или несколькими доменами ITAM, содержащими один или несколько тирозиновых остатков, которые активируются при активации рецептора. Подразумевается, что активация рецептора происходит при контакте рецептора с раковой клеткой через внеклеточный связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления, типовая модульная конструкция индуцируемого активатора транскрипции может быть получена таким образом: домен активатора транскрипции функционально связан с внутриклеточной сигнальной субъединицей посредством не эндогенной последовательности расщепления протеазой; где не эндогенная протеаза кодируется рекомбинантной нуклеиновой кислотой, которая экспрессируется в той же клетке. Не эндогенная протеаза может быть сконструирована таким образом, что она слита и функционально связана с другим белковым доменом, который связывается с тирозиновыми остатками, которые фосфорилируются при активации CFP для активации. Домен, который связывается с фосфорилированными тирозиновыми остатками, представляет собой фосфотирозин-связывающий домен (PTB). При активации CFP фосфорилируется ITAM, домен PTB, в свою очередь, может быть активирован доменами ITAM, и активированный домен PTB, в свою очередь, может активировать протеазу, которая может отщеплять домен активатора транскрипции от цитоплазматического конца CFP, тем самым высвобождая активатор транскрипции для

ядерной локализации.

[00537] Кроме того, слитый белок протеаза-РТВ может быть слит с дегроном, который инициирует деградацию РТВ и протеазы в неактивном состоянии. В одном варианте осуществления, дегрон представляет собой последовательность дегрон HIF 1-альфа (HIF 1-а), которая естественным образом расщепляется в нормоксических условиях. Следовательно, РТВ-протеаза будет разрушаться в клетке, находящейся в нормоксическом состоянии, то есть в кровотоке или в нормальной (не опухолевой) ткани. С другой стороны, когда клетка, экспрессирующая белки, находится в гипоксической тканевой среде, РТВ-протеаза больше не деградирует и находит родственные фосфорилированные остатки, которые находятся в активированной внутриклеточной последовательности CFP. Более того, при связывании комплекса дегрон-РТВ с внутриклеточным остатком фосфотирозина в CFP-ICD, дегрон инактивируется при контакте с частью ICD (см. ФИГ. 2В). Таким образом, рекомбинантный белок может быть сконструирован следующим образом: рекомбинантный белок содержит (i) CFP, включающий внеклеточный домен, который связывается с компонентом на поверхности раковой клетки или опухолевой клетки, и связывание активирует рецептор (CFP), где CFP содержит трансмембранный и внутриклеточный домен (ICD), где ICD содержит домены ИТАМ, которые активируются и фосфорилируются при активации рецептора; (ii) комплекс дегрон-РТВ-протеаза, который необязательно может кодироваться тем же вектором, кодирующим рекомбинантную нуклеиновую кислоту, и образует пре-белок с дегрон-РТВ-протеазой, фланкированной авторасщепляемой последовательностью T2A; (iii) активатор транскрипции, функционально связанный с внутриклеточным доменом CFP через расщепляемую последовательность, которая является субстратом протеазы. Кроме того, миелоидная клетка коэкспрессирует нуклеиновую кислоту под влиянием промотора или активатора транскрипции, то есть отвечает на активатор транскрипции, функционально связанный с внутриклеточным доменом CFP через расщепляемую последовательность. При активации CFP посредством взаимодействия с раковой клеткой, ИТАМ в ICD фосфорилируется, активированный домен ИТАМ облегчает связывание РТВ и его активацию, в то же время связывание инактивирует дегрон, который в противном случае разрушает свободный (не связанный с остатками фосфотирозина в ИТАМ, неактивный) комплекс дегрон-РТВ-протеаза. Активированный РТВ активирует протеазу и стабилизирует (в отсутствие активности дегрона), которая, в свою очередь, расщепляет активатор транскрипции для ядерной локализации.

[00538] Примеры протеаз, которые можно использовать в первом слитом белке, включают протеазы вируса гепатита С (например, NS3 и NS2-3); сигнальную пептидазу; пропротеинконвертазы семейства субтилизин/кексин (фурин, PC1, PC2, PC4, PACE4, PCS, PC); пропротеинконвертазы, расщепляющие гидрофобные остатки (например, Leu, Phe, Val или Met); пропротеинконвертазы, расщепляющие малые аминокислотные остатки, такие как Ala или Thr; проопиомеланокортинпревращающий фермент (PCE); аспарагиновую протеазу хромаффинных гранул (CGAP); прогормонтиолпротеазу;

карбоксипептидазы (например, карбоксипептидазу E/H, карбоксипептидазу D и карбоксипептидазу Z); аминопептидазы (например, аргининаминопептидазу, лизинаминопептидазу, аминопептидазу B); пролилэндопептидазу; аминопептидазу N; фермент, разрушающий инсулин; кальпаин; высокомолекулярную протеазу; и каспазы 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9. Другие протеазы включают, но не ограничены ими, аминопептидазу N; пурамицинчувствительную аминопептидазу; ангиотензинпревращающий фермент; пироглутамилпептидазу II; дипептидилпептидазу IV; N-аргинин двухосновную конвертазу; эндопептидазу 24,15; эндопептидазу 24,16; секретазы белка-предшественника амилоида альфа, бета и гамма; секретазу, превращающую ангиотензинпревращающий фермент; секретазу TGF-альфа; секретазу TNF-альфа; секретазу лиганда FAS; секретазы рецепторов TNF-I и -II; секретазу CD30; секретазы KL1 и KL2; секретазу рецептора IL6; CD43, секретазу CD44; секретазы CD16-I и CD16-II; L-селектинсекретазу; секретазу рецептора фолиевой кислоты; MMP 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15; плазминогеновый активатор урокиназы; плазминогеновый активатор ткани; плазмин; тромбин; BMP-1 (проколлаген C-пептидазу); ADAM 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и 11; и гранзимы A, B, C, D, E, F, G и H.

[00539] В некоторых вариантах осуществления, протеаза представляет собой протеазу NS3 неструктурного белка 3 вируса гепатита С (HCV). В некоторых вариантах осуществления, расщепляемая последовательность NS3 представляет собой EDVVCC. В некоторых вариантах осуществления, расщепляемая последовательность NS3 представляет собой DEMEEC.

[00540] В некоторых вариантах осуществления, активатор транскрипции содержит ДНК-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления, ДНК-связывающий домен представляет собой домен GAL4. В некоторых вариантах осуществления, ДНК-связывающий домен представляет собой домен ZFHD1 или tetR. В некоторых вариантах осуществления, активатор транскрипции содержит домен трансактивации VP64 (тетрамерный повтор минимального домена активации (аминокислоты 437-447) белка простого герпеса VP16).

[00541] В некоторых вариантах осуществления, дегрон представляет собой HIF-дегрон.

[00542] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложены одна или несколько рекомбинантных нуклеиновых кислот, содержащих: (A) первую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую экзогенный полипептид; (B) вторую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую химерный антигенный рецептор (CFP), где CFP содержит: (a) внутриклеточную сигнальную субъединицу, содержащую внутриклеточный сигнальный домен, содержащий тирозиновые остатки, которые фосфорилируются при активации CFP; (b) трансмембранный домен и (c) внеклеточный связывающий домен, обладающий специфичностью связывания в отношении компонента на поверхности клетки-мишени, где внеклеточный связывающий домен функционально связан с трансмембранным доменом и внутриклеточной

сигнальной субъединицей; и (d) домен активатора транскрипции, функционально связанный с внутриклеточной сигнальной субъединицей через последовательность расщепления протеазой, где домен активатора транскрипции способствует транскрипции первой последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей экзогенный полипептид; и (C) третью последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую (i) протеазу, которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, функционально связывающую домен активатора транскрипции с внутриклеточной сигнальной субъединицей; (ii) домен, который связывается с тирозиновыми остатками, которые фосфорилируются при активации CFP; где протеаза, которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, и домен, который связывается с тирозиновыми остатками, функционально связаны.

[00543] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложена рекомбинантная нуклеиновая кислота для модульного полипептида, который может быть экспрессирован в миелоидной клетке для применения в иммунотерапии. Рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует химерный белок, содержащий: (a) цитотоксический полипептид; (b) последовательность расщепления протеазой; и (c) ингибирующий полипептидный домен, где ингибирующий полипептидный домен ингибирует цитотоксический полипептид; где цитотоксический полипептид, последовательность расщепления протеазой и домен ингибиторного полипептида функционально связаны. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксический полипептид представляет собой цитотоксический домен главного основного белка эозинофилов человека. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксический полипептид представляет собой кислотный домен главного основного белка эозинофилов человека. В некоторых вариантах осуществления, последовательность расщепления протеазой представляет собой последовательность распознавания MMP. В некоторых вариантах осуществления, последовательность расщепления протеазой расщепляется MMP.

[00544] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько доменов в первом фагоцитарном ICD содержат мутацию.

[00545] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько доменов во втором ICD содержат мутацию для усиления связывающего киназу домена, для создания сайта фосфорилирования, для создания сайта стыковки SH2 или их комбинации.

#### Коэкспрессия воспалительного гена

[00546] В одном аспекте рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую провоспалительный ген, который коэкспрессируется с химерным рецептором в сконструированной клетке. В некоторых вариантах осуществления, провоспалительный ген представляет собой цитокин. Примеры включают, но не ограничены ими, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CSF, GMCSF или IL-12 или интерфероны.

[00547] Рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая провоспалительный

ген, может быть моноцистронной, где две кодирующие последовательности для (а) CFP и (b) провоспалительного гена посттранскрипционно или посттрансляционно расщепляются для независимой экспрессии.

[00548] В некоторых вариантах осуществления, две кодирующие последовательности содержат саморасщепляющийся домен, кодирующий, например, последовательность P2A.

[00549] В некоторых вариантах осуществления, две кодирующие области разделены сайтом IRES.

[00550] В некоторых вариантах осуществления, две кодирующие последовательности кодируются бицистронным генетическим элементом. Области, кодирующие (а) CFP и (b) провоспалительный ген, могут быть однонаправленными, каждая из которых находится под отдельным регулирующим контролем. В некоторых вариантах осуществления, области кодирования для обоих являются двунаправленными и движутся в противоположных направлениях. Каждая кодирующая последовательность находится под отдельным регуляторным контролем.

[00551] Коэкспрессия провоспалительного гена предназначена для обеспечения сильной воспалительной стимуляции макрофагов и активации окружающих тканей для воспаления.

Химерные антигенные рецепторы для усиления внутриклеточной передачи сигналов и активации воспаления

[00552] В одном аспекте, рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует химерный внутриклеточный домен в дополнение к внеклеточному связывающему домену, трансмембранный домен и, в некоторых случаях, часть или весь внутриклеточный домен рецептора. Внутриклеточный домен предназначен для мощной провоспалительной иммунной активации, например, когда макрофаги участвуют в борьбе с инфекцией. Химерный внутриклеточный домен (или, в зависимости от обстоятельств, второй ICD) слит с цитоплазматическим концом химерного рецептора, так что ICD функционально связан с внеклеточным доменом, и активация внеклеточного домена может активировать слитый ICD. Этот ICD обеспечивает второй сигнал, необходимый для запуска провоспалительных сигналов. В одном варианте осуществления, провоспалительный сигнал представляет собой сигнал для активации инфламмосомы. Nod-подобные рецепторы (NLR) представляют собой подмножество рецепторов, которые образуют компоненты пути воспаления. Эти рецепторы активируются при врожденном иммунном ответе и олигомеризуются с образованием мультибелковых комплексов, которые служат платформами для рекрутирования провоспалительных каспаз и вызывают их расщепление и активацию. Это приводит к прямой активации ROS и часто приводит к насильственной гибели клеток, известной как пироптоз. Существует четыре комплекса инфламмосом: NLRP1m, NLRP3, IPAF и AIM2.

[00553] Микроокружение опухоли (TME) представляет собой иммунодепрессивную среду. Влияние IL-10, глюкокортикоидные гормоны,

апоптотические клетки и иммунные комплексы могут нарушать врожденную функцию иммунной клетки. Иммунные клетки, включая фагоцитарные клетки, приобретают толерогенный фенотип. У макрофагов этот фенотип, широко известный как фенотип M2, отличается от фенотипа M1, где макрофаги являются мощными и способны убивать патогены. Макрофаги, подвергшиеся воздействию LPS или IFN- гамма, например, могут поляризоваться в сторону фенотипа M1, тогда как макрофаги, подвергшиеся воздействию IL-4 или IL-13, поляризуются в сторону фенотипа M2. LPS или IFB-гамма могут взаимодействовать с толл-подобным рецептором 4 (TLR4) на поверхности макрофагов, индуцирующих пути Trif и MyD88, индуцирующих активацию факторов транскрипции IRF3, AP-1 и NFkB и, таким образом, активирующих TNF гены, гены интерферона, CXCL10, NOS2, IL-12 и т.д., которые необходимы для провоспалительного ответа M1 макрофагов. Точно так же, IL-4 и IL-13 связываются с IL-4R, активируя путь Jak/Stat6, который регулирует экспрессию CCL17, ARG1, IRF4, IL-10, SOCS3 и т. д., которые являются генами, связанными с противовоспалительным ответом (ответом M2). Экспрессия CD14, CD80, D206 и низкая экспрессия CD163 являются индикаторами поляризации макрофагов в сторону фенотипа M1.

[00554] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует один или несколько дополнительных внутриклеточных доменов, включающих цитоплазматический домен для воспалительного ответа. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок химерного рецептора, содержащего цитоплазматический домен для воспалительного ответа в сконструированных макрофагах вызывает мощный провоспалительный ответ, сходный с фенотипом M1.

[00555] В некоторых вариантах осуществления, цитоплазматический домен для воспалительного ответа может представлять собой сигнальные трансдуцирующие домены или области TLR3, 4, 9, MYD88, TRIF, RIG-1, MDA5, CD40, рецептора IFN, NLRP-1-14, NOD1, NOD2, Пирин, AIM2, NLRC4, CD40.

[00556] В некоторых вариантах осуществления, экспрессия рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок химерного рецептора содержит провоспалительный цитоплазматический домен для активации сигнального каскада IL-1.

[00557] В некоторых вариантах осуществления, цитоплазматическая часть химерного рецептора содержит цитоплазматический домен толл-подобного рецептора, такой как внутриклеточные сигнальные домены толл-подобного рецептора 3 (TLR3), толл-подобного рецептора 4 (TLR4), толл-подобного рецептора 7 (TLR7), толл-подобного рецептора 8 (TLR8), толл-подобного рецептора 9 (TLR9).

[00558] В некоторых вариантах осуществления, цитоплазматическая часть химерного рецептора содержит подходящую область киназы 1, ассоциированной с рецептором интерлейкина-1 (IRAK1).

[00559] В некоторых вариантах осуществления, цитоплазматическая часть химерного рецептора содержит подходящую область белка первичного ответа

дифференциации (MYD88).

[00560] В некоторых вариантах осуществления, цитоплазматическая часть химерного рецептора содержит подходящую область из белка миелина и лимфоцитов (MAL).

[00561] В некоторых вариантах осуществления, цитоплазматическая часть химерного рецептора содержит подходящую область гена, индуцируемого ретиноевой кислотой (RIG-1).

[00562] В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен химерного рецептора содержит трансмембранный домен любого из MYD88, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9, MAL, IRAK1, белки.

[00563] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный внутриклеточный сигнальный домен содержит первую часть, полученную из фагоцитарного, и вторую часть, полученную из не фагоцитарного рецептора, где вторая часть, полученная из не фагоцитарного рецептора, содержит сайт фосфорилирования. В некоторых вариантах осуществления, сайт фосфорилирования содержит аминокислотные последовательности, подходящие для сайта аутофосфорилирования. В некоторых вариантах осуществления, фосфорилируемый аминокислотный остаток представляет собой тирозин. В некоторых вариантах осуществления, сайт фосфорилирования содержит аминокислотные последовательности, подходящие для фосфорилирования киназами семейства Src. В некоторых вариантах осуществления, сайт фосфорилирования содержит аминокислотные последовательности, которые при фосфорилировании способны связываться с SH2-доменами киназы. В некоторых вариантах осуществления, рецепторный тирозинкиназный домен слит с цитоплазматическим концом химерного рецептора в дополнение к первой цитоплазматической части.

[00564] В некоторых вариантах осуществления, сайт фосфорилирования представляет собой сайт фосфорилирования тирозина.

[00565] В некоторых вариантах осуществления, второй внутриклеточный домен представляет собой иммунорецепторный активирующий тирозиновый мотив (ITAM). Типовые мотивы ITAM присутствуют в белках иммуноглобулина  $\alpha$  и  $\beta$  млекопитающих, рецепторах TCR $\gamma$ , субъединицах рецепторов FCR $\gamma$ , рецепторах цепей CD3 и молекуле активации NFAT.

[00566] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит один мотив ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит более одного мотива ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит два или более мотивов ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит три или более мотивов ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит четыре или более мотивов ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит пять или более мотивов ITAM. В

некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит шесть или более мотивов ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит семь или более мотивов ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит восемь или более мотивов ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит девять или более мотивов ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен химерного рецептора содержит десять или более мотивов ITAM.

[00567] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько доменов в первом фагоцитарном ICD содержат мутацию.

[00568] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько доменов во втором ICD содержат мутацию для усиления связывающего домена киназы, для создания сайта фосфорилирования, для создания сайта стыковки SH2 или их комбинации.

**Полинуклеиновая кислота, кодирующая специфичный для миелоидных клеток химерный антигенный рецептор, в виде готовых терапевтических композиций**

[00569] В настоящем документе впервые представлены терапевтически эффективные композиции, которые можно приготовить и хранить для использования нуждающимся в этом субъектом в любой момент времени. Терапевтически эффективные композиции содержат композиции нуклеиновых кислот, имеющие последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP). Полинуклеотид, кодирующий CFP, содержит (i) последовательность, кодирующую внеклеточный антигенсвязывающий домен, например, ScFv, (ii) последовательность, кодирующую трансмембранный домен, способный к димеризации с трансмембранным доменом Fc-гамма рецептора при экспрессии в клетке, и (iii) последовательность, кодирующую внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективная композиция содержит, помимо вышеуказанного, средство доставки. В некоторых вариантах осуществления, средство доставки содержит липидную наночастицу. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, т.е. полинуклеотид, представляет собой мРНК.

[00570] В настоящем документе предложены конструкции экспрессии, специфичные для миелоидных клеток, кодирующие CFP, где CFP содержит (i) последовательность, кодирующую внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном-мишенью, где связывающий домен содержит специфическое антитело-мишень или его фрагмент, например, scFv, например, scFv, который связывается с антигеном-мишенью, экспрессируемым на раковой клетке, (ii) последовательность, кодирующую трансмембранный домен, способный к димеризации с трансмембранным доменом Fc-гамма рецептора при экспрессии в клетке, и (iii) последовательность, кодирующую один или несколько внутриклеточных доменов, содержащих сигнальный домен, который может активировать передачу внутриклеточного сигнала для активации фагоцитоза, секреции воспалительных цитокинов и/или иммунной активации в клетке,

экспрессирующей конструкцию; где экспрессирующие конструкции представляют собой полинуклеотид, инкапсулированный в липидную наночастицу для доставки. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид представляет собой мРНК.

[00571] В настоящем документе представлены конструкции экспрессии, специфичные для миелоидных клеток, кодирующие CFP, где CFP содержит (i) последовательность, кодирующую внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном-мишенью, например антигеном-мишенью, экспрессируемым на раковой клетке, например, CD5, HER2, TROP2, GPC3, GP75, CD19, CD7, CD22 или любым другим возможным антигеном-мишенью, (ii) последовательность, кодирующую трансмембранный домен, способный к димеризации с трансмембранным доменом Fc-гамма рецептора при экспрессии в клетке, например, CD89 TMD, CD16 TMD, CD64 TMD или CD32a TMD, и (iii) последовательность, кодирующую один или несколько внутриклеточных доменов, содержащих сигнальный домен, который может активировать передачу внутриклеточного сигнала для активации фагоцитоза, секреции воспалительных цитокинов и/или иммунной активации в клетке, экспрессирующей конструкцию; где конструкции экспрессии представляют собой полинуклеотиды, где конструкция экспрессии инкапсулирована в липидную наночастицу для доставки. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид представляет собой мРНК.

[00572] Терапевтически эффективная композиция представляет собой фармацевтическую композицию. Фармацевтическая композиция пригодна для доставки *in vivo*, например, пригодна для доставки нуждающемуся в этом человеку.

[00573] В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическую композицию, содержащую конструкции экспрессии, специфичные для миелоидных клеток, кодирующие CFP, необходимо хранить при надлежащей температуре и условиях для сохранения в ней композиции.

[00574] Описанная в настоящем документе терапевтически эффективная композиция может быть доставлена внутривенно, внутримышечно, подкожно, интраорбитально, интракраниально, подоболочечно, интраназально или любым подходящим способом введения.

[00575] Также в настоящем документе рассматриваются миелоидные клетки, содержащие конструкции экспрессии, специфичные для миелоидных клеток, кодирующие CFP, в качестве терапевтической композиции, которая может быть составлена как готовый продукт для субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления, миелоидные клетки подвергают электропорации с конструкцией, кодирующей CFP, где CFP содержит (i) последовательность, кодирующую внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном-мишенью, например антигеном-мишенью, экспрессируемым на раковой клетке, например, CD5, HER2, TROP2, GPC3, GP75, CD19, CD7, CD22 или любым другим возможным антигеном-мишенью, (ii) последовательность, кодирующую трансмембранный домен, способный к димеризации с трансмембранным доменом Fc-гамма рецептора при экспрессии в клетке, для например,

CD89 TMD, CD16 TMD, CD64 TMD или CD32a TMD, и (iii) последовательность, кодирующую один или несколько внутриклеточных доменов, содержащих сигнальный домен, который может активировать передачу внутриклеточного сигнала для активации фагоцитоза, секреции воспалительных цитокинов и/или иммунной активации. Миелоидные клетки входят в состав композиции для доставки *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, такие композиции подходят для доставки *in vivo* нуждающемуся в этом человеку.

#### [00576] ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

1. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок (CFP), включающая:

(а) субъединицу фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), содержащую:

(i) трансмембранный домен, или

(ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и

(b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен CD137, который может специфически связываться с CD137 на клетке-мишени; где внеклеточный и трансмембранный домены функционально связаны.

2. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок, содержащую: (а) первый связывающий домен антигена CD137, который специфически связывается с антигеном CD137 на клетке-мишени, и (b) второй связывающий домен, который специфически связывается с поверхностным агентом на миелоидной клетке; где связывание первого антигенсвязывающего домена с антигеном CD137 происходит на клетке-мишени и связывание второго связывающего домена с поверхностным агентом происходит на миелоидной клетке.

3. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок (CFP), содержащий: (а) субъединицу фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), включающую: (i) трансмембранный домен, или (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и (b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен Клаудина 18.2, который может специфически связываться с Клаудином 18.2 на клетке-мишени; где внеклеточный и трансмембранный домены функционально связаны.

4. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок, содержащую: (а) первый антигенсвязывающий домен Клаудина 18.2, который специфически связывается с антигеном Клаудина 18.2 на клетке-мишени, и (b) второй связывающий домен, который специфически связывается с поверхностным агентом на миелоидной клетке; где связывание первого антигенсвязывающего домена с антигеном Клаудина 18.2 происходит на клетке-мишени и связывание второго связывающего домена с поверхностным агентом происходит на миелоидной клетке.

5. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок (CFP), содержащий: (а) субъединицу фагоцитарного рецептора

или рецептора прикрепления (PR), содержащую: (i) трансмембранный домен, или (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и (b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен Клаудина 3, который может специфически связываться с Клаудином 3 на клетке-мишени; где внеклеточный и трансмембранный домены функционально связаны.

6. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок, содержащий: (a) первый связывающий домен антигена Клаудина 3, который специфически связывается с антигеном Клаудина 3 на клетке-мишени, и (b) второй связывающий домен, который специфически связывается с поверхностным агентом на миелоидной клетке; где связывание первого антигенсвязывающего домена с антигеном Клаудина 18.2 происходит на клетке-мишени и связывание второго связывающего домена с поверхностным агентом происходит на миелоидной клетке.

7. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок (CFP), содержащий: (a) субъединицу фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), содержащую: (i) трансмембранный домен, или (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и (b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен CD70, который может специфически связываться с CD70 на клетке-мишени; где внеклеточный и трансмембранный домены функционально связаны.

8. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок, содержащую: (a) первый связывающий домен антигена CD70, который специфически связывается с антигеном CD70 на клетке-мишени, и (b) второй связывающий домен, который специфически связывается с поверхностным агентом на миелоидной клетке; где связывание первого антигенсвязывающего домена с антигеном CD70 происходит на клетке-мишени и связывание второго связывающего домена с поверхностным агентом происходит на миелоидной клетке.

9. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок (CFP), содержащий: (a) субъединицу фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), содержащую: (i) трансмембранный домен, или (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и (b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен TROP2, который может специфически связываться с TROP2 на клетке-мишени; где внеклеточный и трансмембранный домены функционально связаны.

10. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок, содержащую: (a) первый антигенсвязывающий домен TROP2, который специфически связывается с антигеном TROP2 на клетке-мишени, и (b) второй связывающий домен, который специфически связывается с поверхностным агентом на миелоидной клетке; где связывание первого антигенсвязывающего домена с антигеном TROP2 происходит на клетке-мишени и связывание второго связывающего домена с поверхностным агентом происходит на миелоидной клетке.

11. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок (CFP), содержащий: (a) субъединицу фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), содержащую: (i) трансмембранный домен, или (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и (b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен TМPRSS, который может специфически связываться с TМPRSS на клетке-мишени; где внеклеточный и трансмембранный домены функционально связаны.

12. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный гибридный белок, содержащий: (a) первый связывающий домен антигена TМPRSS, который специфически связывается с антигеном TМPRSS на клетке-мишени, и (b) второй связывающий домен, который специфически связывается с поверхностным агентом на миелоидной клетке; где связывание первого антигенсвязывающего домена с антигеном TМPRSS происходит на клетке-мишени и связывание второго связывающего домена с поверхностным агентом происходит на миелоидной клетке.

13. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок (PFP) фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), содержащий: (a) субъединицу PR, содержащую: (i) трансмембранный домен, и (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и (b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 1, 3, 5, 7, 9 или 11, обладающий сильной аффинностью связывания с антигеном клетки-мишени; где трансмембранный домен и внеклеточный домен функционально связаны; и где при связывании PFP с антигеном клетки-мишени, убивающая или фагоцитарная активность клетки, экспрессирующей PFP, увеличивается по меньшей мере более чем на 20% по сравнению с клеткой, не экспрессирующей PFP.

14. Композиция по любому из вариантов осуществления, 1, 3, 5, 7, 9, 11 или 13, отличающаяся тем, что внутриклеточный сигнальный домен получен из фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления, или где внутриклеточный сигнальный домен содержит домен активации фагоцитоза.

15. Композиция по любому из вариантов осуществления, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 14, отличающаяся тем, что внутриклеточный сигнальный домен содержит провоспалительный сигнальный домен.

16. Композиция по любому из вариантов осуществления, 1, 3, 5, 7, 9, 11 или 13-15, отличающаяся тем, что провоспалительный сигнальный домен содержит домен активации киназы или связывающий домен киназы.

17. Композиция по любому из вариантов осуществления, 1, 3, 5, 7, 9, 11 или 13-16, отличающаяся тем, что внутриклеточный сигнальный домен содержит домен рекрутирования киназы PI3.

18. Композиция по любому из вариантов осуществления, 1, 3, 5, 7, 9, 11 или 13-17, отличающаяся тем, что провоспалительный сигнальный домен содержит домен активации

сигнального каскада IL-1.

19. Композиция по любому из вариантов осуществления, 1, 3, 5, 7, 9, 11 или 13-18, отличающаяся тем, что провоспалительный сигнальный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из TLR3, TLR4, TLR7, TLR 9, TRIF, RIG-1, MYD88, MAL, IRAK1, MDA-5, IFN-рецептора, члена семейства NLRP, NLRP1-14, NOD1, NOD2, пирина, AIM2, NLRC4, FCGR3A, FCERIG, CD40, домена каспазы или домена связывания прокаспазы или любой их комбинации.

20. Композиция по любому из вариантов осуществления 1, 3, 5, 7, 9, 11 и 13-19, дополнительно содержащая трансмембранный домен, полученный из домена ТМ белка CD2, CD8, CD28 или CD68.

21. Композиция по любому из вариантов осуществления 1, 3, 5, 7, 9, 11 и 13-20, дополнительно содержащая шарнирный домен.

22. Композиция по любому из вариантов осуществления, 1, 3, 5, 7, 9, 11 или 13-22, отличающаяся тем, что при связывании PFP с антигеном клетки-мишени, убивающая активность клетки, экспрессирующей PFP, увеличивается по меньшей мере более чем на 20% по сравнению с клеткой, не экспрессирующей PFP.

23. Композиция по любому из вариантов осуществления, 1, 3, 5, 7, 9, 11 или 13-22, отличающаяся тем, что при связывании PFP с антигеном клетки-мишени, убивающая активность клетки, экспрессирующей PFP, увеличивается по меньшей мере 1,1-кратно по сравнению с клеткой, не экспрессирующей PFP.

24. Композиция по любому из вариантов осуществления, 2, 4, 6, 8, 10 или 12, содержащая первый терапевтический агент, где терапевтический агент содержит:

а. первый связывающий домен, где первый связывающий домен представляет собой первое антитело или его функциональный фрагмент, которое специфически взаимодействует с антигеном на клетке-мишени, и

б. второй связывающий домен, где второй связывающий домен представляет собой второе антитело или его функциональный фрагмент, которое специфически взаимодействует с миелоидной клеткой;

где,

(i) первый терапевтический агент связан с первым компонентом, где первый компонент представляет собой дополнительный терапевтический агент или третий связывающий домен, или

(ii) композиция содержит дополнительный терапевтический агент.

25. Композиция по любому из вариантов осуществления, 2, 4, 6, 8, 10, 12 или 24, где терапевтический агент содержит: (а) первый связывающий домен, который специфически взаимодействует с антигеном клетки-мишени, (б) второй связывающий домен, который специфически взаимодействует с миелоидной клеткой, и (с) третий связывающий домен, который специфически взаимодействует с миелоидной клеткой.

26. Композиция по любому из вариантов осуществления, 1-25, отличающаяся тем, что любой из связывающих доменов терапевтического агента содержит связывающий

домен антитела, функциональный фрагмент антитела, его вариабельный домен,  $V_H$  домен,  $V_L$  домен, VNAR домен,  $V_{HH}$  домен, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), Fab, однодоменное антитело (sdAb), нанотело, биспецифическое антитело, диатело или функциональный фрагмент или их комбинацию.

27. Композиция по любому из вариантов осуществления, 1-26, отличающаяся тем, что антиген на клетке-мишени, с которой связывается первый связывающий домен, представляет собой раковый антиген, или патогенный антиген на клетке-мишени, или аутоиммунный антиген.

28. Композиция по любому из вариантов осуществления, 2, 4, 6, 8, 10, 12 или 24, отличающаяся тем, что первый терапевтический агент содержит полипептид длиной менее 1000 аминокислот или 1000 нм.

29. Композиция по любому из вариантов осуществления, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28, отличающаяся тем, что первый терапевтический агент содержит полипептид длиной менее 500 аминокислот или 500 нм.

30. Композиция по любому из вариантов осуществления, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 28 или 29, отличающаяся тем, что первый терапевтический агент содержит полипептид длиной 200-1000 аминокислот или 200-1000 нм.

31. Композиция по любому из вариантов осуществления, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-30, отличающаяся тем, что взаимодействие связывающих доменов первого терапевтического агента обеспечивает контакт раковой клетки с миелоидной клеткой.

32. Композиция по любому из вариантов осуществления, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-31, отличающаяся тем, что второй связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой и способствует фагоцитарной активности миелоидной клетки.

33. Композиция по любому из вариантов осуществления, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-32, отличающаяся тем, что второй связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой и способствует передаче сигналов воспаления миелоидной клетки.

34. Композиция по любому из вариантов осуществления, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-33, отличающаяся тем, что второй связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой или молекулой адгезии и способствует адгезии миелоидной клетки к клетке-мишени.

35. Композиция по любому из вариантов осуществления, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-34, отличающаяся тем, что второй связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой и ингибирует анти-фагоцитарную активность миелоидной клетки, опосредованную клеткой-мишенью.

36. Композиция по любому из вариантов осуществления, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-35, отличающаяся тем, что второй связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой и ингибирует противовоспалительную активность миелоидной клетки, опосредованную клеткой-мишенью.

37. Композиция по любому из вариантов осуществления, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-36, где второй и/или третий связывающий домен способствует фагоцитарной

активности миелоидной клетки.

38. Композиция по любому из вариантов осуществления, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-37, где второй и/или третий связывающий домен способствует передаче сигналов воспаления миелоидной клетки.

39. Композиция по любому из вариантов осуществления, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-38, где второй и/или третий связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой или молекулой адгезии и способствует адгезии миелоидной клетки к клетке-мишени.

40. Композиция по любому из вариантов осуществления, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-39, отличающаяся тем, что второй и/или третий связывающий домен ингибирует антифагоцитарную активность миелоидной клетки, опосредованную клеткой-мишенью.

41. Композиция по любому из вариантов осуществления, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-40, отличающаяся тем, что второй и/или третий связывающий домен ингибирует противовоспалительную активность миелоидной клетки, опосредованную клеткой-мишенью.

42. Композиция по любому из вариантов осуществления, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-41, отличающаяся тем, что третий связывающий домен или дополнительный терапевтический агент содержит антагонист CD47, блокатор CD47, антитело, химерный рецептор CD47, сиалидазу, цитокин, провоспалительный ген, прокаспазу или противораковый агент.

43. Композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что первый связывающий домен, второй связывающий домен и третий связывающий домен связываются с различными не идентичными антигенами-мишенями.

44. Композиция по любому из вариантов осуществления, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-43, отличающаяся тем, что первый связывающий домен, второй связывающий домен или третий связывающий домен представляют собой лигандсвязывающий домен.

45. Композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что первый, второй или третий связывающие домены функционально связаны одним или несколькими линкерами.

46. Композиция по варианту осуществления 45, отличающаяся тем, что линкер представляет собой полипептид.

47. Композиция по варианту осуществления 46, отличающаяся тем, что линкер представляет собой функциональный пептид.

48. Композиция по любому из вариантов осуществления, 45-47, где линкер представляет собой лиганд для рецептора.

49. Композиция по варианту осуществления 45, отличающаяся тем, что линкер представляет собой лиганд для моноцитарного или макрофагального рецептора.

50. Композиция по любому из вариантов осуществления, 45-49, отличающаяся тем, что линкер активирует рецептор.

51. Композиция по любому из вариантов осуществления, 45-50, отличающаяся тем,

что линкер ингибирует рецептор.

52. Композиция по варианту осуществления 51, отличающаяся тем, что линкер представляет собой лиганд для рецептора макрофага M2.

53. Композиция по варианту осуществления 48 или 49, где линкер представляет собой лиганд для рецептора TLR, такого как TLR4.

54. Композиция по любому из вариантов осуществления 48, 49 или 50, отличающаяся тем, что линкер активирует рецептор TLR.

55. Композиция по любому из вариантов осуществления 45-54, отличающаяся тем, что первый, второй и/или третий связывающие домены связаны с маской, которая связывается со связывающим доменом.

56. Композиция по варианту осуществления 55, отличающаяся тем, что маска представляет собой ингибитор, который ингибирует взаимодействие связывающего домена с его мишенью, когда маска остается связанной с соответствующим связывающим доменом.

57. Композиция по варианту осуществления 56, отличающаяся тем, что маска связана со связывающим доменом через пептидный линкер.

58. Композиция по варианту осуществления 57, отличающаяся тем, что пептидный линкер содержит расщепляемую группу.

59. Композиция по варианту осуществления 57, отличающаяся тем, что расщепляемая группа расщепляется белком или ферментом, селективно избыточным в очаге рака или опухоли.

60. Композиция по любому из вариантов осуществления, 1-59, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой РНК.

61. Композиция по любому из вариантов осуществления, 1-60, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.

62. Композиция по любому из вариантов осуществления, 1-61, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота связана с одним или несколькими липидами.

63. Композиция по любому из вариантов осуществления, 1-61, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота инкапсулирована в липосому.

64. Композиция по варианту осуществления 63, где липосома представляет собой наночастицу.

65. Композиция по любому из вариантов осуществления, 1-64, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота содержится в векторе.

66. Фармацевтическая композиция, содержащая любую из рекомбинантных нуклеиновых кислот из композиций по вариантам осуществления 1-65 и приемлемый эксципиент.

67. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой, по любому из вариантов осуществления 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-59.

68. Клетка, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту по любому из

вариантов осуществления 1-67.

69. Клетка по варианту осуществления 68, отличающаяся тем, что клетка представляет собой миелоидную клетку, например CD14+ клетку.

70. Клетка по варианту осуществления 69, где клетка является CD14+, CD16-.

71. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток, содержащих рекомбинантную нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 1-66, где по меньшей мере 50% клеток являются CD14+CD16-.

72. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 71, отличающаяся тем, что менее 10% клеток представляют собой дендритные клетки.

73. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 71 или 72, дополнительно содержащая подходящий эксципиент.

74. Способ получения любой из композиций по вариантам осуществления, 1-73.

75. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 71-73.

76. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 66; или фармацевтической композиции по варианту осуществления 67.

77. Способ по варианту осуществления 75 или 76, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака яичников, рака почки, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака печени, рака головного мозга, лимфомы, лейкоза, рака кожи, рака поджелудочной железы, колоректального рака, глиобластомы и рака легких.

78. Композиция, содержащая рекомбинантную полинуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP), где CFP содержит: (а) внеклеточный домен, содержащий анти-опухолеассоциированный антигенсвязывающий домен, и (b) трансмембранный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом; где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен из белка, который димеризуется с эндогенным рецептором FcR-гамма в миелоидной клетке, и где рекомбинантная полинуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP), при экспрессии в клетке является функциональной в миелоидной клетке и не функциональной в не миелоидной клетке.

79. Композиция по варианту осуществления 78, отличающаяся тем, что экспрессия CFP обнаруживается в миелоидной клетке через 24, 36, 48 или 72 часа после трансфекции рекомбинантной нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность, кодирующую CFP, и не обнаруживается в не миелоидной клетке через 24, 36, 48 или 72 часа после трансфекции ими.

80. Композиция, содержащая рекомбинантную полинуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP), где CFP содержит:

(a) внеклеточный домен, содержащий анти-опухолеассоциированный антигенсвязывающий домен, и

(b) трансмембранный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом; где рекомбинантная полинуклеиновая кислота инкапсулирована средством доставки наночастиц; и где после введения композиции субъекту-человеку, CFP экспрессируется на поверхности миелоидных клеток субъекта-человека.

81. Композиция, содержащая рекомбинантную полинуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP), где CFP содержит:

(a) внеклеточный домен, содержащий домен, анти-опухолеассоциированный трансдуктор кальциевого сигнала-2 (анти-TROP2), и

(b) трансмембранный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом; где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен из белка, который димеризуется с эндогенными рецепторами FcR-гамма в миелоидных клетках; где рекомбинантная полинуклеиновая кислота инкапсулирована средством доставки наночастиц; и где после введения композиции субъекту-человеку, CFP экспрессируется на поверхности миелоидных клеток субъекта-человека.

82. Композиция по варианту осуществления 78, отличающаяся тем, что анти-TROP2 связывающий домен содержит Fab фрагмент, scFv домен или sdAb домен.

83. Композиция по варианту осуществления 1, отличающаяся тем, что внеклеточный домен или трансмембранный домен представляет собой внеклеточный домен или трансмембранный домен из CD8, CD16a, CD64, CD68 или CD89.

84. Композиция по варианту осуществления 78, отличающаяся тем, что внеклеточный домен дополнительно содержит шарнирный домен, полученный из CD8, где шарнирный домен функционально связан с трансмембранным доменом и анти-TROP2 связывающий домен.

85. Композиция по варианту осуществления 78, отличающаяся тем, что трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен белка, который димеризуется с эндогенными FcR-гамма рецепторами в миелоидных клетках, моноцитах или макрофагах; где после введения фармацевтической композиции субъекту-человеку, CFP специфически экспрессируется в миелоидных клетках, моноцитах или макрофагах субъекта-человека.

86. Композиция по варианту осуществления 85, отличающаяся тем, что трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен из CD16a, CD64, CD68 или CD89.

87. Композиция по варианту осуществления 78, отличающаяся тем, что CFP дополнительно содержит внутриклеточный домен.

88. Композиция по варианту осуществления 87, отличающаяся тем, что внутриклеточный домен содержит один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов, и где один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов содержат

внутриклеточный сигнальный домен из FcγR, FcαR, FcεR, CD40 или CD3дзета.

89. Композиция по варианту осуществления 87, отличающаяся тем, что один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов дополнительно содержат домен рекрутирования фосфоинозитид-3-киназы (PI3K).

90. Композиция по варианту осуществления 89, отличающаяся тем, что домен рекрутирования PI3K содержит последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 26.

91. Композиция по варианту осуществления 87, отличающаяся тем, что внутриклеточный домен содержит внутриклеточный домен из CD16a, CD64, CD68 или CD89.

92. Композиция по варианту осуществления 78, отличающаяся тем, что рекомбинантная полинуклеиновая кислота представляет собой мРНК.

93. Композиция по варианту осуществления 78, отличающаяся тем, что средство доставки наночастиц содержит липидную наночастицу.

94. Композиция по варианту осуществления 93, отличающаяся тем, что липидная наночастица содержит полярный липид.

95. Композиция по варианту осуществления 93, отличающаяся тем, что липидная наночастица содержит неполярный липид.

96. Композиция по варианту осуществления 93, отличающаяся тем, что липидная наночастица имеет диаметр от 100 до 300 нм.

97. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по варианту осуществления 78 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

98. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 97, отличающаяся тем, что фармацевтическая композиция содержит эффективное количество композиции по варианту осуществления 78 для ингибирования роста рака при введении человеку с раком.

99. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 97 или 98.

100. Способ введения композиции по варианту осуществления 78 в миелоидную клетку, включающий:

электропорацию миелоидной клетки в присутствии рекомбинантной полинуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP), где CFP содержит:

(a) внеклеточный домен, содержащий анти-TROP2 связывающий домен, и

(b) трансмембранный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом; где рекомбинантная полинуклеиновая кислота

(i) присутствует в миелоидной клетке, или

(ii) инкапсулирована средством доставки наночастиц;

где рекомбинантная полинуклеиновая кислота сконфигурирована для экспрессии рекомбинантной полинуклеиновой кислоты в миелоидной клетке человека.

101. Композиция по вариантам осуществления 81-84, дополнительно

содержащая внутриклеточный домен, индуцирующий интерферон.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1. Конструкция CD137-FcR-PI3K CFP:**

[00577] В этом разделе, дизайн и функциональный анализ типового рецептора химерного слитого белка (CFP), имеющего внеклеточный связывающий домен, который связывается с антигеном, таким как раковый антиген, например, CD37, коротко, CD137-связывающего рецепторного белка CFP, предоставлены в качестве примера для связующих, описанных в настоящем документе (графически представлены на **ФИГ. 1, 2А, 2В** и **ФИГ. 3**). Процедуры и способы можно использовать с некоторыми модификациями, необходимыми для создания любой из других конструкций, описанных в настоящем документе. CD137-таргетный CFP конструируют с использованием известных методов молекулярной биологии. Конструкция нуклеиновой кислоты содержит последовательность, кодирующую сигнальный пептид, слитую выше последовательности, кодирующей внеклеточный CD137-связывающий домен, полученный из лиганд-связывающего фрагмента CD137L человека. Лиганд-связывающий домен CD137L человека амплифицируют методом ПЦР из библиотеки комплементарной ДНК человека и сливают с остовом, содержащим трансмембранную область, присоединенную к шарниру цепи CD8 $\alpha$  и ТМ домену цепи CD8 $\alpha$  через короткий линкер. ТМ домен сливают на цитозольном конце с цитозольной частью Fc $\gamma$  и доменом рекрутирования PI3K. Графическое представление представлено на **ФИГ. 4А**. Конструкцию получают в векторе, имеющем флуоресцентный маркер и устойчивость к лекарственному средству (ампициллину), и амплифицируют путем трансфекции бактериального хозяина.

[00578] Конструкции доставляют в неделящиеся клетки млекопитающих в виде мРНК и сопровождают средством доставки, например, липидом, липосомой, липидной наночастицей или синтетическим соединением, таким как полимер и т. д. Обнаружено и ранее сообщалось группой, что на несколько типов клеток, таких как миелоидные клетки, влияет введение чужеродной ДНК либо путем вирусной трансдукции, либо путем доставки плазмиды. Миелоидные клетки плохо экспрессируют чужеродную ДНК и часто подвергаются клеточным трансформациям, таким как созревание, дифференциация при таких простых манипуляциях с клетками, как экспрессия чужеродной ДНК. (**ФИГ. 4В, слева**). В некоторых случаях оказывается влияние на жизнеспособность клеток (вверху справа). С другой стороны, как показано на **ФИГ. 4В, внизу справа**, доставка через мРНК не приводит к клеточной прогрессии, старению или трансформации, поскольку клетки не высвобождают цитокины, такие как TNF и IL6, которые являются индикаторами клеточной активации.

### **Пример 2. Эффективность моноцитов, экспрессирующих CD137-таргетный химерный антигенный рецептор**

[00579] В этом примере, химерные слитые белки (CAR), имеющие внеклеточный CD137 антигенсвязывающий домен типовой конструкции, описанной в описании, анализируют на функциональную эффективность в качестве потенциальных

противораковых агентов. Lentивирусный вектор первого поколения используют для создания лентивирусов, используемых для трансдукции миелоидной клеточной линии ТНР1. Эффективность трансдукции в клетках ТНР1, обработанных РМА, варьируется от 67 до 90% для конструкций CFP, аналогичных CD137 связующему, с другими связывающими доменами. Экспериментальная установка изображена на схематической диаграмме на **ФИГ. 5, верхняя панель**, и ожидаемые результаты для фагоцитоза изображены на **ФИГ. 5 нижняя панель**. Гибель клеток-мишеней можно рассчитать по формуле: [(только #SKOV3 - #SKOV3 с эффекторами)/ только #SKOV3] x 100.

[00580] CD14+ клетки, выделенные от здорового донора, трансдуцируют лентивирусными CD137-таргетными конструкциями CFP, кодирующими внутриклеточный домен FcR $\gamma$ +PI3K, анализируют на предмет фагоцитоза и уничтожения меченных CSFE опухолевых клеток SCOV3 (**ФИГ. 6А**).

[00581] Конструкции АТАК придают таргетную специфичность клеткам, экспрессирующим конструкцию (**ФИГ. 6В**). Например, клетки, экспрессирующие CD19 связующее, не фагоцитируют мишени, которые презентуют CD22 на своей поверхности, не CD19. На **ФИГ. 6С** показано, что включение конструкций в миелоидные клетки не влияет на миграцию клеток в участок опухоли (например, изображение слева, клетки, экспрессирующие конструкцию CAR, представляют собой GFP+ в опухоли, клетки мигрировали после введения мРНК в мышь). Клетки, экспрессирующие CAR, отвечают на хемокины *in vitro*, как показано в данных (справа).

[00582] Чтобы проверить, могут ли эти клетки, экспрессирующие CD137 конструкции, быть способны дифференцироваться в фенотипы M0, M1, M2 в опухолевой среде, миелоидные клетки, экспрессирующие CAR, подвергают воздействию сигнала поляризации M0, M1 или M2 и инкубируют в присутствии опухолевых клеток или не опухолевых контрольных клеток в культуре в течение 18 часов. M0 (100 нг/мл MCSF); M1 (5 нг/мл LPS+100 нг/мл IFN $\gamma$ ); M2 (100 нг/мл MCSF+20 нг/мл IL-10+20 нг/мл TGF $\beta$ ); DC (100 нг/мл GMCSF+20 нг/мл IL-4); и контроль. На **ФИГ. 7А** показаны ожидаемые профили экспрессии CD80 и CD206 при различных описанных условиях, что указывает на дифференциальный потенциал этих клеток. Для некоторых из этих экспериментов, последовательность, кодирующая пептид FLAG, встраивается между scFv и трансмембранным доменом во внеклеточную область химерной конструкции CD137. Клетки собирают и проверяют их жизнеспособность, которая превышает 80%. Фенотип клеток исследуют с помощью проточной цитометрии через 24 часа. Можно определить экспрессию нескольких клеточных маркеров через 24, 48 и 72 часа. Экспрессия CD16 не увеличивается только за счет экспрессии CAR.

[00583] Модель опухоли, экспрессирующей CD137, *in vivo* используют для исследования проникновения в опухоль и активации клеток, экспрессирующих CD137-CFP. Схематическая диаграмма дизайна эксперимента показана на **ФИГ. 7В**. Миграцию и проникновение клеток, экспрессирующих CD137-таргетный CFP, определяют через 24 часа после однократной инфузии клеток, экспрессирующих CFP, которые помечены

цитоплазматическим красителем CFSE. Опухоли удаляют и обрабатывают для гистологии. Как показано в прогностических данных на **ФИГ. 7С**, миелоидные клетки, экспрессирующие CD137-CFP, могут мигрировать в опухоль и накапливаться вокруг опухолевых клеток. Через двадцать четыре часа после введения CFSE-меченых клеток, экспрессирующих CD137-таргетных CFP, мышам NSG с опухолями MStO, селезенки удаляют и обрабатывают для гистологии.

**Пример 3. Химерные антигенные рецепторы для специфической экспрессии миелоида**

[00584] В этом примере показан дизайн химерного антигенного рецептора для специфической экспрессии миелоида. Химерный слитый белок данного дизайна имеет трансмембранный домен, состоящий из FcR TDM, экспрессия которого в клеточной мембране зависит от его мультимеризации с рецептором Fcгамма, который эндогенно экспрессируется в моноцитах. В этом примере, конструкции CFP для моноцит-специфичной экспрессии сконструированы с трансмембранным доменом (TMD) CD16 или CD89. Конкретный CFP может быть сконструирован на основе общих схем, показанных на **ФИГ. 8**. Типовые конструкции включают конструкцию, которая имеет внеклеточный раковый антигенсвязывающий домен, функционально связанный с CD16 (FcRIIIa) TMD и внутриклеточным доменом CD16; или ту, которая имеет внеклеточный раковый антигенсвязывающий домен, функционально связанный с CD89 (FcRI-альфа) TMD и внутриклеточным доменом CD89. Между внеклеточным антигенсвязывающим доменом может быть шарнир (H). В некоторых конструкциях, CD16 или CD89 TMD простирается примерно на 10 аминокислот во внеклеточной области для обеспечения гибкости, и может быть включен или не включен отдельный шарнирный домен. Связывающий домен ракового антигена ECD может представлять собой scFv или антитело или его фрагмент, который связывается с любым из различных антигенов, рассматриваемых в настоящем документе.

**Пример 4. Конструкции TROP2-антигенспецифического CFP**

[00585] В этом примере демонстрируются конструкции CFP, которые таргетируют TROP2 на раковой клетке и экспрессируются на миелоидной клетке. На **ФИГ. 9** показана типовая версия, которая имеет внеклеточную метку FLAG для целей тестирования *in vitro*. Коротко, одна конструкция состоит из внеклеточного анти-TROP2 scFv, в данном случае слитого с меткой FLAG, за которым следует трансмембранный домен белка FcRIIIa (CD16) и цитоплазматический домен того же белка. Другая конструкция состоит из внеклеточного анти-TROP2 scFv, в данном случае слитого с меткой FLAG, за которым следуют трансмембранный домен белка Fc-альфа R (CD89) и цитоплазматический домен CD89.

[00586] На фигуре также продемонстрирован упрощенный план эксперимента электропорации рекомбинантной мРНК, кодирующей каждую из конструкций в PBMC, и тестирования фагоцитоза и образования цитокинов *in vitro*. На **ФИГ. 16** графически показан обобщенный состав LNP для доставки *in vivo*.

**Пример 5. Конструкции TROP2-CD16 и TROP2-CD89, имеющие преимущественную экспрессию в миелоидных клетках/моноцитах.**

[00587] Конструкции, содержащие CD16 и CD89 TMD и TROP2 связующее, тестируют на экспрессию в различных типах клеток с использованием метки FLAG для анализа проточной цитометрией. TROP2 связующее, как описано также в другом месте, представляет собой анти-TROP2 scFv. PBMC, которые являются источником В-клеток, Т-клеток, NK-клеток и моноцитов, подвергают электропорации с мРНК TROP2-FLAG-CD16 и TROP2-FLAG-CD89 и проводят проточную цитометрию через 24 часа. Данные показаны на **ФИГ. 10**, которая показывает, что конструкции успешно экспрессируются преимущественно в моноцитах (крайние справа), и экспрессия не обнаруживается в CD19+ (В-клетках), CD3+ (лимфоцитах) или CD56+ (NK-клетках). Конструкции на основе CD89 демонстрируют более высокую экспрессию, чем конструкции на основе CD16, где более 60% гейтированных клеток демонстрируют конструкции TROP2-FLAG-CD89.

**Пример 6. Клетки TROP2 -CD16 и TROP2 -CD89 демонстрируют фагоцитоз клеток-мишеней**

[00588] PBMC, электропорированные с конструкциями TROP2, тестируют на влияние на фагоцитоз опухолевых клеток *in vitro*. Используемые опухолевые клетки-мишени представляют собой клеточную линию SKOV3, экспрессирующую люциферазу. Ложнотрансфицированные моноциты и не трансфицированные моноциты демонстрируют базовый уровень фагоцитоза, определяемый снижением активности люциферазы. Клетки, экспрессирующие два TROP2 CFP, демонстрируют статистически значимое снижение активности люциферазы по сравнению с этими контролями, что показывает, что экспрессия конструкций повышает способность клеток к фагоцитозу (**ФИГ. 11**).

[00589] Экспрессию цитокинов исследуют по результатам, показанным в клетках, экспрессирующих TROP2-FLAG-CD16 и TROP2-FLAG-CD89, как в присутствии, так и в отсутствие клеток-мишеней SKOV3. Данные, представленные на **ФИГ. 12А** и **12В** показывают, что экспрессия конструкций TROP2-CD16 и TROP2-CD89 не демонстрирует тонической передачи сигналов в моноцитах. Об этом свидетельствует тот факт, что экспрессия цитокинов или хемокинов (IL-1b, IL-18, или TNF-альфа, или хемокина CCL2) индуцируется в присутствии клеток-мишеней (SKOV3), то есть при взаимодействии ECD CFP с их мишенью. В отсутствие клеток-мишеней, очевидно отсутствие какой-либо индукции или незначительной индукции цитокинов. Эти результаты свидетельствуют о том, что созданы специфические миелоид-таргетные CFP, которые могут связываться с TROP2 на раковых клетках и активировать миелоидные клетки для таргетного разрушения целевых раковых клеток, и что дальнейшая разработка терапевтической композиции может быть проведена с этими конструкциями.

[00590] Затем тестируют, влияет ли ориентация VH и VL scFv, который связывается с TROP2, на уровни экспрессии. На **ФИГ. 13А** показаны конструкции, имеющие ориентацию VL-VH (слева) и VH-VL (справа). Типовой VL-VH scFv имеет последовательность SEQ ID NO: 34. Типовой VH-VL scFv имеет последовательность SEQ

ID NO: 35. Экспрессия конструкций VH-VL демонстрирует более высокую экспрессию в обеих клетках ТНР-1 (**ФИГ. 13В**) и первичных моноцитах (данные не показаны). Кроме того, клетки ТНР-1, экспрессирующие конструкции VH-VL, демонстрируют несколько более высокую фагоцитарную способность, чем конструкции VL-VH (**ФИГ. 13С**). Конструируют конструкции TROP2-связывающего CFP, содержащие комбинацию трансмембранных и внутриклеточных доменов. Конструкцию TROP2-CD8шарнир-CD8TM-FcR $\gamma$ -PI3K создают таким образом, что трансмембранный домен (TMD) представляет собой TM домен, содержащий шарнир CD8 и TM домен, и внутриклеточный домен, содержащий  $\gamma$ -цепь Fc рецептора и домен рекрутирования PI3киназы. Аналогичным образом создают конструкцию TROP2-FcR-41BB, имеющую шарнир CD8 и TM домен, и внутриклеточный домен CD137 (4-1BB); создают конструкцию TROP2-41BB-FcR, имеющую шарнир CD8 и TM домен, и внутриклеточный домен FcR $\gamma$  внутриклеточного домена CD137 (4-1BB). TROP2-CD40-FcR конструируют с шарниром CD8 и TM доменом, внутриклеточным доменом CD40 и внутриклеточным доменом FcR. TROP2-FcR-MDA5 конструируют с шарниром CD8 и TM доменом, и внутриклеточным доменом FcR $\gamma$  тандема MDA5 доменов CARD. Создают конструкции TROP2-CD64 и TROP2 CD89, имеющие TM домен CD64 или CD89 и внутриклеточные домены, и требуют димеризации или мультимеризации с  $\gamma$ -цепью эндогенного FcR для передачи внутриклеточных сигналов. Клеточную линию ТНР-1-565, стабильно экспрессирующую HER2-CD8шарнир-CD8TM-FcR $\gamma$ -PI3K и другие конструкции используют для тестирования потенциала фагоцитоза *in vitro*.

[00591] На **ФИГ. 13D** показаны данные проточной цитометрии, указывающие на экспрессию конструкций. Каждая из конструкций TROP2 связывающего имеет более низкий уровень экспрессии по сравнению с конструкцией HER2-связывающего CFP. На **ФИГ. 13E** показано прямое сравнение определения проточной цитометрией уровней экспрессии каждой конструкции TROP2 связывающего и HER2 связывающего.

#### **Пример 7. Конструкции и экспрессия GP75-таргетных CAR-P**

[00592] GP75 представляет собой меланосомный гликопротеин, экспрессируемый как в меланомах, так и в нормальных меланоцитах. GP75 может экспрессироваться на клеточной поверхности, а также внутриклеточно в меланомах человека и мыши. Химерные слитые белки, имеющие GP75-связывающие домены, конструируют для тестирования на клетках и животных моделях. Для тестирования экспрессии конструируют экспериментальные конструкции, имеющие внеклеточный FLAG домен, который не препятствует анти-GP75 внеклеточному связывающему домену химерного рецептора, как показано на **ФИГ. 14А**. В одной конструкции, шарнир и трансмембранный домен CD8 слиты с внеклеточной последовательностью анти-GP75-ScFv-FLAG. Домен Fc $\gamma$  включен в качестве ICD. Домен рекрутирования PI3киназы включен в ICD. Создают типовой набор конструкций CFP, имеющих анти-GP75 внеклеточный связывающий домен с трансмембранными областями CD16 или CD89, как показано на **ФИГ. 14А**. В некоторых конструкциях, домены CD16 и CD89 имеют всю свою цитоплазматическую часть.

Последовательность, кодирующую GFP, метят на цитозольном конце, отделенном от цитозольного домена химерного слитого белка (CFP) последовательностью, кодирующей саморасщепляющийся пептид, T2A. Для специфичной для мыши экспрессии и экспериментов с мышами *in vivo*, вместо последовательностей человека включают последовательности, кодирующие трансмембранные домены CD16 или CD89 мыши. Также конструируют и получают конструкции, содержащие соответствующий CD89 человека.

[00593] Некоторые типовые конструкции анти-GP75-FLAG на основе CD16 с различными шарнирами/ТМ и ICD для экспериментов создают для проверки влияния шарнирных доменов на уровни экспрессии, как конкретно показано на нижней панели **ФИГ. 14А**. Конструкции варьируются от отсутствия шарнирного домена (MYL157) до наличия шарнирного домена CD8 (MYL184) и наличия шарнирного домена CD28 (MYL185). Другие конструкции, не показанные в настоящем документе, включают анти-GP75-FLAG-hCD89 ТМ-hCD89 ICD (MYL158).

[00594] Моноциты выделяют из бедренных костей мыши с помощью негативной селекции и подвергают электропорации с конструкциями мРНК, культивируют в течение ночи и инкубируют с опухолевыми клетками В16, экспрессирующими GP75. Успешная экспрессия конструкций наблюдается в клетках мыши (**ФИГ. 14В**). Включение шарнирного домена CD8 демонстрирует небольшое преимущество конструкций в уровнях экспрессии (не показано). Наблюдается стойкий специфический фагоцитоз опухолевых клеток, как показано на **ФИГ. 15А-15С**. Как конкретно показано на **ФИГ. 15В**, конструкция MYL158, имеющая домены анти-GP75 ECD и CD89 ТМ, демонстрирует повышенный фагоцитоз. Аналогично, как показано на **ФИГ. 15С**, конструкции как MYL158, так и MYL 186, имеющие внеклеточный антигенсвязывающий домен GP75 и домены CD89 ТМ, демонстрируют повышенный фагоцитоз. Положительный контроль на фигуре представляет собой конструкцию CFP миелоидных клеток первого поколения от авторов изобретения, которая имеет ICD рекрутирования FcR-PI3K и демонстрирует высокий фагоцитарный индекс. На **ФИГ. 15D** показаны данные о высвобождении цитокинов моноцитами, экспрессирующими указанные конструкции.

### **Пример 8. Сингенная модель опухоли мыши и терапия CAR-P**

[00595] В этом примере, для проверки действия CFP на эндогенную опухоль используют HER2 сингенную модель мыши. Erb B2 человека, управляемый конструкцией промотора сывороточного белка, используют для экспрессии HER2 человека в головном мозге и молочных железах сингенных мышей, что позволяет создавать опухоли hHER2 без отторжения. Опухоль HER2+ устанавливают в полностью иммунокомпетентном хозяине. Эффект анти-HER2 CFP, экспрессирующего hHER2, затем исследуют на мышшиной модели. В этой модели, для лечения опухолей HER2 используют отредактированные CRISPR моноциты, экспрессирующие HER2-CFP. Осуществляют рост опухоли, транспортировку CAR-клеток, персистенцию и инфильтрацию CAR-клеток в опухоль и иммунный анализ.

### **Пример 9. Доставка in vivo и специфическая экспрессия миелоида CFP**

[00596] На **ФИГ. 16** показано графическое представление рекомбинантной мРНК, кодирующей сконструированный CFP с меткой GFP и/или меткой FLAG, инкапсулированной в LNP, которую вводят в модель меланомы мыши путем инъекции (**ФИГ. 17A**) для тестирования специфической экспрессии миелоидных клеток и противоопухолевого действия in vivo.

[00597] На **ФИГ. 17B** показан состав PEI для доставки in vivo мРНК, кодирующей CFP in vivo.

[00598] CFP имеет трансмембранный домен CD89. Органы периодически собирают, как показано на **ФИГ. 18A**, и анализируют органоспецифическую экспрессию CFP, кодируемого мРНК. Не миелоидные клетки (такие как лимфоциты) не экспрессируют CFP. Экспрессия положительно подтверждена в миелоидных клетках легких, печени и селезенки. На **ФИГ. 18B** показан дополнительный анализ специфичной для типа клеток экспрессии. В клетках, выделенных после первой или второй инъекции CFP, выявлено статистически значимое увеличение экспрессии метки в макрофагах Ly6C+/F4/80+ и моноцитах LY6C+Ly6G- в обоих органах. Нейтрофилы также демонстрируют экспрессию конструкций. Не миелоидные клетки, такие как Т-клетки, не демонстрируют экспрессию. **ФИГ. 18C-18J** дополнительно иллюстрируют клеточно-специфическую и тканеспецифическую экспрессию конструкции, имеющей специфические трансмембранные домены, как показано на фигурах, что обеспечивает специфичную для миелоидных клеток экспрессию как in vitro, так и in vivo.

### **Пример 10. Иммунологическое влияние обработки CAR-экспрессирующими макрофагами у мышей**

[00599] Результаты гистопатологии опухоли указывают на значительное уменьшение и облитерацию опухоли у 2 из 4 леченных мышей и отсутствие уменьшения в не леченной группе. Типовые результаты показаны на **ФИГ. 19**. Кроме того, на **ФИГ. 20A** и **20B** показаны признаки цитокинов и хемокинов в тканях, что указывает на высокую активность миелоидных клеток, необходимую для уничтожения опухоли. На **ФИГ. 20C** показано, что сконструированные моноциты рекрутируют Т-клетки в анализе in vitro. На **ФИГ. 21** и **ФИГ. 41** и **42** показана повышенная секреция воспалительных цитокинов клетками, выделенными от мышей с опухолью, которым вводят конструкции CFP. Такие воспалительные цитокины потенциально превращают холодную опухоль в горячую TME.

[00600] На **ФИГ. 22** показаны данные, подтверждающие уменьшение опухоли у мышей, которым вводят LNP, содержащую инъекцию CFP. Создают сингенную мышиную модель с миелоидными клетками, экспрессирующими GP75-связывающий CFP. Получение анти-GP75 (Gpr-1) клеток мыши АТАК показано на **ФИГ. 29**. Рецептор АТАК-GP75 эффективно экспрессируется в моноцитах мыши через электропорацию мРНК, как показано на графике проточной цитометрии на нижней левой панели. Эти клетки способны эффективно фагоцитировать опухолевые клетки, экспрессирующие GP75 (**ФИГ. 29**, нижний правый график). Аналогичные данные подтверждаются данными на **ФИГ. 30**,

**36** и **37**, изображающих уменьшение опухоли и улучшение выживаемости у мышей, экспрессирующих соответствующий CFP. На **ФИГ. 30** представлена первая *in vivo* иллюстрация способности миелоидных клеток АТАК сдерживать рост опухоли в модели опухоли, которая трудно поддается лечению ингибиторами CAR T и контрольной точки. 8 инфузий по  $2 \times 10^6$  клеток АТАК к носителю. Инфузии ежедневно  $\times 4$ , 3 дня отдыха, ежедневно  $\times 4$  +/- СО (критерий Манна-Уитни). Когда моноциты GP-75 АТАК вводят внутривенно иммунокомпетентным мышам C57Bl/6, имеющим подкожно имплантированные опухоли меланомы GP75+ B16 (эти мыши толерантны к сингенной опухоли B16), мыши затем могут контролировать рост опухолей и значительно улучшают свои показатели выживаемости по сравнению с мышами, которым вводят носитель или контрольные моноциты. Кроме того, когда опухоли удаляют у животных и исследуют на содержание иммунных клеток, у животных, получающих лечение моноцитами GP75-АТАК, наблюдаются значительно более высокие уровни инфильтрации опухоли воспалительными моноцитами/макрофагами и нейтрофилами, а также увеличение количества дендритных клеток к MDSC. Это доказывает, что моноциты АТАК перемещаются к опухолевым участкам, подавляют рост опухоли и привлекают другие популяции иммунных клеток к ТМЕ.

[00601] На **ФИГ. 21** конкретно показано, что лечение мышей миелоидными клетками, экспрессирующими CFP, связано с широкой активностью Т-клеток в повторно стимулированных культурах селезенки, включая распространение эпителиев CD4. В этом эксперименте берут повторные культуры спленоцитов, в которых клетки селезенки стимулируют в течение 6 часов с помощью OVA<sub>323\*329</sub>SINFECKEL или PMA/иономицина. Цитокины определяют проточной цитометрией. Обработка клеток GP75-АТАК связана с повышенной неспецифической антигенной активностью, что свидетельствует о перекрестной презентации.

[00602] Положительную экспрессию CFP идентифицируют в миелоидных клетках и некоторых клетках CD3+ (**ФИГ. 23** и **ФИГ. 24**). Повышенный фагоцитоз и секреция цитокинов также очевидны в данных, показанных на **ФИГ. 31, 32, 33** и **35**. Как показано на **ФИГ. 31**, моноциты далее становятся DC и зрелыми моноцитами внутри опухоли и селезенки. Уровни цитокинов в сыворотке, показанные на **ФИГ. 32** иллюстрируют широкую миелоидную активность у отвечающих на лечение. Ответы на лечение коррелируют с профилем противоопухолевых цитокинов сыворотки. Другим важным наблюдением является перекрестная презентация опухолевого антигена моноцитами АТАК (**ФИГ. 33**). Миелоидные клетки АТАК могут фагоцитировать, высвободить и презентовать неоантиген Т-клеткам, что приводит к адаптивному Т-клеточному иммунному ответу. Моноциты АТАК-GP75 (также известные как TRP-1 АТАК) способны фагоцитировать, процессировать и презентовать суррогатный опухолевый неоантиген, в настоящем случае полученный из белка OVA, Т-клеткам, которые несут родственные TCR для рестриктированного пептида класса I, полученного из OVA (SINFECKL), в то время как моноциты той же мыши, которые не экспрессируют рецептор АТАК, не могут.

Это доказывает, что моноциты АТАК могут процессировать и перекрестно презентировать антиген адаптивным иммунным клеткам, таким как CD8 Т-клетки. Это также указывает на то, что потенциальные новые подмножества Т-клеток можно стимулировать посредством функции этих миелоидных клеток *in vivo*, тем самым демонстрируя более широкий иммунологический охват по сравнению с лечением другими типами иммунных клеток, такими как Т-клетки.

[00603] Преимущественная экспрессия конструкций в миелоидных клетках *in vivo* подтверждается данными, представленными на **ФИГ. 38**. Рецептор цепи LNP-FcR экспрессируется воспалительными моноцитами в ТМЕ, и более 15% опухолевых миелоидных клеток экспрессируют конструкцию GP-75-FcαR.

**Пример 11. Модификация микроокружения CFP-экспрессирующей модификацией *in vivo***

[00604] В этом примере, экспрессию воспалительного гена профилируют в образцах опухоли *in vivo*, что указывает на то, что конструкции CFP превращают микроокружение опухоли в активный воспалительный сайт с экспрессией провоспалительных цитокинов и хемокинов (ФИГ. 26) (нагревание ТМЕ) и на ФИГ. 34 (вверху справа). На ФИГ. 27 и ФИГ. 34 показаны данные, указывающие на то, что инъекция CFP *in vivo* способна индуцировать Т-клетки. На ФИГ. 34 показано, что описанные в настоящем документе моноциты АТАК человека способны использовать врожденный иммунитет и стимулировать адаптивный противоопухолевый иммунный ответ. Ниже перечислены ключевые итоговые пункты, указывающие на то, что было подтверждено, что сконструированные продукты клеток человека обладают ключевым функциональным механизмом:

[00605] Проникновение и распознавание опухоли

- Проникновение
- Накопление
- Распознавание опухоли

[00606] Сигнальная динамика

- Активация миелоидных клеток
- Продукция цитокинов
- Продукция хемокинов
- Воспалительная поляризация

[00607] Прямое уничтожение опухоли

- Фагоцитоз
- Цитокины
- Рецепторы смерти (CD95L)

[00608] Долгосрочный контроль опухоли

- Презентация антигена
- Распространение эпитопа
- Участие Т-клеток

[00609] Из представленных данных очевидно, что миелоидные клетки обладают способностью изменять микроокружение опухоли с увеличением количества воспалительных моноцитов и DC, показанных в данных на **ФИГ. 39**. Данные на **ФИГ. 39** показывают активацию воспалительных моноцитов (слева) и дендритных клеток (справа). Кроме того, эти клетки влияют на функционирование Т-клеток. В совокупности такие впечатляющие эффекты терапевтического потенциала и релевантности не были достигнуты и/или продемонстрированы ранее, насколько известно заявителю.

**Пример 12. Характеризация Т-клеток in vivo после лечения мышей.**

[00610] Данные, показанные на **ФИГ. 40 - ФИГ. 60** включают использование композиции LNP для доставки. На **ФИГ. 40** показана повышенная регуляция CD8<sup>+</sup> Т-клеток при лечении CFP у мышей посредством инъекции в хвостовую вену. Исследование фенотипов подмножества Т-клеток показано на **ФИГ. 41**, с цитокиновым профилем. Исследование фенотипов подмножества Т-клеток показано на **ФИГ. 42**, с хемокиновым профилем. В обсуждаемом в настоящем документе исследовании, сингенным мышам с опухолью GP75 вводят дозу либо один раз каждые четыре дня, либо один раз через день, и прогрессирование опухоли определяют путем измерения размера опухоли. Как показано на **ФИГ. 43**, обе группы лечения демонстрируют эффективное ингибирование прогрессирования опухоли по сравнению с контрольной группой. На **ФИГ. 44** показана стратегия селекции для изучения подтипов Т-клеток.

[00611] Анализ подтипов Т-клеток выявил высокую индукцию CD8<sup>+</sup> клеток и снижение Treg в опухоли (**ФИГ. 45**). Повышение маркеров активации Т-клеток со снижением маркера истощения Т-клеток (PD1) отмечено в Т-клетках (**ФИГ. 46А и 46В, ФИГ. 47А и 47В, ФИГ. 48А и 48В**).

**Пример 13. Характеристика миелоидных клеток in vivo после лечения мышей**

[00612] Кроме того, все типы клеток, включая лимфоциты, DC и т.д., профилируют после выделения из леченных и не леченных мышей GP75 с использованием стратегии селекции, показанной на **ФИГ. 49**. В целом, частота иммунных клеток не претерпела заметных изменений (**ФИГ. 50**). Миелоидные и дендритные клетки демонстрируют высокую экспрессию рецепторной конструкции. Экспрессию характеризуют в различных типах клеток, как показано на **ФИГ. 51-53**, что указывает на то, что миелоидные клетки демонстрируют выраженную экспрессию конструкций, доставляемых через препараты LNP. На **ФИГ. 54** показана экспрессия рецептора более чем в 50% резидентных миелоидных (Ly6C<sup>lo</sup>) клеток. На **ФИГ. 55** представлены данные, указывающие на то, что лечение мышей значительно повышает уровни CD40 и CD206 в воспалительных моноцитах Ly6C<sup>hi</sup> и CCR2<sup>hi</sup>.

[00613] Уровни CD40 и CD206 значительно повышены в резидентных миелоидных клетках Ly6C<sup>lo</sup> и CCR2<sup>lo</sup>, как показано на **ФИГ. 56**; и уровень PDL1 слегка снижен в резидентных макрофагах опухоли (**ФИГ. 57**). На **ФИГ. 58** показано, что лечение значительно увеличивает маркер активации DC, включая MHCII, CD86 и CD40, но также повышает уровень PD-L1 в фенотипе CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-дендритных клеток в селезенке. На

**ФИГ. 59** показано, что лечение значительно увеличивает маркер активации DC, включая МНСII, CD86 и CD40, но также повышает уровень PD-L1 в фенотипе дендритных клеток CD103-CD11b<sup>+</sup> в селезенке.

**Пример 14. Создание библиотеки химерных слитых белков с рекрутирующим протеазу доменом фосфорилирования тирозина и активатором транскрипции, индуцируемым протеазой.**

[00614] В этом примере сконструирован мишень-специфический программируемый вектор экспрессии, который при экспрессии в макрофаге или миелоидной клетке позволяет активировать миелоидную клетку, специфичную к клетке-мишени, и затем миелоидная клетка выполняет свою ожидаемую функцию, приводя к иммуногенному ответу против клетки-мишени и разрушению клетки-мишени. Вектор может быть лентивирусным или аденовирусным вектором экспрессии. Клетка-мишень представляет собой раковую клетку. В этом примере продемонстрированы композиция и способы получения типового вектора экспрессии миелоидных клеток, где вектор экспрессии кодирует мембранный белок, имеющий рак-специфический внеклеточный связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, содержащий группу фосфорилирования и активации тирозина (домен ITAM), который рекрутирует фосфотирозин-связывающие белки (РТВ), тогда как внутриклеточный домен связан через последовательность, расщепляемую фосфотирозин-связывающей протеазой, с доменом активатора транскрипции и протеазой (такой как протеаза, расщепляющая T2A), слитой с последовательностью NIF-дегрона (NIF-дегрон-протеазой). Вектор экспрессии кодирует последовательность гена-мишени, которая может быть активирована активатором транскрипции. Ген-мишень или его фрагмент представляет собой провоспалительный или профагоцитарный белок или фрагмент белка. Вектор может быть сконструирован таким образом, чтобы сохранять гибкость использования любого выбранного гена-мишени для активации транскрипции. Типовой вектор экспрессии макрофагов сконструирован, как показано на **ФИГ. 60**.

[00615] Вектор содержит, от 5' до 3': последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую каждый из следующих элементов: (а) связывающий домен внеклеточной раковой клетки, имеющий N-концевую сигнальную последовательность, которая обеспечивает трансмембранную локализацию, (b) трансмембранный домен, (с) внутриклеточный домен, содержащий домен активации/рекрутирования фосфотирозина (например, ITAM); (d) ДНК-связывающий домен и фактор активации транскрипции, содержащие ДНК-связывающую последовательность GAL4 и активатор транскрипции VP64, связанные с последовательностью, кодирующей внутриклеточный домен, с помощью расщепляемой последовательности, которая является субстратом зависимой от фосфотирозин-связывающего белка (РТВ) протеазы, (е) последовательность, кодирующую фосфотирозин РТВ-зависимую протеазу, которая в типовой конструкции представляет собой неструктурную протеазу HCV (NS3), слитую с дегроном РТВ-NIF; где последовательность РТВ-NIF-NS3 расщепляется T2A. Расщепляемая последовательность,

которая является субстратом зависимой от фосфотирозин-связывающего белка (РТВ) протеазы, представляет собой EDVVCC или DEMEEC. Вторая векторная конструкция используется для совместной экспрессии последовательности, кодирующей ген-мишень, транскрипция которого активируется фактором активации транскрипции, кодируемым выше. Ген-мишень управляется минипромотором CMV с вышестоящим доменом связывания и активации GAL4. Последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая группу, связывающую внеклеточную раковую клетку, кодирует антитело scfv, которое в иллюстративной конструкции представляет собой CD19-связывающий scfv, но может быть scfv, специфичным к другому белку, который специфически экспрессируется на раковой клетке, или клетке-мишени. Фактор связывания и активации транскрипции содержит последовательность 5X GAL4, слитую с последовательностью VP64, которая может связываться через область связывания ДНК GAL-4 выше промотора CMV, тем самым активируя транскрипцию гена-мишени. РТВ-NIF и прилегающие последовательности протеаз фланкированы расщепляемой последовательностью T2A и автоматически расщепляются протеазой T2A, тем самым высвобождая протеазу после трансляции.

[00616] Дизайн вектора, кодирующего различные части, показанные в примере, может быть спроектирован по-разному. Например, в настоящем документе в равной степени рассматривается полицистронный дизайн или дизайн с множественными векторами.

[00617] Конструкция модульного вектора с совместной экспрессией компонентов, описанных выше, обеспечивает возможность гибкого включения гена-мишени ниже промотора CMV, что может привести к активации и усилению опосредованного макрофагами фагоцитоза и гибели клетки-мишени. Примерами генов-мишеней являются гены воспаления, гены активации воспаления, цитокины, хемокины, гены REDOX.

[00618] Основная структурная схема внеклеточных и внутриклеточных доменов и расщепляемых единиц продемонстрирована на **ФИГ. 61А**. Конструкция, как описано выше, экспрессируется в макрофаге. После экспрессии, ожидаемый механизм действия после трансляции и высвобождения зрелых белков показан на **ФИГ. 61В**. NIF-дегрон при связывании с фосфотирозин-связывающим элементом во внутриклеточном домене посредством взаимодействия РТВ и ITAM деактивируется и обеспечивает правильное функционирование протеазы, тем самым обеспечивая расщепление и высвобождение фактора транскрипции. В отсутствие ассоциации с ITAM, дегрон отвечает за деградацию элемента NIF-протеазы, как показано на **ФИГ. 2Б**. Следовательно, эта функция обеспечивает специфическую для раковых клеток активацию фактора транскрипции и, в свою очередь, специфическую транскрипцию гена-мишени, управляемую промотором CMV, поскольку ITAM активируется и рекрутирует РТВ только тогда, когда он получает сигнал от внеклеточного домена, например, scfv, - связывается со своей CD19-мишенью на раковой клетке.

**Пример 15. Получение активированного опухолью эозинофильного**

### литического белка

[00619] В этом примере, эозинофильный литический белок используют для получения сконструированных макрофагов или миелоидных клеток, способных к лизису клетки-мишени, такой как раковая клетка. Как было указано в предыдущем примере, типовой вектор экспрессии конструируют и экспрессируют в макрофаге; тогда как вектор экспрессии допускает специфичность к мишени и программируется для выполнения клеточно-литической функции.

[00620] Дизайн конструкции показан на **ФИГ. 62А**. По существу, вектор кодирует рекомбинантный химерный белок, содержащий последовательность, кодирующую кислотный домен (аминокислотные остатки 17-105) основного связывающего белка 1 эозинофилов человека; последовательность, кодирующую цитотоксический домен (аминокислотные остатки 106-222) основного связывающего белка 1 эозинофилов человека; между двумя доменами основного связывающего белка эозинофилов вставлена последовательность, кодирующая последовательность узнавания белка матричной металлопротеазы (ММР), которая расщепляется родственной ММР. Последовательности, кодирующей химерный белок, предшествует последовательность, кодирующая сигнальный пептид, который обеспечивает секрецию химерного белка вне макрофага. Зрелый химерный белок, секретлируемый макрофагом, показан на типовой **ФИГ. 62В**. Кислотный домен и цитотоксический домен образуют компактную парную конфигурацию, удерживаемую вместе ММР, тогда как связанная форма с кислым доменом удерживает цитотоксический домен в неактивном состоянии.

[00621] Поскольку микроокружение опухоли богато ММР, секретлируемый химерный белок, имеющий расщепляемый домен распознавания ММР, легко расщепляется, тем самым высвобождая кислотный домен из цитотоксического домена и, таким образом, высвобождая цитотоксический домен для выполнения литической активности. Опухолевые клетки находятся в избытке в окружающей среде и после этого подвергаются атаке, лизису и повреждению высвобождаемым белком цитотоксического домена основного белка эозинофилов, тогда как макрофаги поблизости фагоцитируют и очищают лизированные и/или поврежденные клетки с большей готовностью. С другой стороны, макрофаг может дополнительно экспрессировать дополнительные белки, химерные рецепторы и/или группы, прикрепляющие клетки-мишени, для усиления действия секретлируемого основного белка эозинофилов на раковую клетку.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок (CFP), содержащий:

(а) субъединицу фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), содержащую:

(i) трансмембранный домен, или

(ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и

(b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен CD137, который может специфически связываться с CD137 на клетке-мишени; где внеклеточный и трансмембранный домены функционально связаны.

2. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок, содержащий: (а) первый связывающий домен антигена CD137, который специфически связывается с антигеном CD137 на клетке-мишени, и (b) второй связывающий домен, который специфически связывается с поверхностным агентом на миелоидной клетке; где связывание первого антигенсвязывающего домена с антигеном CD137 происходит на клетке-мишени и связывание второго связывающего домена с поверхностным агентом происходит на миелоидной клетке.

3. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок (CFP), содержащий: (а) субъединицу фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), содержащую: (i) трансмембранный домен, или (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и (b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен Клаудина 18.2, который может специфически связываться с Клаудином 18.2 на клетке-мишени; где внеклеточный и трансмембранный домены функционально связаны.

4. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок, содержащий: (а) первый антигенсвязывающий домен Клаудина 18.2, который специфически связывается с антигеном Клаудина 18.2 на клетке-мишени, и (b) второй связывающий домен, который специфически связывается с поверхностным агентом на миелоидной клетке; где связывание первого антигенсвязывающего домена с антигеном Клаудина 18.2 происходит на клетке-мишени и связывание второго связывающего домена с поверхностным агентом происходит на миелоидной клетке.

5. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок (CFP), содержащий: (а) субъединицу фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), содержащую: (i) трансмембранный домен, или (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и (b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен Клаудина 3, который может специфически связываться с Клаудином 3 на клетке-мишени; где внеклеточный и трансмембранный домены функционально связаны.

6. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок, содержащий: (а) первый связывающий домен антигена Клаудина

3, который специфически связывается с антигеном Клаудина 3 на клетке-мишени, и (b) второй связывающий домен, который специфически связывается с поверхностным агентом на миелоидной клетке; где связывание первого антигенсвязывающего домена с антигеном Клаудина 18.2 происходит на клетке-мишени и связывание второго связывающего домена с поверхностным агентом происходит на миелоидной клетке.

7. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок (CFP), содержащий: (a) субъединицу фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), содержащую: (i) трансмембранный домен, или (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и (b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен CD70, который может специфически связываться с CD70 на клетке-мишени; где внеклеточный и трансмембранный домены функционально связаны.

8. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок, содержащий: (a) первый связывающий домен антигена CD70, который специфически связывается с антигеном CD70 на клетке-мишени, и (b) второй связывающий домен, который специфически связывается с поверхностным агентом на миелоидной клетке; где связывание первого антигенсвязывающего домена с антигеном CD70 происходит на клетке-мишени и связывание второго связывающего домена с поверхностным агентом происходит на миелоидной клетке.

9. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок (CFP), содержащий: (a) субъединицу фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), содержащую: (i) трансмембранный домен, или (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и (b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен TROP2, который может специфически связываться с TROP2 на клетке-мишени; где внеклеточный и трансмембранный домены функционально связаны.

10. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок, содержащий: (a) первый антигенсвязывающий домен TROP2, который специфически связывается с антигеном TROP2 на клетке-мишени, и (b) второй связывающий домен, который специфически связывается с поверхностным агентом на миелоидной клетке; где связывание первого антигенсвязывающего домена с антигеном TROP2 происходит на клетке-мишени и связывание второго связывающего домена с поверхностным агентом происходит на миелоидной клетке.

11. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный слитый белок (CFP), содержащий: (a) субъединицу фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), содержащую: (i) трансмембранный домен, или (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и (b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен TMPRSS, который может специфически связываться с TMPRSS на клетке-мишени; где внеклеточный и трансмембранный домены функционально связаны.

12. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный гибридный белок, содержащий: (а) первый связывающий домен антигена TMPRSS, который специфически связывается с антигеном TMPRSS на клетке-мишени, и (b) второй связывающий домен, который специфически связывается с поверхностным агентом на миелоидной клетке; где связывание первого антигенсвязывающего домена с антигеном TMPRSS происходит на клетке-мишени и связывание второго связывающего домена с поверхностным агентом происходит на миелоидной клетке.

13. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок (PFP) фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления (PR), содержащий: (а) субъединицу PR, содержащую: (i) трансмембранный домен, и (ii) внутриклеточный домен, содержащий внутриклеточный сигнальный домен; и (b) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен по любому из пп. 1, 3, 5, 7, 9 или 11, обладающий сильной аффинностью связывания с антигеном клетки-мишени; где трансмембранный домен и внеклеточный домен функционально связаны; и где при связывании PFP с антигеном клетки-мишени убивающая или фагоцитарная активность клетки, экспрессирующей PFP, увеличивается по меньшей мере более чем на 20% по сравнению с клеткой, не экспрессирующей PFP.

14. Композиция по любому из пп. 1, 3, 5, 7, 9, 11 или 13, отличающаяся тем, что внутриклеточный сигнальный домен получен из фагоцитарного рецептора или рецептора прикрепления, или где внутриклеточный сигнальный домен содержит домен активации фагоцитоза.

15. Композиция по любому из пп. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 14, отличающаяся тем, что внутриклеточный сигнальный домен содержит провоспалительный сигнальный домен.

16. Композиция по любому из пп. 1, 3, 5, 7, 9, 11 или 13-15, отличающаяся тем, что провоспалительный сигнальный домен содержит домен активации киназы или связывающий домен киназы.

17. Композиция по любому из пп. 11, 3, 5, 7, 9, 11 или 13-16, отличающаяся тем, что внутриклеточный сигнальный домен содержит домен рекрутирования киназы PI3.

18. Композиция по любому из пп. 1, 3, 5, 7, 9, 11 или 13-17, отличающаяся тем, что провоспалительный сигнальный домен содержит домен активации сигнального каскада IL-1.

19. Композиция по любому из пп. 1, 3, 5, 7, 9, 11 или 13-18, отличающаяся тем, что провоспалительный сигнальный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из TLR3, TLR4, TLR7, TLR 9, TRIF, RIG-1, MYD88, MAL, IRAK1, MDA-5, рецептора IFN, члена семейства NLRP, NLRP1-14, NOD1, NOD2, пирина, AIM2, NLRC4, FCGR3A, FCERIG, CD40, домена каспазы или связывающего домена прокаспазы или любой их комбинации.

20. Композиция по любому из пп. 1, 3, 5, 7, 9, 11 и 13-19, дополнительно содержащая трансмембранный домен, полученный из домена TM белка CD2, CD8, CD28 или CD68.

21. Композиция по любому из пп. 1, 3, 5, 7, 9, 11 и 13-20, дополнительно содержащая

шарнирный домен.

22. Композиция по любому из пп. 1, 3, 5, 7, 9, 11 или 13-21, отличающаяся тем, что при связывании PFP с антигеном клетки-мишени, убивающая активность клетки, экспрессирующей PFP, увеличивается на по меньшей мере более чем на 20% по сравнению с клеткой, не экспрессирующей PFP.

23. Композиция по любому из пп. 1, 3, 5, 7, 9, 11 или 13-22, отличающаяся тем, что при связывании PFP с антигеном клетки-мишени убивающая активность клетки, экспрессирующей PFP, увеличивается по меньшей мере 1,1-кратно по сравнению с клеткой, не экспрессирующей PFP.

24. Композиция по любому из пп. 2, 4, 6, 8, 10 или 12, содержащая первый терапевтический агент, где терапевтический агент содержит:

первый связывающий домен, где первый связывающий домен представляет собой первое антитело или его функциональный фрагмент, который специфически взаимодействует с антигеном на клетке-мишени, и

второй связывающий домен, где второй связывающий домен представляет собой второе антитело или его функциональный фрагмент, который специфически взаимодействует с миелоидной клеткой; в которой,

(i) первый терапевтический агент связан с первым компонентом, где первый компонент представляет собой дополнительный терапевтический агент или третий связывающий домен, или

(ii) композиция содержит дополнительный терапевтический агент.

25. Композиция по любому из пп. 2, 4, 6, 8, 10, 12 или 24, отличающаяся тем, что терапевтический агент содержит: (a) первый связывающий домен, который специфически взаимодействует с антигеном клетки-мишени, (b) второй связывающий домен, который специфически взаимодействует с миелоидной клеткой, и (c) третий связывающий домен, который специфически взаимодействует с миелоидной клеткой.

26. Композиция по любому из пп. 1-25, отличающаяся тем, что любой из связывающих доменов терапевтического агента содержит связывающий домен антитела, функциональный фрагмент антитела, его переменный домен, VH домен, VL домен, VNAR домен, VHH домен, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), Fab, однодоменное антитело (sdAb), нанотело, биспецифическое антитело, диатело или функциональный фрагмент или их комбинацию.

27. Композиция по любому из пп. 1-26, отличающаяся тем, что антиген на клетке-мишени, с которой связывается первый связывающий домен, представляет собой раковый антиген или патогенный антиген на клетке-мишени или аутоиммунный антиген.

28. Композиция по любому из пп. 2, 4, 6, 8, 10, 12 или 24, отличающаяся тем, что первый терапевтический агент содержит полипептид длиной менее 1000 аминокислот или 1000 нм.

29. Композиция по любому из пп. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28, отличающаяся тем, что первый терапевтический агент содержит полипептид длиной менее 500 аминокислот или

500 нм.

30. Композиция по любому из пп. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 28 или 29, отличающаяся тем, что первый терапевтический агент содержит полипептид длиной 200-1000 аминокислот или 200-1000 нм.

31. Композиция по любому из пп. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-30, отличающаяся тем, что связывание связывающих доменов первого терапевтического агента позволяет контакт раковой клетки с миелоидной клеткой.

32. Композиция по любому из пп. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-31, отличающаяся тем, что второй связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой и способствует фагоцитарной активности миелоидной клетки.

33. Композиция по любому из пп. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-32, отличающаяся тем, что второй связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой и способствует передаче сигналов воспаления миелоидной клеткой.

34. Композиция по любому из пп. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-33, отличающаяся тем, что второй связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой или молекулой адгезии и способствует адгезии миелоидной клетки к клетке-мишени.

35. Композиция по любому из пп. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-34, отличающаяся тем, что второй связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой и ингибирует анти-фагоцитарную активность миелоидной клетки, опосредованную клеткой-мишенью.

36. Композиция по любому из пп. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-35, отличающаяся тем, что второй связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой и ингибирует противовоспалительную активность миелоидной клетки, опосредованную клеткой-мишенью.

37. Композиция по любому из пп. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-36, отличающаяся тем, что второй и/или третий связывающий домен способствует фагоцитарной активности миелоидной клетки.

38. Композиция по любому из пп. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-37, отличающаяся тем, что второй и/или третий связывающий домен способствует передаче сигналов воспаления миелоидной клетки.

39. Композиция по любому из пп. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-38, отличающаяся тем, что второй и/или третий связывающий домен специфически взаимодействует с миелоидной клеткой или молекулой адгезии и способствует адгезии миелоидной клетки к клетке-мишени.

40. Композиция по любому из пп. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-39, отличающаяся тем, что второй и/или третий связывающий домен ингибирует анти-фагоцитарную активность миелоидной клетки, опосредованную клеткой-мишенью.

41. Композиция по любому из пп. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-40, отличающаяся тем, что второй и/или третий связывающий домен ингибирует противовоспалительную активность миелоидной клетки, опосредованную клеткой-мишенью.

42. Композиция по любому из пп. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-41, отличающаяся тем, что третий связывающий домен или дополнительный терапевтический агент содержит антагонист CD47, блокатор CD47, антитело, химерный рецептор CD47, сиалидазу, цитокин, провоспалительный ген, прокаспазу или противораковый агент.

43. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что первый связывающий домен, второй связывающий домен и третий связывающий домен связываются с разными неидентичными антигенами-мишенями.

44. Композиция по любому из пп. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 или 28-43, отличающаяся тем, что первый связывающий домен, второй связывающий домен или третий связывающий домен представляет собой лигандсвязывающий домен.

45. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что первый, второй или третий связывающие домены функционально связаны одним или несколькими линкерами.

46. Композиция по п. 45, отличающаяся тем, что линкер представляет собой полипептид.

47. Композиция по п. 46, отличающаяся тем, что линкер представляет собой функциональный пептид.

48. Композиция по любому из пп. 45-47, отличающаяся тем, что линкер представляет собой лиганд для рецептора.

49. Композиция по п. 45, отличающаяся тем, что линкер представляет собой лиганд для моноцитарного или макрофагального рецептора.

50. Композиция по любому из пп. 45-49, отличающаяся тем, что линкер активирует рецептор.

51. Композиция по любому из пп. 45-50, отличающаяся тем, что линкер ингибирует рецептор.

52. Композиция по п. 51, отличающаяся тем, что линкер представляет собой лиганд макрофагального рецептора M2.

53. Композиция по п. 48 или 49, отличающаяся тем, что линкер представляет собой лиганд для рецептора TLR, такого как TLR4.

54. Композиция по любому из пп. 48, 49 или 50, отличающаяся тем, что линкер активирует рецептор TLR.

55. Композиция по любому из пп. 45-54, отличающаяся тем, что первый, второй и/или третий связывающие домены связаны с маской, которая связывается со связывающим доменом.

56. Композиция по п. 55, отличающаяся тем, что маска представляет собой ингибитор, который ингибирует взаимодействие связывающего домена с его мишенью, когда маска остается связанной с соответствующим связывающим доменом.

57. Композиция по п. 56, отличающаяся тем, что маска связана со связывающим доменом через пептидный линкер.

58. Композиция по п. 57, отличающаяся тем, что пептидный линкер содержит

расщепляемую группу.

59. Композиция по п. 58, отличающаяся тем, что расщепляемая группа расщепляется белком или ферментом, селективно преобладающим в очаге рака или опухоли.

60. Композиция по любому из пп. 1-59, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой РНК.

61. Композиция по любому из пп. 1-60, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.

62. Композиция по любому из пп. 1-61, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота связана с одним или несколькими липидами.

63. Композиция по любому из пп. 1-62, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота инкапсулирована в липосому.

64. Композиция по п. 63, отличающаяся тем, что липосома представляет собой наночастицу.

65. Композиция по любому из пп. 1-64, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота содержится в векторе.

66. Фармацевтическая композиция, содержащая любую из рекомбинантных нуклеиновых кислот композиции по любому из пп. 1-65 и эксципиент.

67. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой по любому из пп. 1-65.

68. Клетка, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-65.

69. Клетка по п. 68, отличающаяся тем, что клетка представляет собой миелоидную клетку.

70. Клетка по п. 69, отличающаяся тем, что клетка является CD14+, CD16-.

71. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток, содержащих рекомбинантную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-65, отличающаяся тем, что по меньшей мере 50% клеток являются CD14+CD16-.

72. Фармацевтическая композиция по п. 71, отличающаяся тем, что менее 10% клеток представляют собой дендритные клетки.

73. Фармацевтическая композиция по п. 71 или 72, дополнительно содержащая подходящий эксципиент.

74. Способ получения любой из композиций по пп. 1-73.

75. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 71-73.

76. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 66, 67 и 71-73.

77. Способ по п. 75 или 76, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака яичников, рака почки, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака печени, рака головного мозга, лимфомы, лейкоза, рака кожи, рака поджелудочной железы, колоректального рака, глиобластомы и рака легких.

78. Композиция, содержащая рекомбинантную полинуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP), где CFP содержит:

(a) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, и

(b) трансмембранный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом;

где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен из белка, который димеризуется с эндогенными рецепторами FcR-гамма в миелоидных клетках; где рекомбинантная полинуклеиновая кислота инкапсулирована средством доставки наночастиц; и где после введения композиции субъекту-человеку, CFP экспрессируется на поверхности миелоидных клеток субъекта-человека.

79. Композиция по п. 78, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен содержит фрагмент Fab, домен scFv или домен sdAb.

80. Композиция по п. 78, отличающаяся тем, что трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен из CD8, CD16a, CD64, CD68 или CD89.

81. Композиция по п. 78, отличающаяся тем, что внеклеточный домен дополнительно содержит шарнирный домен, полученный из CD8, где шарнирный домен функционально связан с трансмембранным доменом и антигенсвязывающим доменом.

82. Композиция по п. 78, отличающаяся тем, что трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен белка, который димеризуется с эндогенными FcR-гамма-рецепторами в миелоидных клетках, моноцитах или макрофагах; где после введения фармацевтической композиции субъекту-человеку, CFP специфически экспрессируется в миелоидных клетках, моноцитах или макрофагах субъекта-человека.

83. Композиция по п. 78, отличающаяся тем, что трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен из CD16a, CD64, CD68 или CD89.

84. Композиция по п. 78, отличающаяся тем, что CFP дополнительно содержит внутриклеточный домен.

85. Композиция по п. 84, отличающаяся тем, что внутриклеточный домен содержит один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов, и где один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов содержат внутриклеточный сигнальный домен из FcγR, FcαR, FcεR, CD40 или CD3дзета.

86. Композиция по п. 84, отличающаяся тем, что один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов дополнительно содержат домен рекрутирования фосфоинозитид-3-киназы (PI3K).

87. Композиция по п. 86, отличающаяся тем, что домен рекрутирования PI3K содержит последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 26.

88. Композиция по п. 84, отличающаяся тем, что внутриклеточный домен содержит внутриклеточный домен из CD16a, CD64, CD68 или CD89.

89. Композиция по п. 78, отличающаяся тем, что рекомбинантная полинуклеиновая кислота представляет собой мРНК.

90. Композиция по п. 78, отличающаяся тем, что средство доставки наночастиц содержит липидную наночастицу.

91. Композиция по п. 90, отличающаяся тем, что липидная наночастица содержит полярный липид.

92. Композиция по п. 90, отличающаяся тем, что липидная наночастица содержит не полярный липид.

93. Композиция по п. 90, отличающаяся тем, что липидная наночастица имеет диаметр от 100 до 300 нм.

94. Композиция по любому из пп. 78-93, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из TROP2, GPC3, CD5, HER2, CD137, CD70, Клаудина 3, Клаудина 18.2, TMPRSS, CD19, CD22, CD7 и GP75.

95. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по любому из пп. 78-94 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

96. Фармацевтическая композиция по п. 95, отличающаяся тем, что фармацевтическая композиция содержит эффективное количество композиции по любому из пп. 78-94 для ингибирования роста рака при введении человеку с раком.

97. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 95 или 96.

98. Способ введения композиции по любому из пп. 78-94 в миелоидную клетку, включающий: электропорацию миелоидной клетки в присутствии рекомбинантной полинуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP), где CFP содержит: (a) внеклеточный домен, содержащий анти-TROP2 связывающий домен, и (b) трансмембранный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом; где рекомбинантная полинуклеиновая кислота (i) присутствует в миелоидной клетке или (ii) инкапсулирована средством доставки наночастиц; где рекомбинантная полинуклеиновая кислота сконфигурирована для экспрессии рекомбинантной полинуклеиновой кислоты в миелоидной клетке человека.

99. Композиция, содержащая рекомбинантную полинуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую химерный слитый белок (CFP), где CFP содержит:

(a) внеклеточный домен, содержащий анти-TROP2 связывающий домен, содержащий по меньшей мере одну из последовательностей, представленных SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 35, или последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35;

(b) трансмембранный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом, содержащий последовательность из трансмембранного домена молекулы FcγR1 (CD64), молекулы FcγRIIA (CD16) или молекулы FcγR1 (CD89); и

(c) необязательно, шарнирный домен, функционально связанный с внеклеточным доменом и трансмембранным доменом, где шарнирный домен содержит аминокислотную

последовательность белка CD16, белка CD64 или белка CD89, или шарнирного домена CD8.

100. Композиция по п. 99, дополнительно содержащая внутриклеточный домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 26, 27 или 28; или последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 26, 27 или 28, и, необязательно, внутриклеточный домен из белка CD16, белка CD64 или белка CD89, или его фрагмент.

101. Композиция по п. 99 или 100, отличающаяся тем, что рекомбинантная полинуклеиновая кислота представляет собой мРНК.

102. Клетка, содержащая композицию по пп. 99-101, отличающаяся тем, что клетка представляет собой CD14+ клетку.

103. Применение композиции по любому из пп. 1-65, 78-94 или 99-101 или фармацевтической композиции по любому из пп. 66-67, 71-73 или 95-96, или клетки по п. 68-70 или 102 при лечении заболевания или нарушения.

104. Применение фармацевтической композиции по пп. 66-67, 71-73 или 95-96 или клетки по пп. 68-70 или 102 для лечения рака у субъекта.

105. Применение фармацевтической композиции по п. 103 или 104, отличающееся тем, что рак выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака яичников, рака почки, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака печени, рака мозга, лимфомы, лейкоза, рака кожи, рака поджелудочной железы, колоректального рака, глиобластомы и рака легких.

106. Применение композиции по любому из пп. 1-65, 78-94 или 99-101 или фармацевтической композиции по любому из пп. 66-67, 71-73 или 95-96, или клетки по п. 68-70 или 102 при изготовлении лекарственного средства для лечения рака у субъекта, где рак выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака яичников, рака почки, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака печени, рака головного мозга, лимфомы, лейкоза, рака кожи, рака поджелудочной железы, колоректального рака, глиобластомы и рака легких.

107. Композиция по любому из пп. 1, 3, 5, 7, 9, 11 или 13-22, отличающаяся тем, что внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен, имеющий тирозиновые остатки, содержащие по меньшей мере один домен иммунорецепторного тирозинового активирующего мотива (ITAM).

108. Композиция по п. 107, отличающаяся тем, что по меньшей мере один домен ITAM происходит из внутриклеточного домена белка или полипептида, выбранного из группы субъединицы TCR CD3-дзета, субъединицы TCR CD3-эпсилон, субъединицы TCR CD3-гамма, субъединицы TCR CD3-дельта, дзета-цепи TCR, цепи рецептора 1 Fc-эпсилон, цепи рецептора 2 Fc-эпсилон, цепи рецептора 1 Fc-гамма, цепи рецептора 2a Fc-гамма, цепи рецептора 2b1 Fc-гамма, цепи рецептора 2b2 Fc-гамма, цепи рецептора 3a Fc-гамма, цепи рецептора 3b Fc-гамма, цепи рецептора 1 Fc-бета, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b,

CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, содержащих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

109. Композиция по п. 107, отличающаяся тем, что по меньшей мере один домен ITAM содержит сайт фосфорилирования киназ семейства Src.

110. Композиция по п. 107, отличающаяся тем, что по меньшей мере один домен ITAM содержит домен рекрутирования Syk.

111. Композиция по любому из пп. 107-110, отличающаяся тем, что внутриклеточная сигнальная субъединица дополнительно содержит домен рекрутирования DAP12.

112. Композиция по любому из пп. 107-111, отличающаяся тем, что внутриклеточный домен содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 доменов ITAM.

113. А композиция, содержащая одну или несколько последовательностей рекомбинантных нуклеиновых кислот, содержащая:

(A) первую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую экзогенный полипептид;

(B) вторую последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую слитый белок химерного антигенного рецептора (CFP),

где CFP содержит:

(a) внутриклеточную сигнальную субъединицу, содержащую внутриклеточный сигнальный домен, содержащий один или несколько тирозиновых остатков, которые фосфорилируются при связывании антигена рецептором;

(b) трансмембранный домен,

(c) внеклеточный связывающий домен, обладающий специфичностью связывания в отношении компонента на поверхности клетки-мишени, где внеклеточный связывающий домен функционально связан с трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной субъединицей; и

(d) домен активатора транскрипции, функционально связанный с внутриклеточной сигнальной субъединицей последовательностью расщепления протеазой, где домен активатора транскрипции способствует транскрипции первой последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей экзогенный полипептид; и

(C) третью последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую (i) протеазу, которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, функционально связывающую домен активатора транскрипции с внутриклеточной сигнальной субъединицей; (ii) домен, который связывается с тирозиновыми остатками, которые фосфорилируются при активации CFP; где протеаза, которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, и домен, который связывается с тирозиновыми остатками, функционально связаны.

114. Композиция по п. 113, отличающаяся тем, что третья последовательность нуклеиновых кислот дополнительно кодирует (iii) чувствительный к стимулу элемент.

115. Композиция по п. 114, отличающаяся тем, что чувствительный к стимулу элемент (iii) слит с доменом, который связывается с фосфорилированными тирозиновыми остатками.

116. Композиция по п. 114 или 115, отличающаяся тем, что чувствительный к стимулу элемент (iii) отвечает на микроокружение клетки, которая экспрессирует последовательность нуклеиновых кислот.

117. Композиция по п. 116, отличающаяся тем, что одна или несколько рекомбинантных нуклеиновых кислот экспрессируются в миелоидной клетке.

118. Композиция по п. 113, отличающаяся тем, что домен активатора транскрипции дополнительно содержит ДНК-связывающий домен.

119. Композиция по п. 118, отличающаяся тем, что ДНК-связывающий домен выбран из ДНК-связывающего домена (DB) Gal4, ZFHD1 или tet-R.

120. Композиция по п. 113, отличающаяся тем, что домен активатора транскрипции содержит домен трансактивации VP64.

121. Композиция по любому из пп. 113-120, отличающаяся тем, что протеаза, которая расщепляет последовательность расщепления протеазой, которая функционально связывает домен активатора транскрипции с внутриклеточной сигнальной субъединицей, представляет собой протеазу NS3 вируса гепатита С (HCV).

122. Композиция по любому из пп. 113-121, отличающаяся тем, что домен, который связывается с тирозиновыми остатками, которые фосфорилируются при активации CFP, представляет собой связывающий домен фосфотирозина (РТВ).

123. Композиция по п. 122, отличающаяся тем, что РТВ представляет собой Shc РТВ.

124. Композиция по любому из пп. 113-117, отличающаяся тем, что (с) представляет собой дегрон, функционально связанный с (b).

126. Композиция по п. 124, отличающаяся тем, что дегрон представляет собой дегрон NIF-1a.

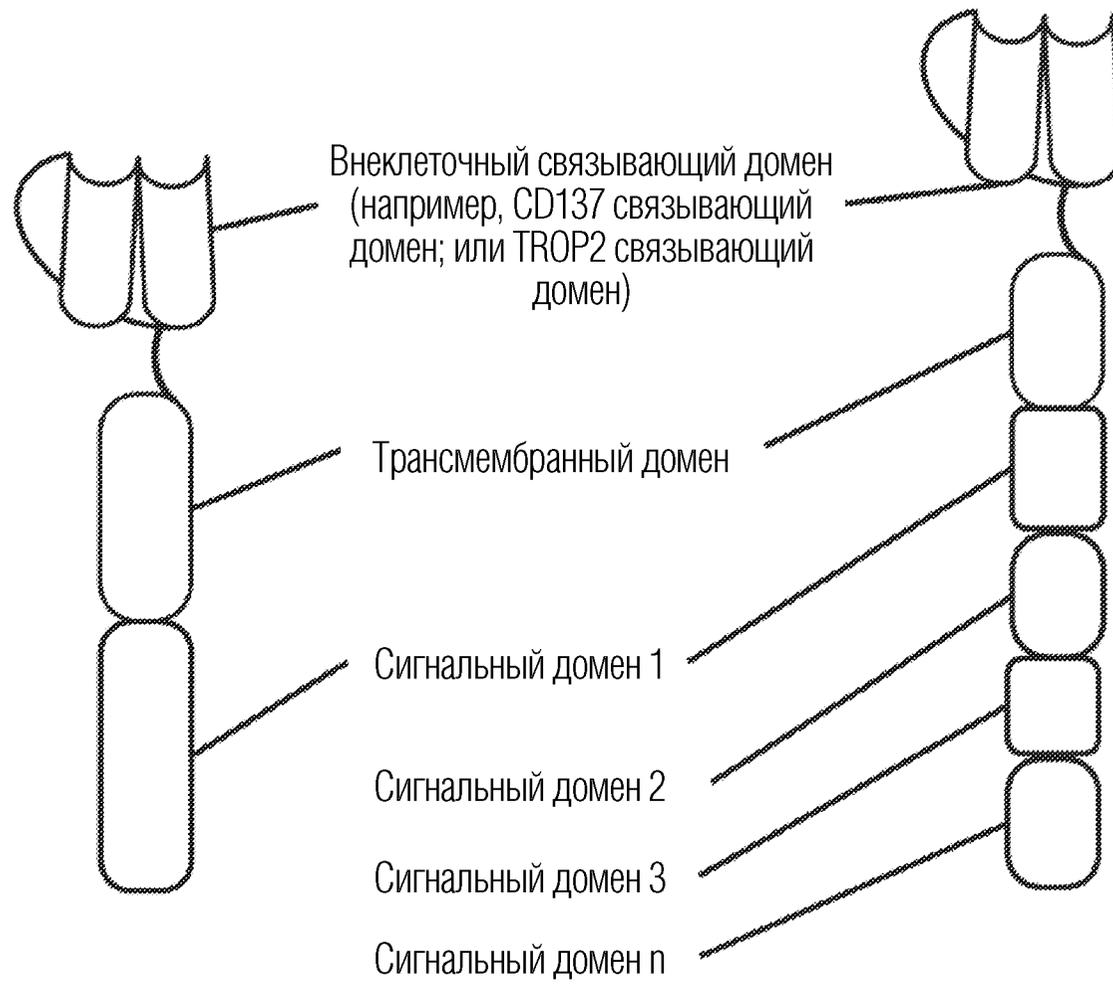
127. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по любому из пп. 113-125 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

128. Клетка, содержащая композицию по любому из пп. 113-125.

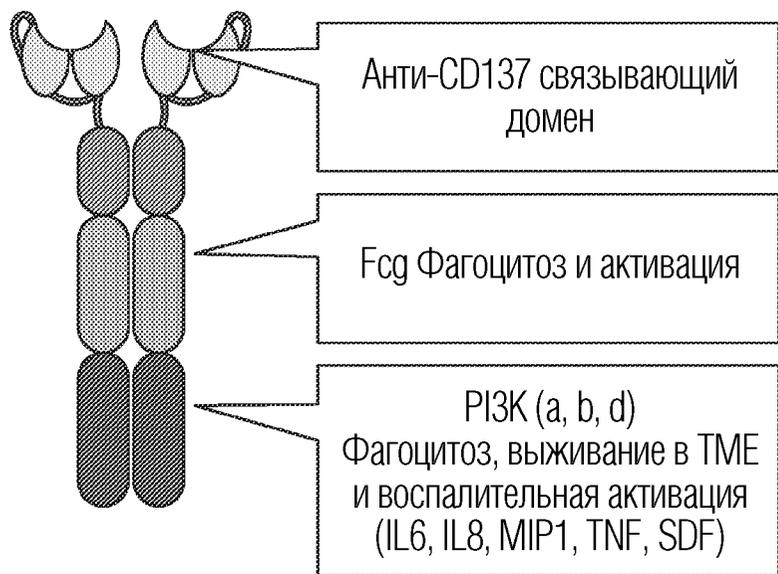
129. Клетка по п. 128, отличающаяся тем, что клетка представляет собой CD14+.

130. Способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение субъекту любого из: (i) фармацевтической композиции по п. 126; или

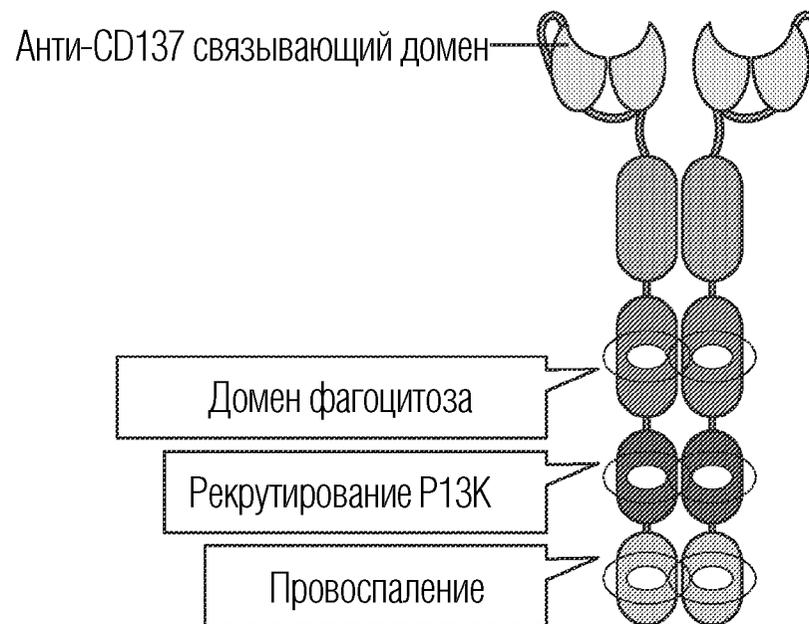
(ii) клетки по п. 127 или п. 128.



ФИГ. 1

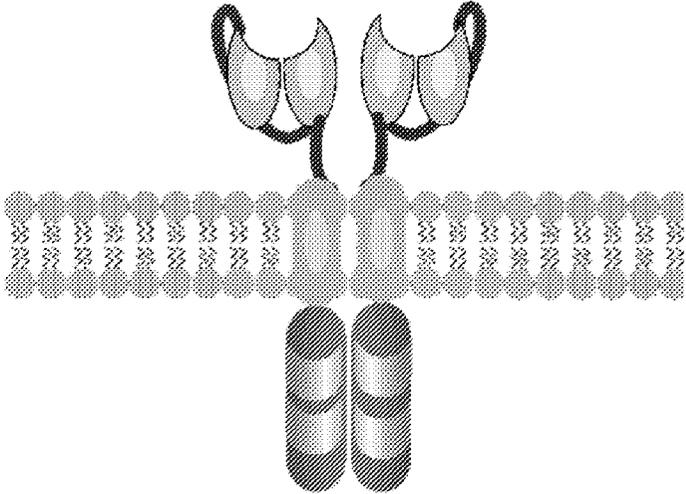


ФИГ. 2А

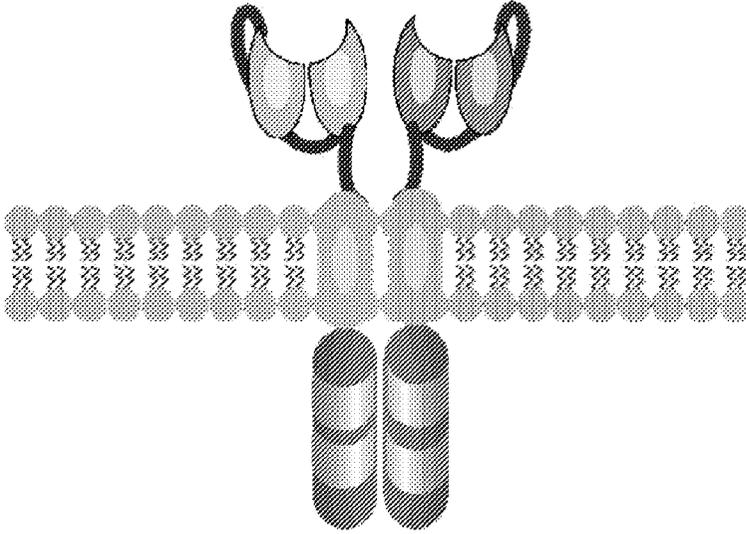


ФИГ. 2В

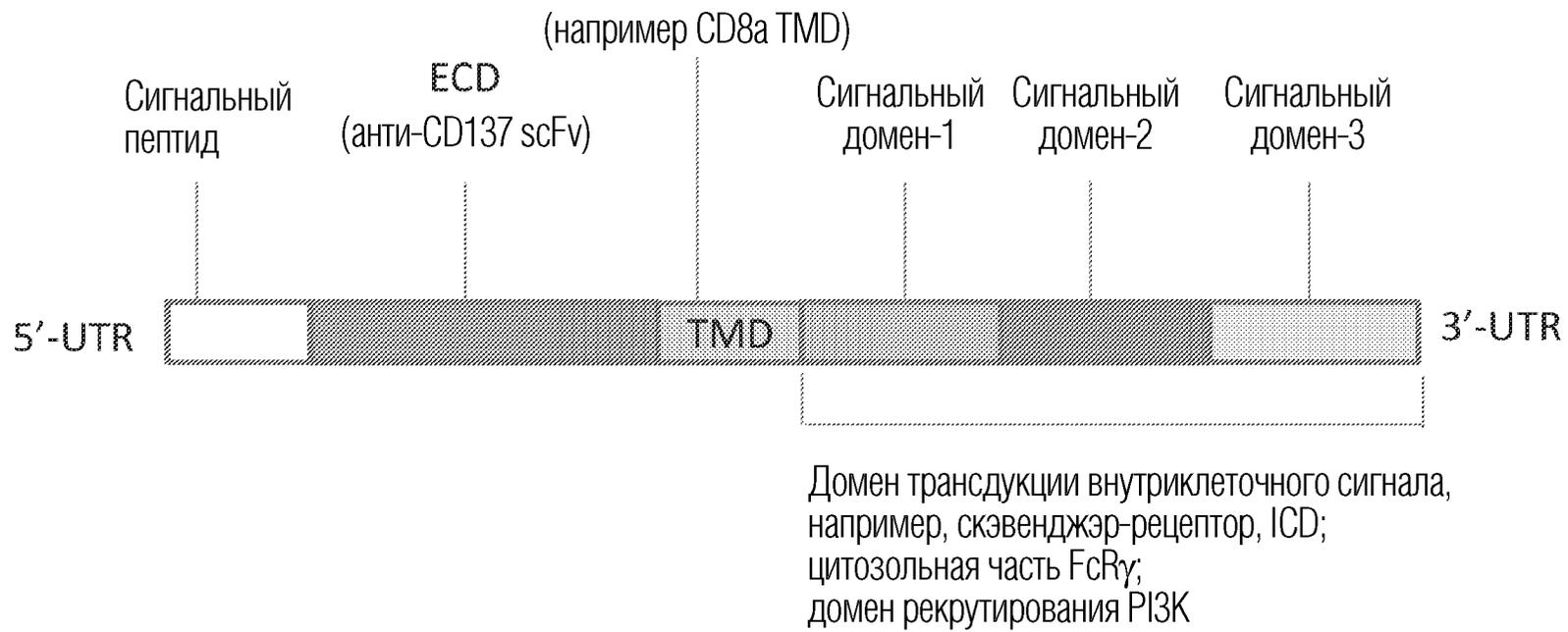
Одна мишень



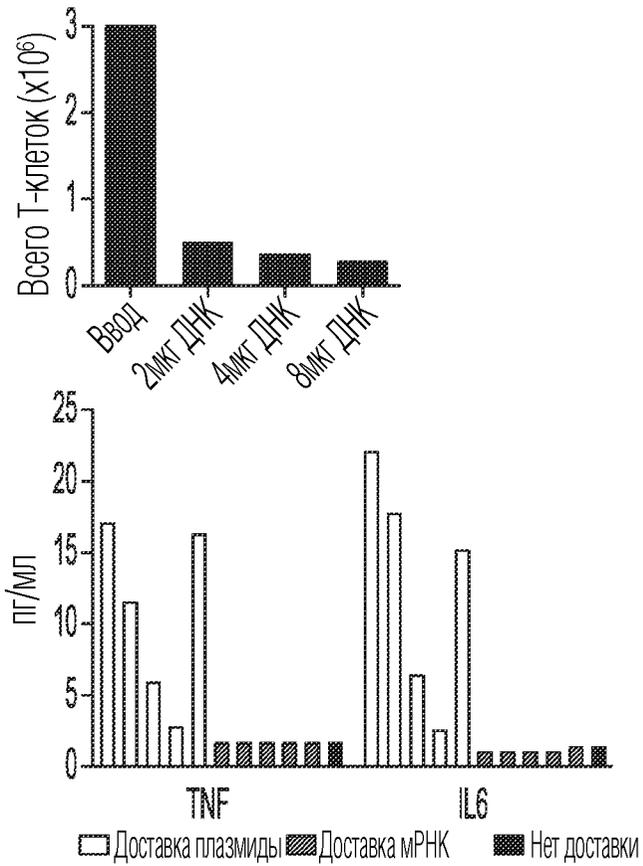
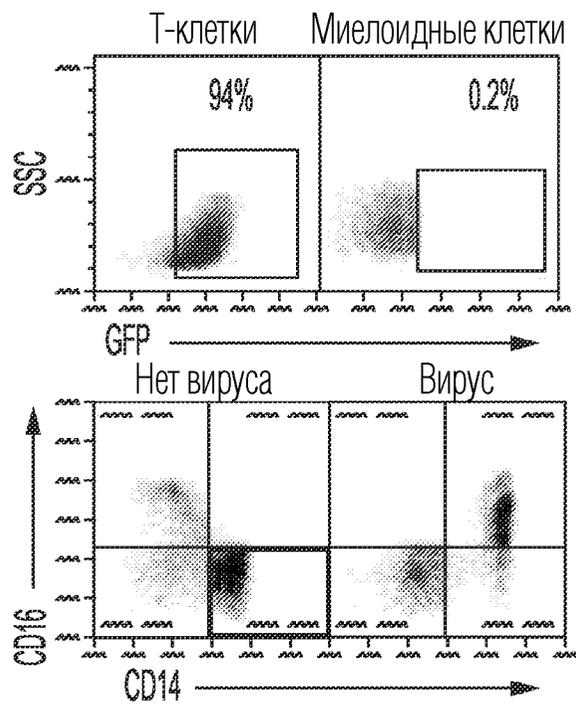
Мультимишень



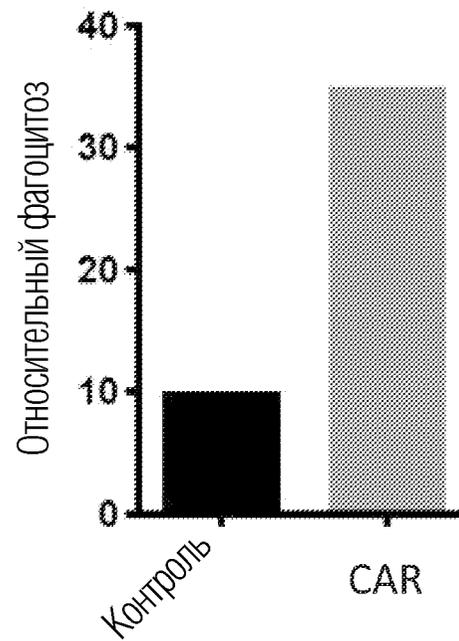
ФИГ. 3



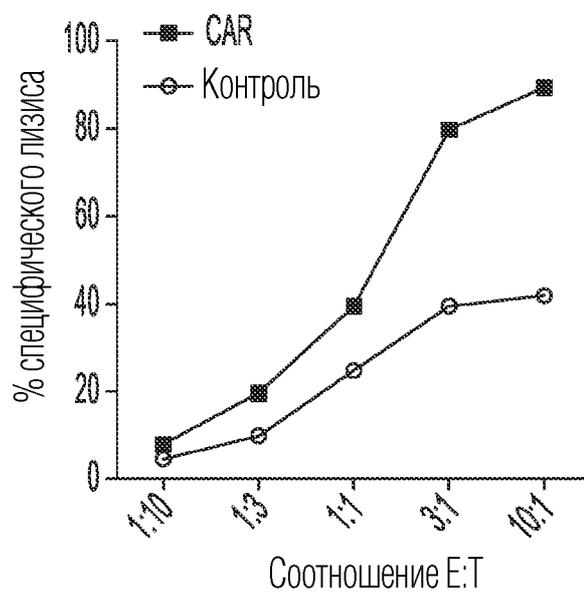
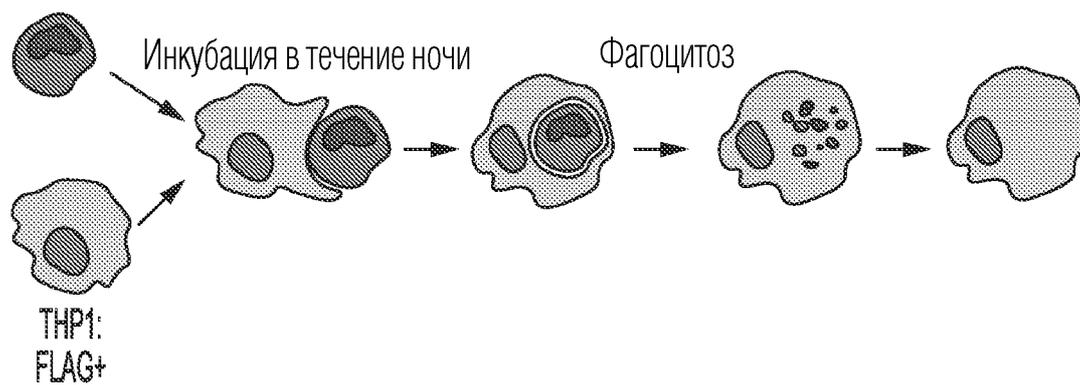
ФИГ. 4А



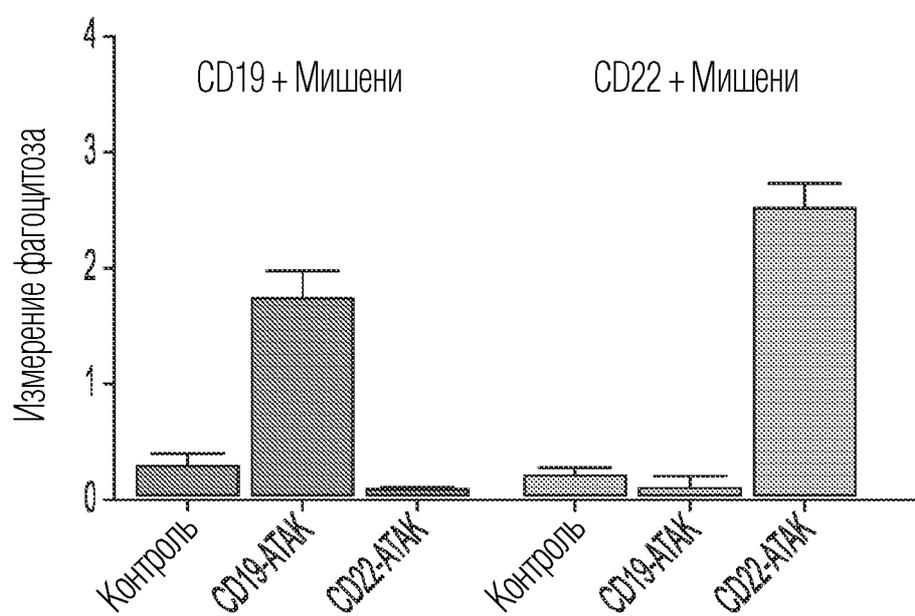
ФИГ. 4В



ФИГ. 5



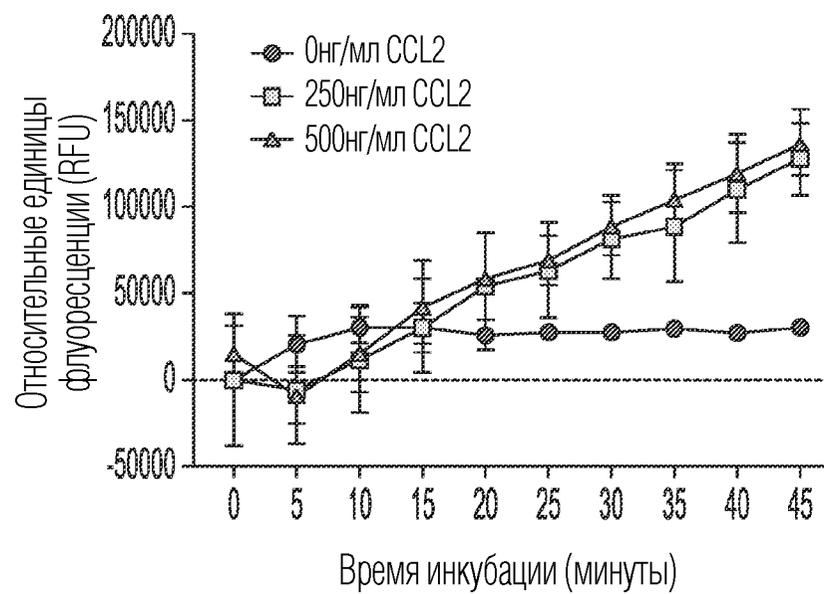
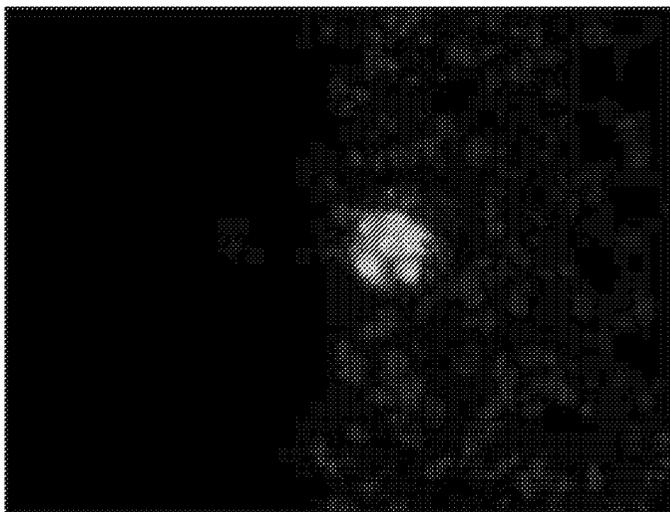
ФИГ. 6А



ФИГ. 6В

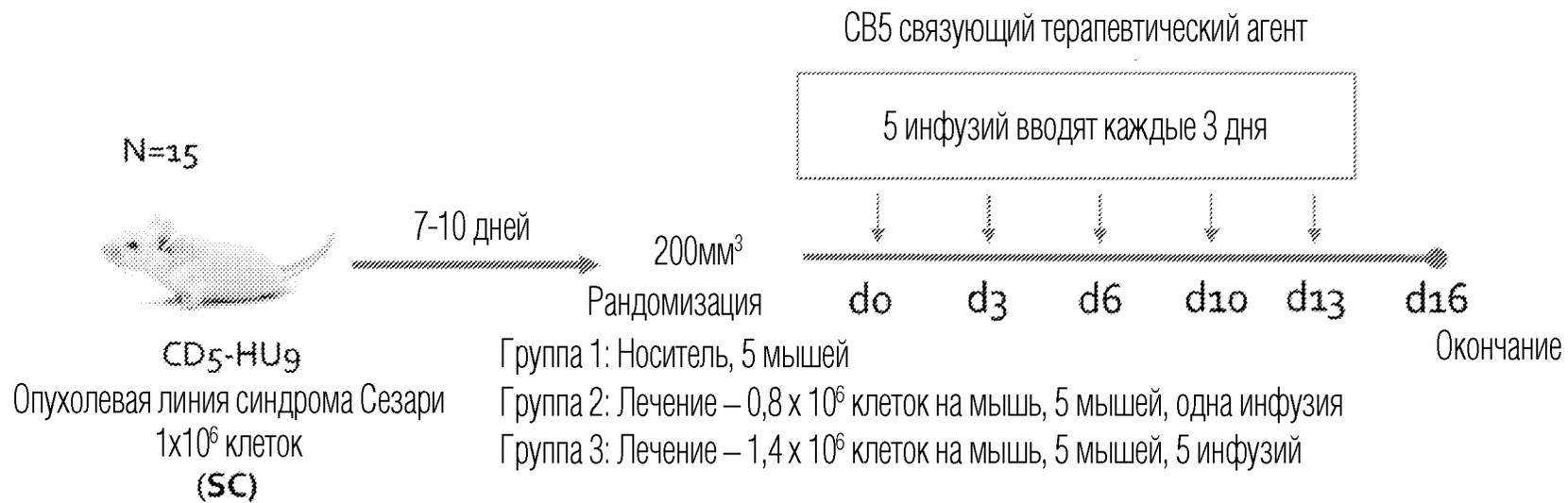
MSTO Опухоль + АТАК-CFSE

Опухоль (24 часа)

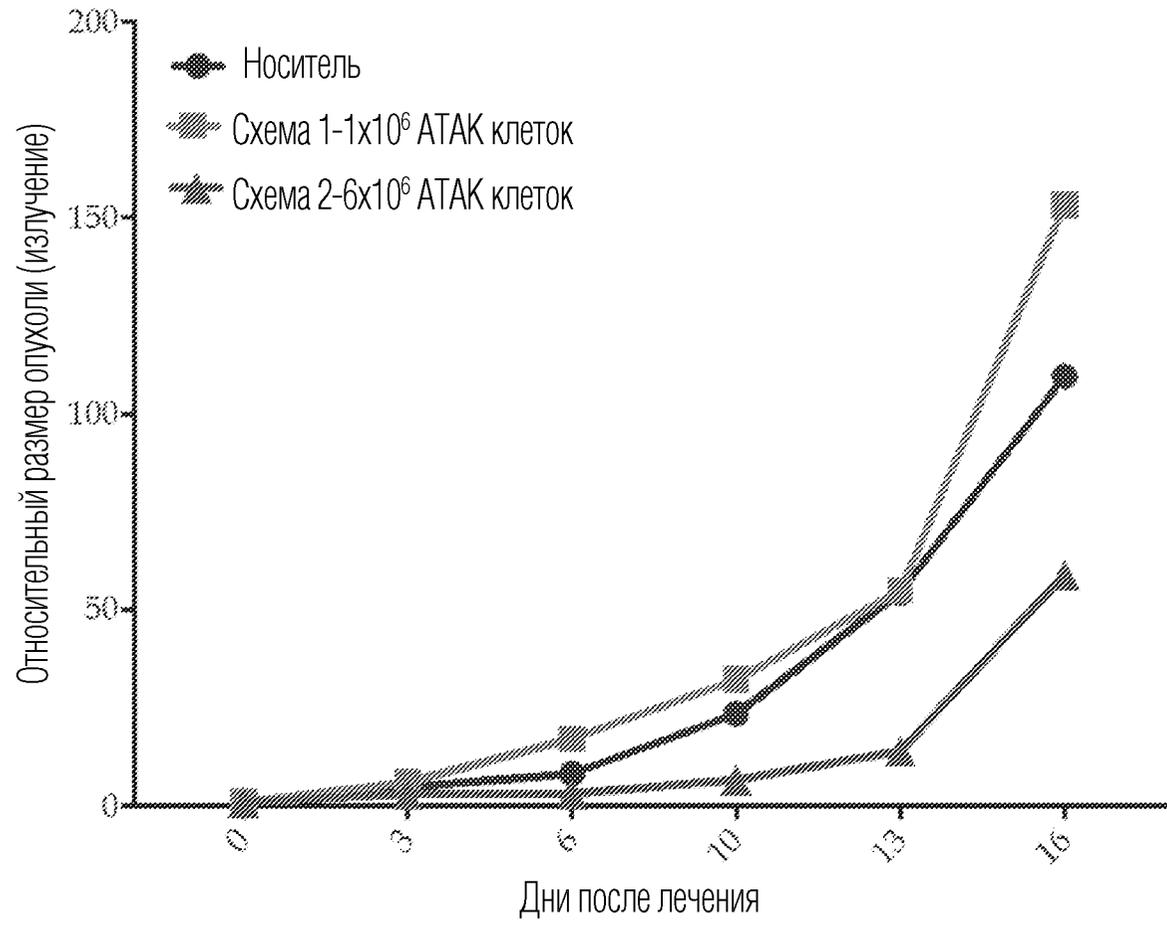


ФИГ. 6С

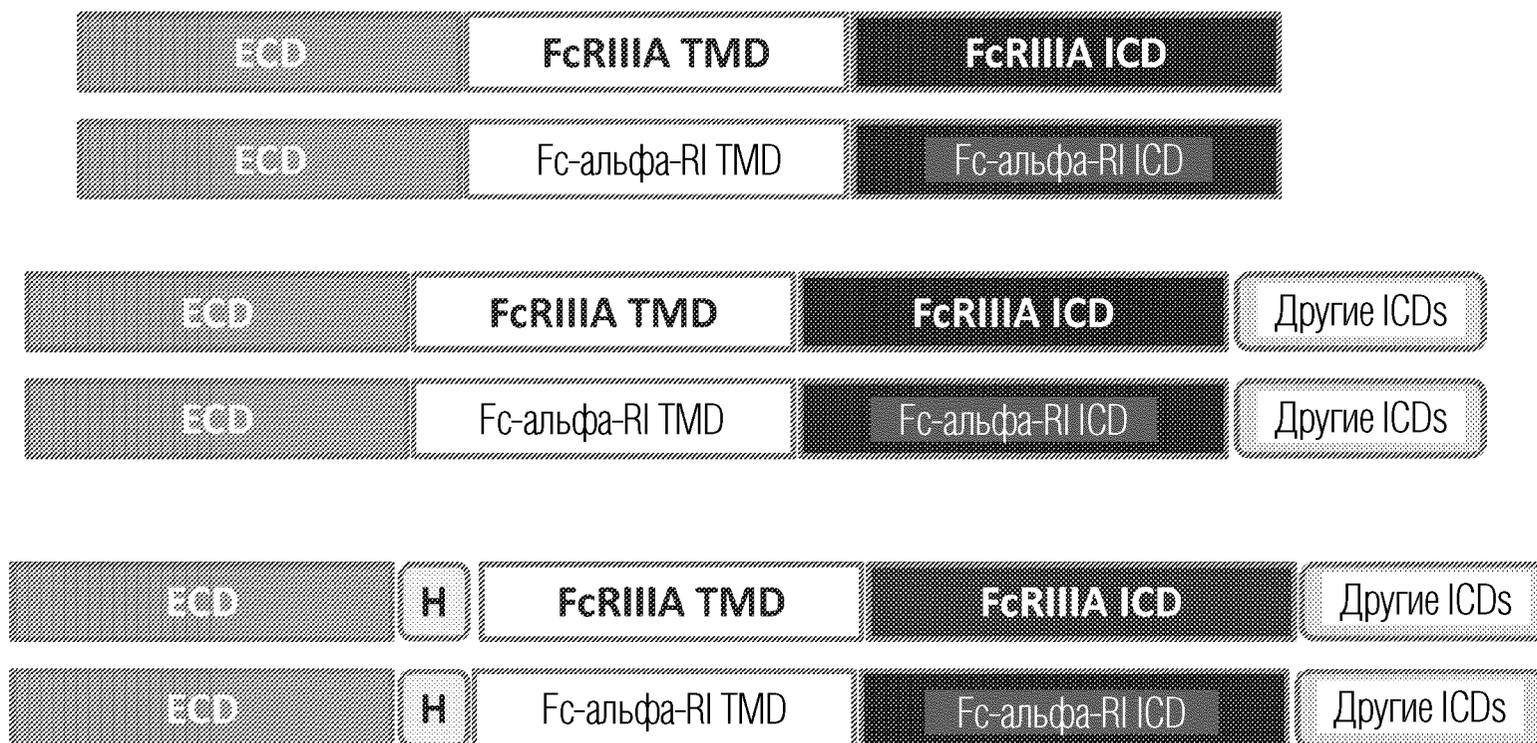




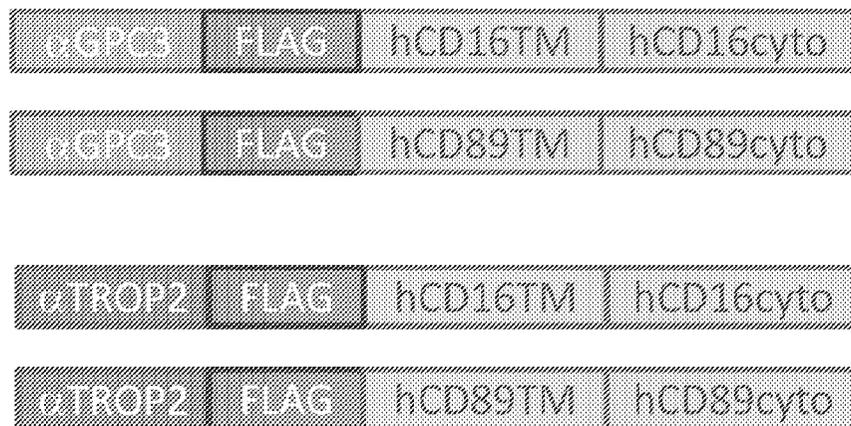
ФИГ. 7В



ФИГ. 7С



ФИГ. 8



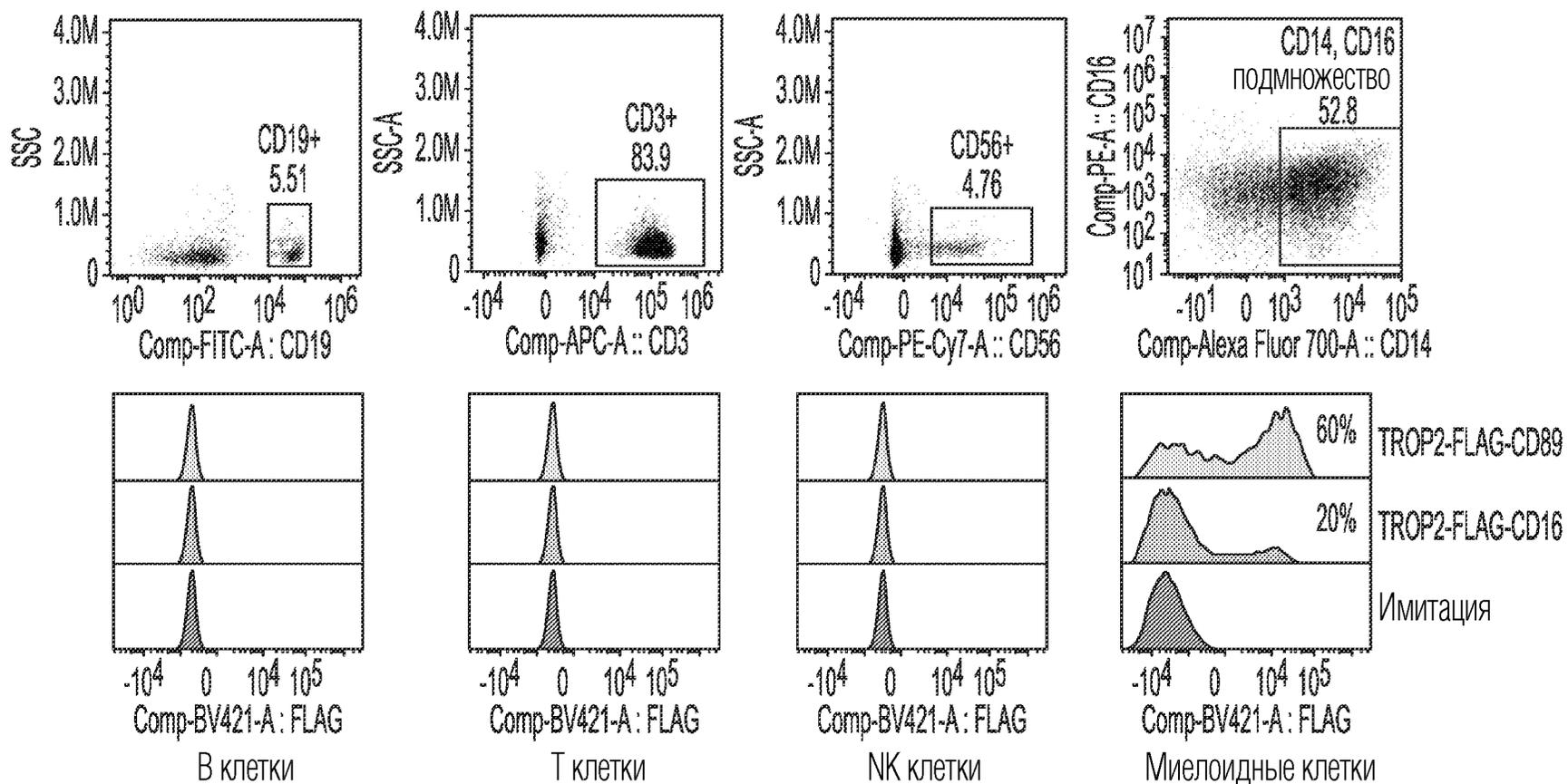
EP PBMCs  
200ug/ml RNA

Экспрессия  
Специфическое уничтожение опухолевых  
клеток-мишеней  
Цитокин/хемокин

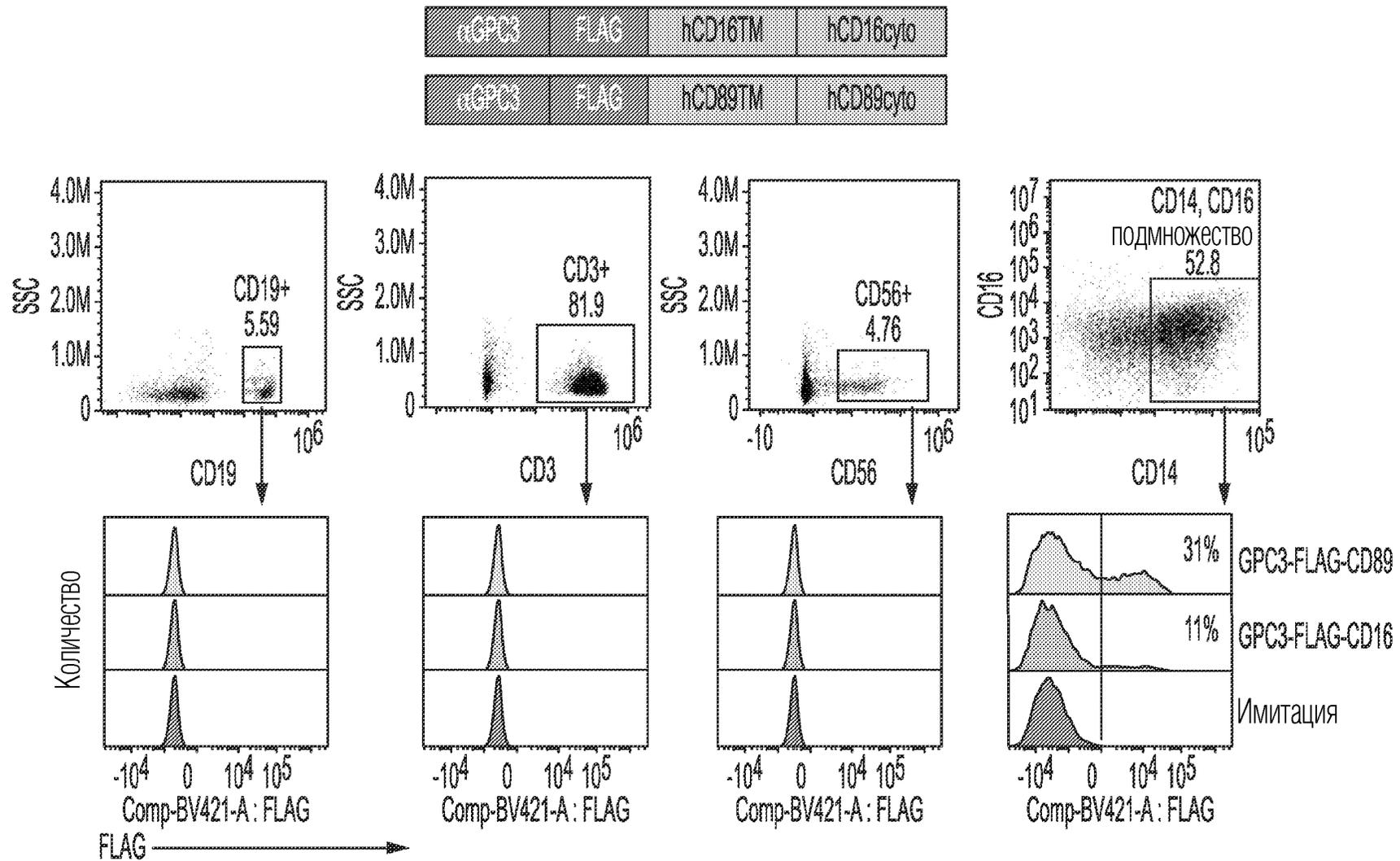
14/90

ФИГ. 9

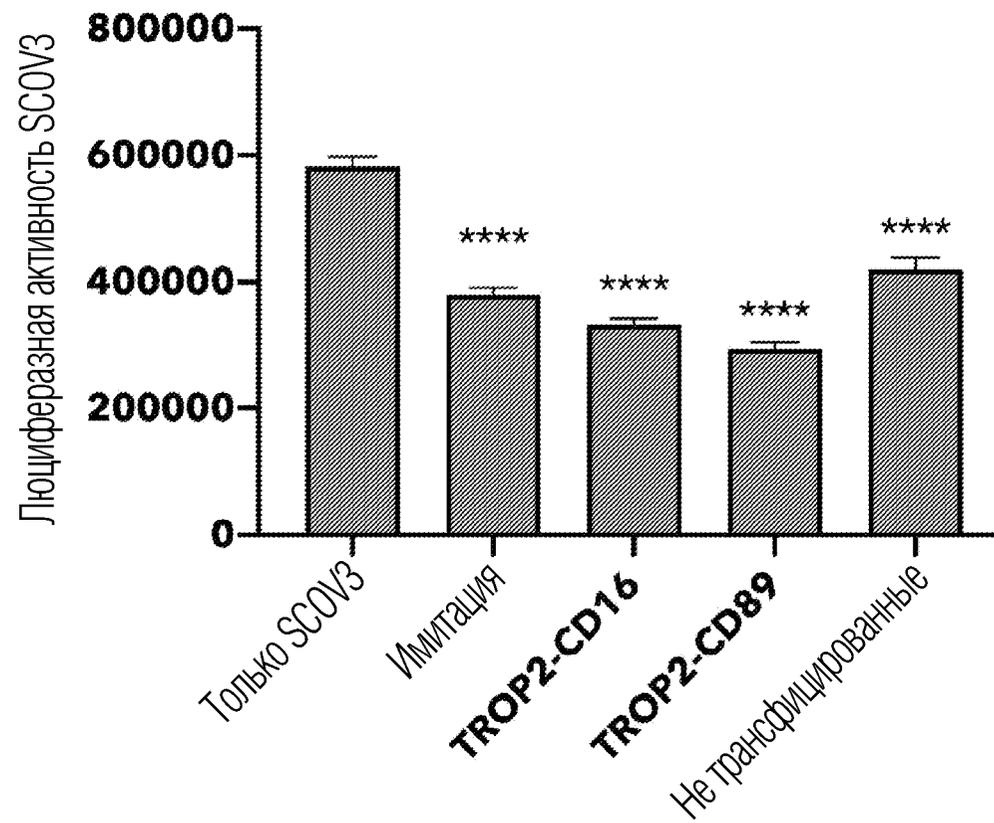
αTROP2	FLAG	hCD16TM	hCD16cyto
αTROP2	FLAG	hCD89TM	hCD89cyto



ФИГ. 10А

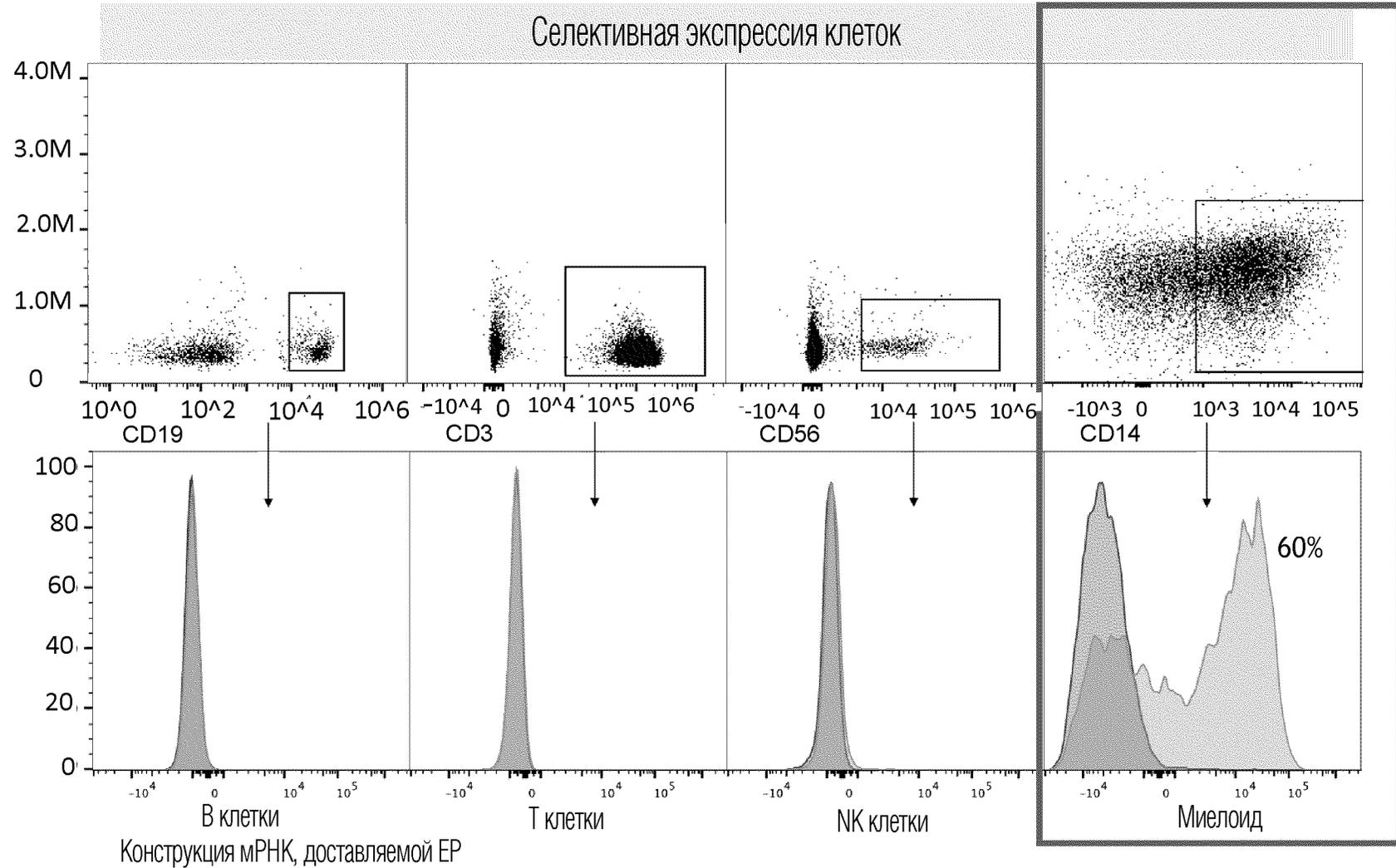


ФИГ. 10В

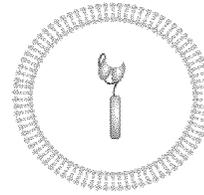


ФИГ. 11А

$\alpha$ TROP2    FLAG    hCD89TM    hCD89cyto

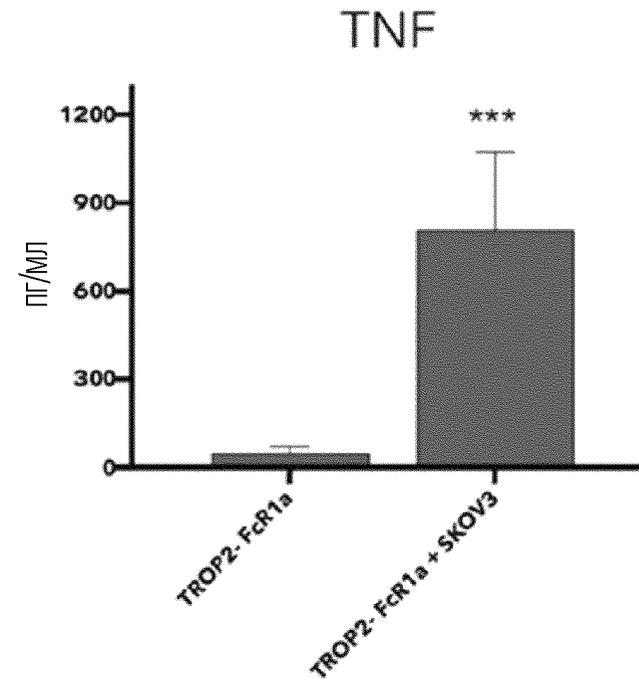
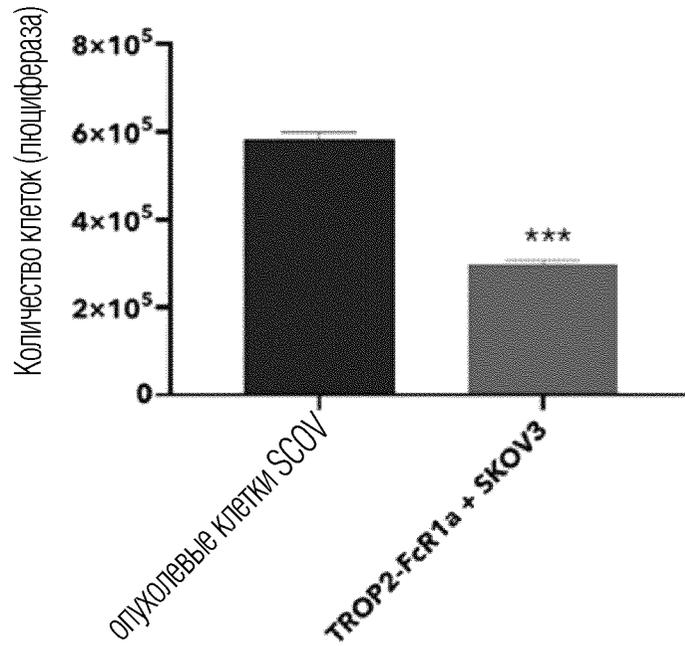


ФИГ. 11В

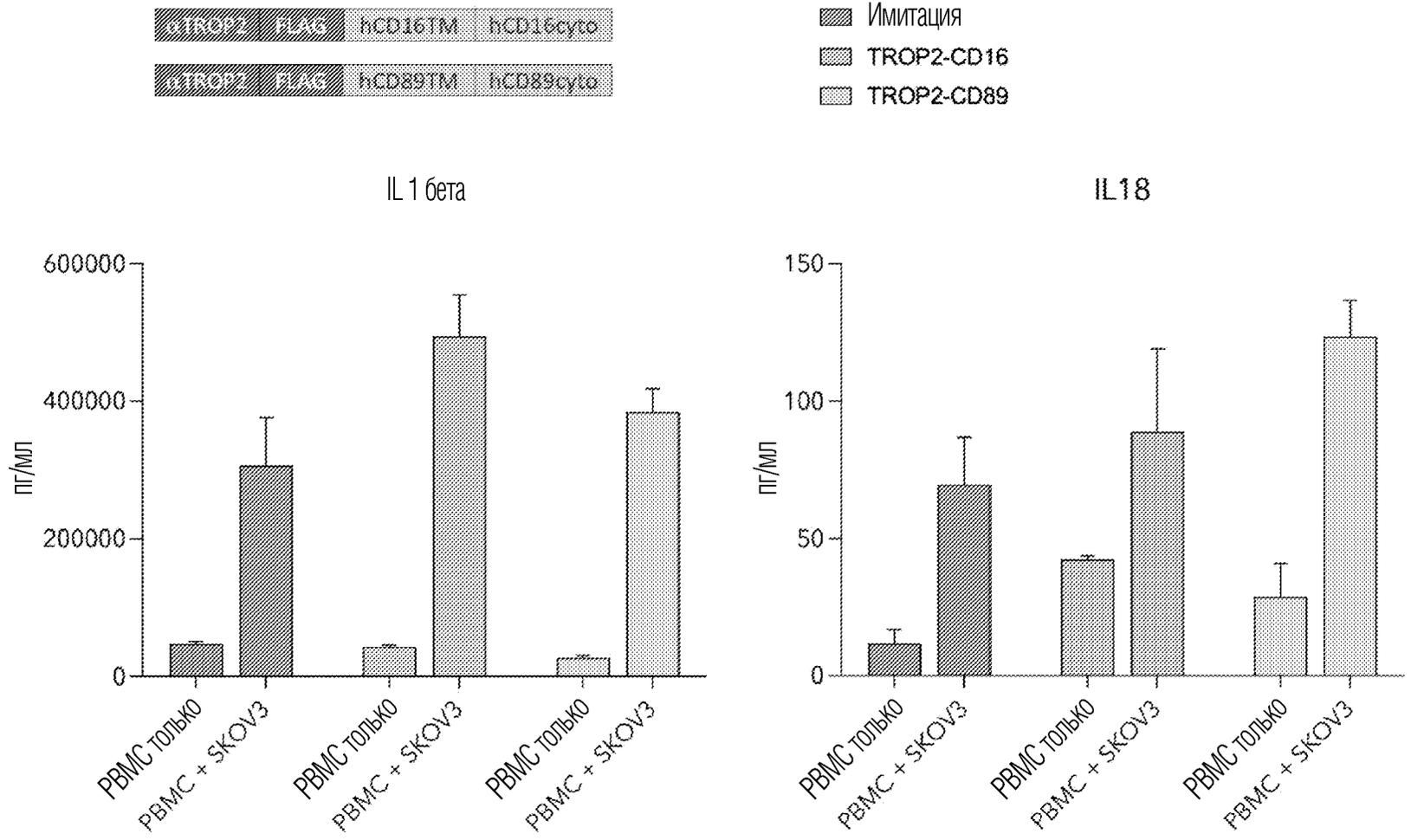


Специфический фагоцитоз опухоли

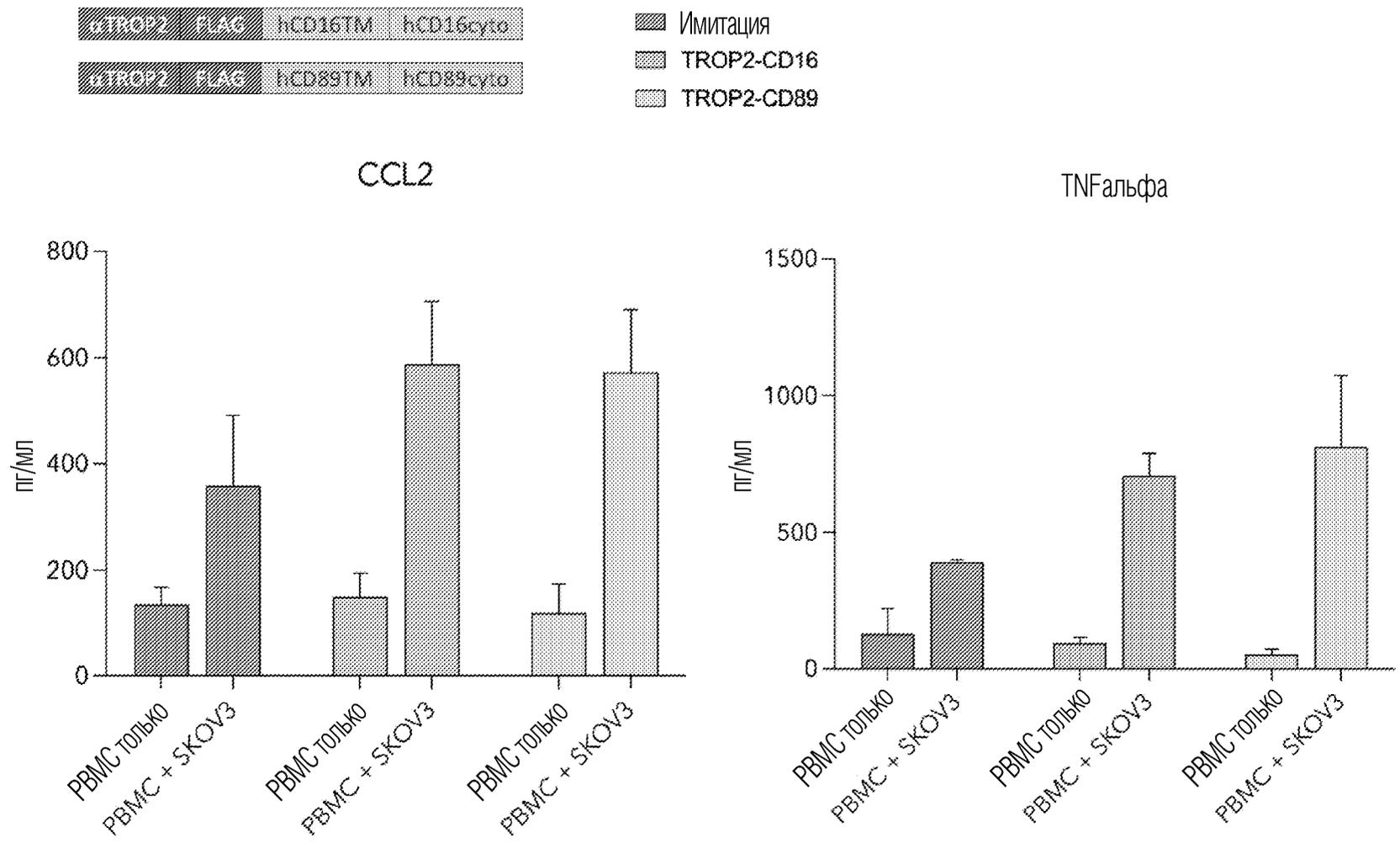
Противоопухолевые цитокины



ФИГ. 11В (продолжение)

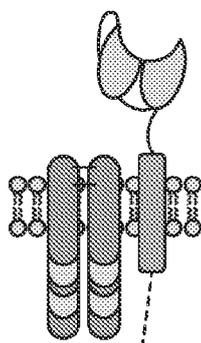


ФИГ. 12А



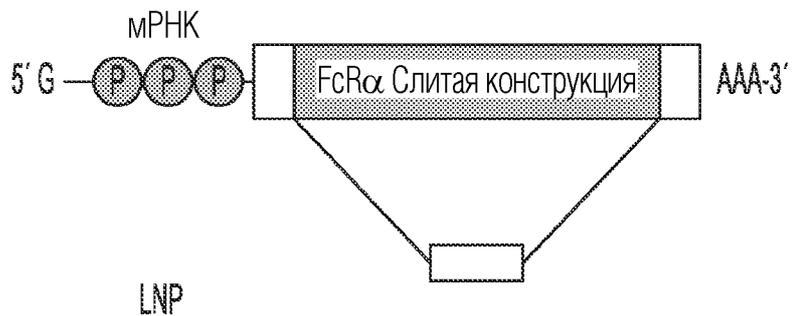
ФИГ. 12В

Fc рецепторы Harnessing

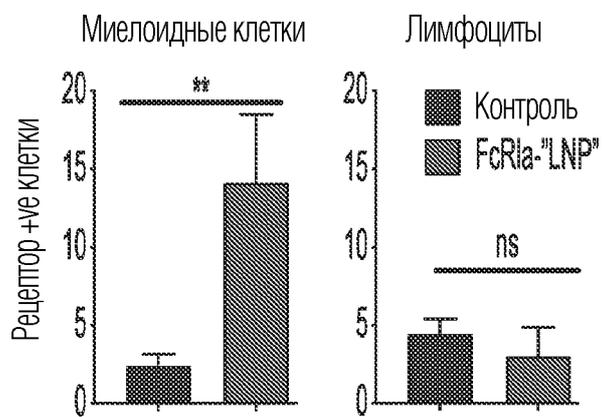


FcR1  $\alpha$ -цепь (CD89)

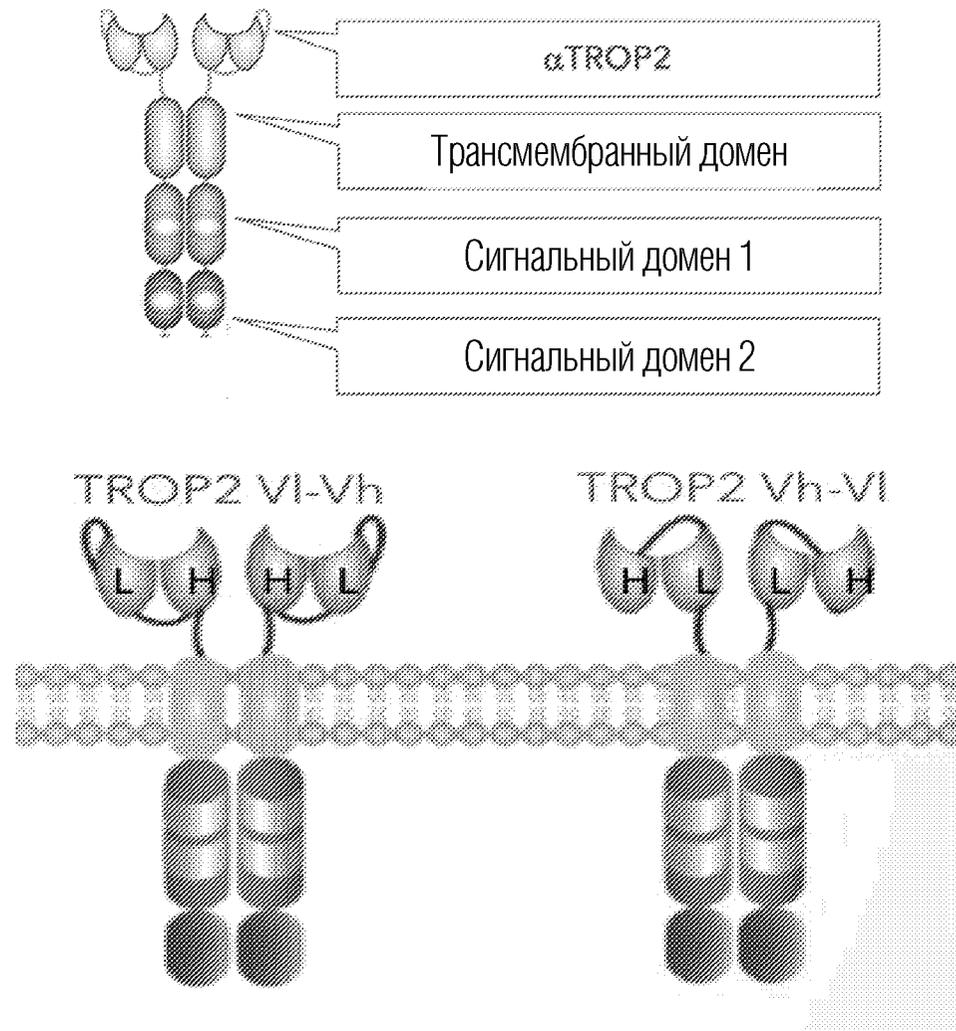
Развитие мРНК и LNP



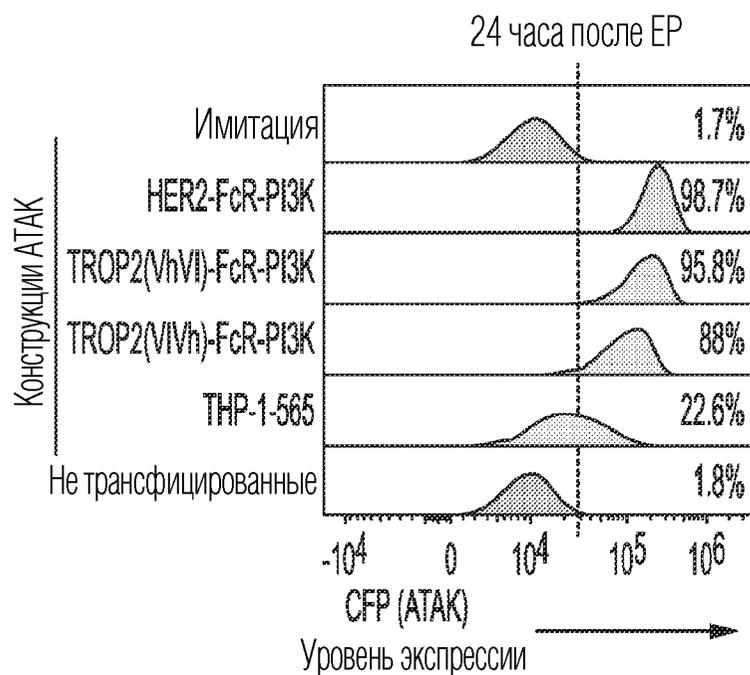
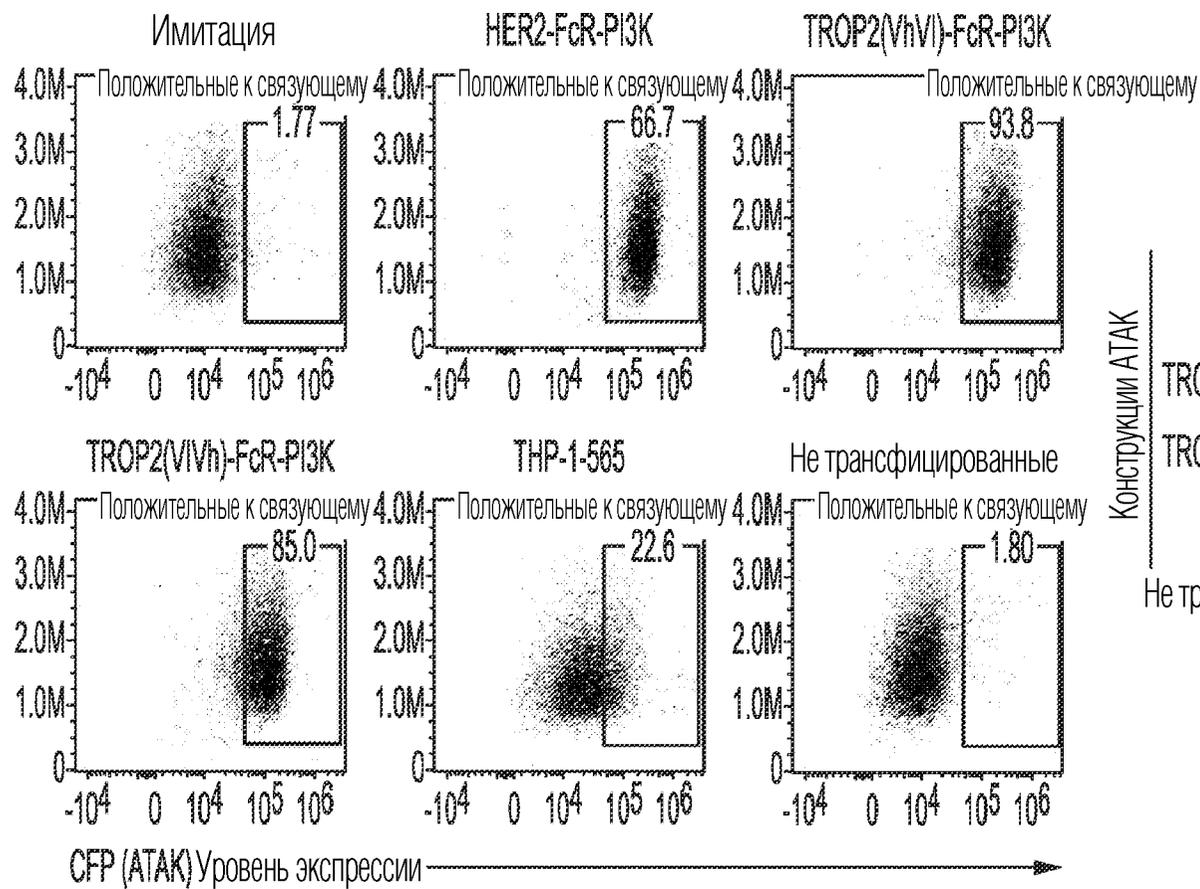
Доставка in vivo



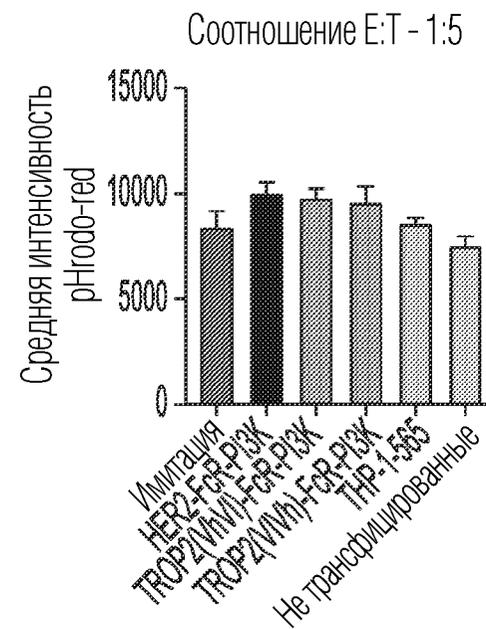
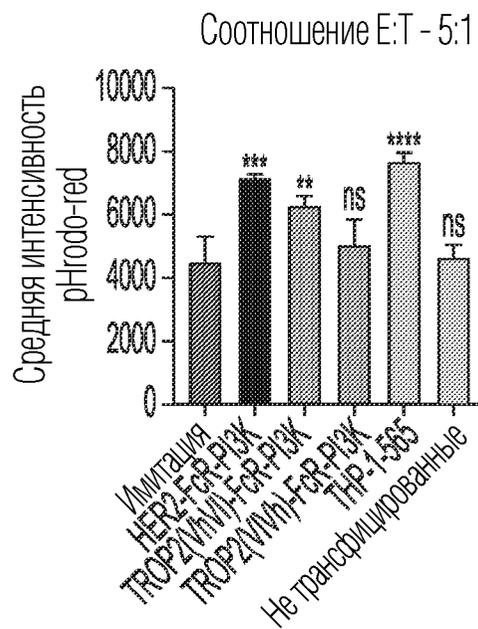
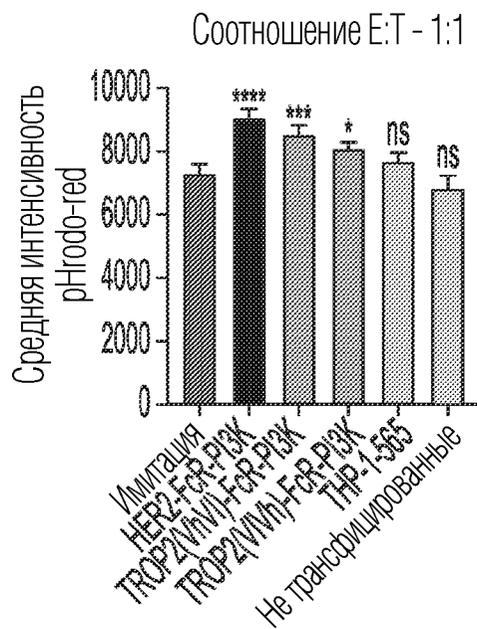
ФИГ. 12С



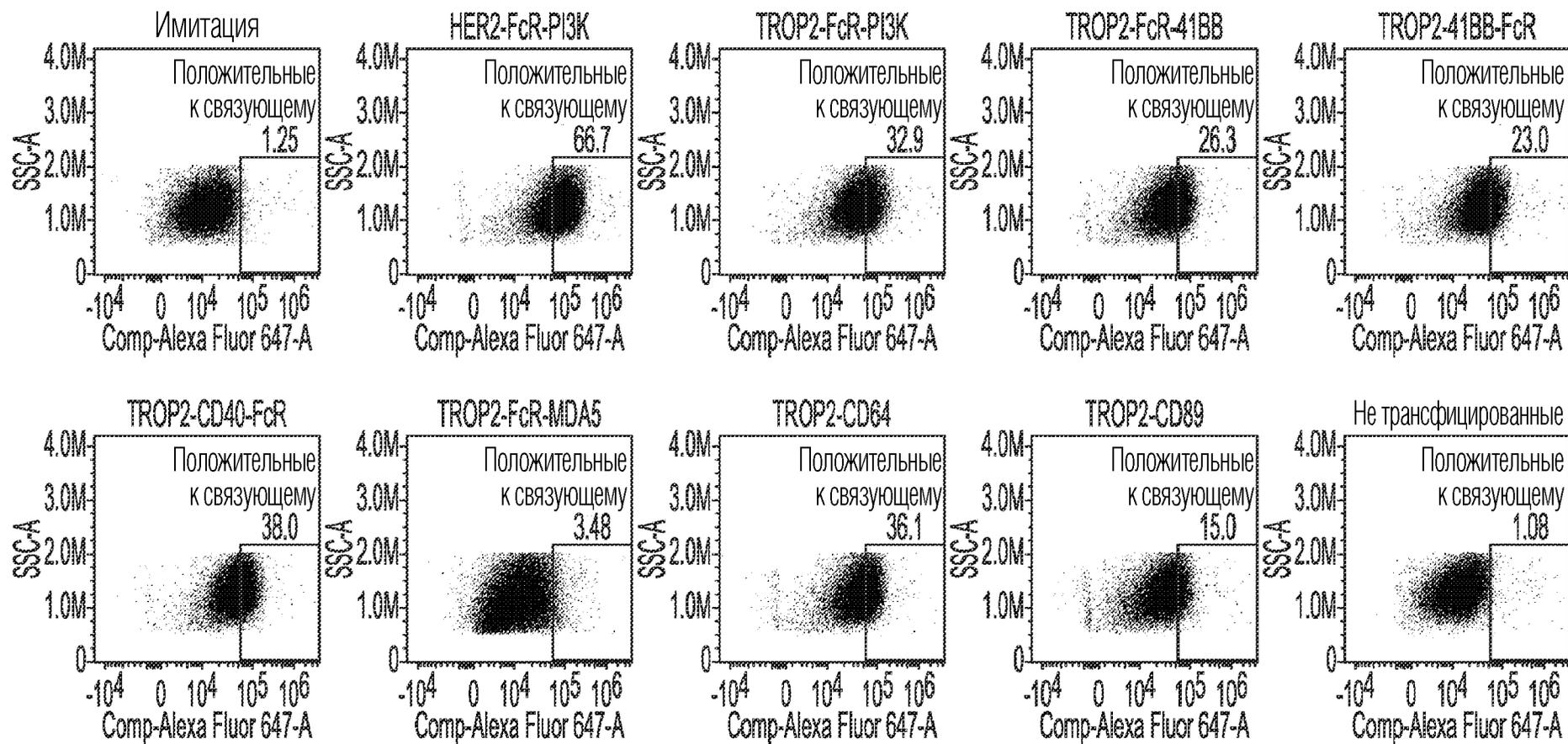
ФИГ. 13А



ФИГ. 13В

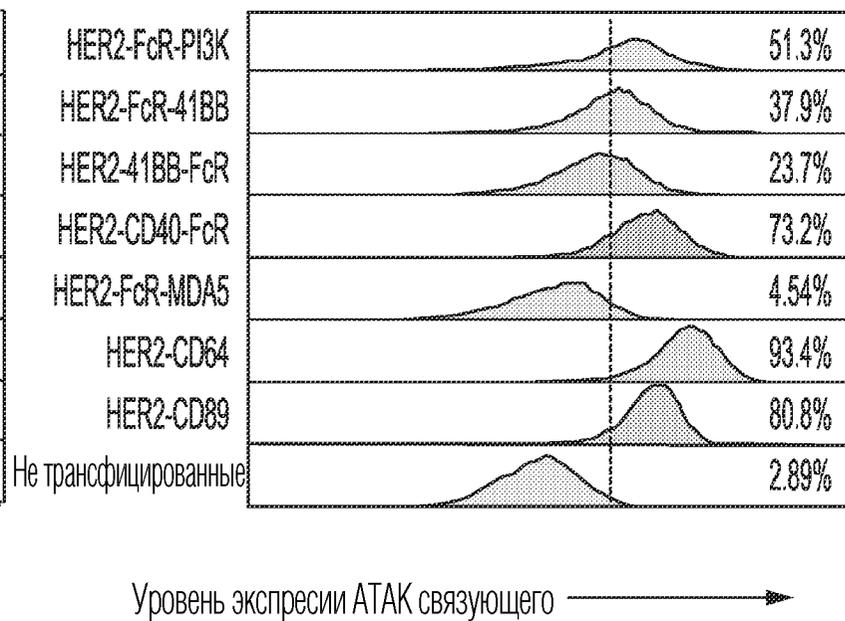
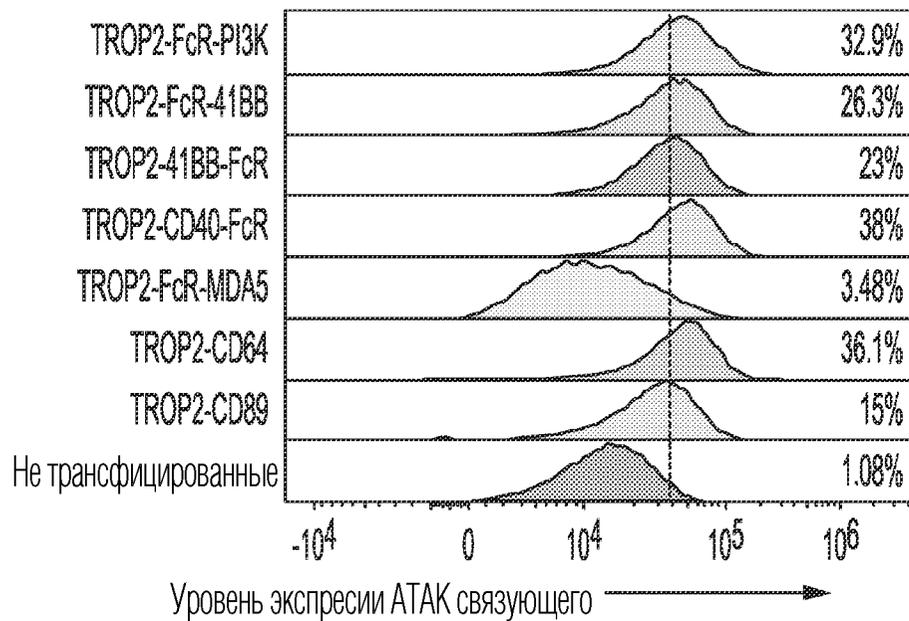


ФИГ. 13С

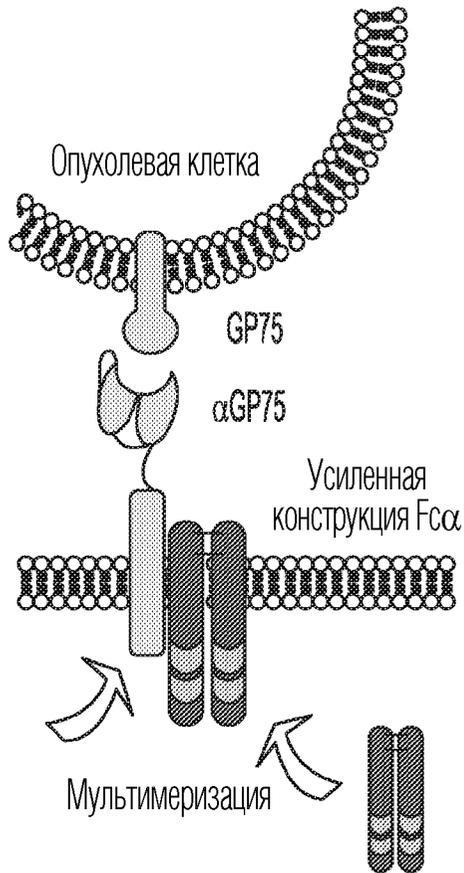


Уровень экспрессии АТАК связующего →

ФИГ. 13D



ФИГ. 13Е



Рецептор 1 поколения положительного контроля АТАК  
(рецептор клеточной терапии)



Fc $\alpha$  слитая CD16 конструкция



CD89 $\alpha$  Слитая конструкция

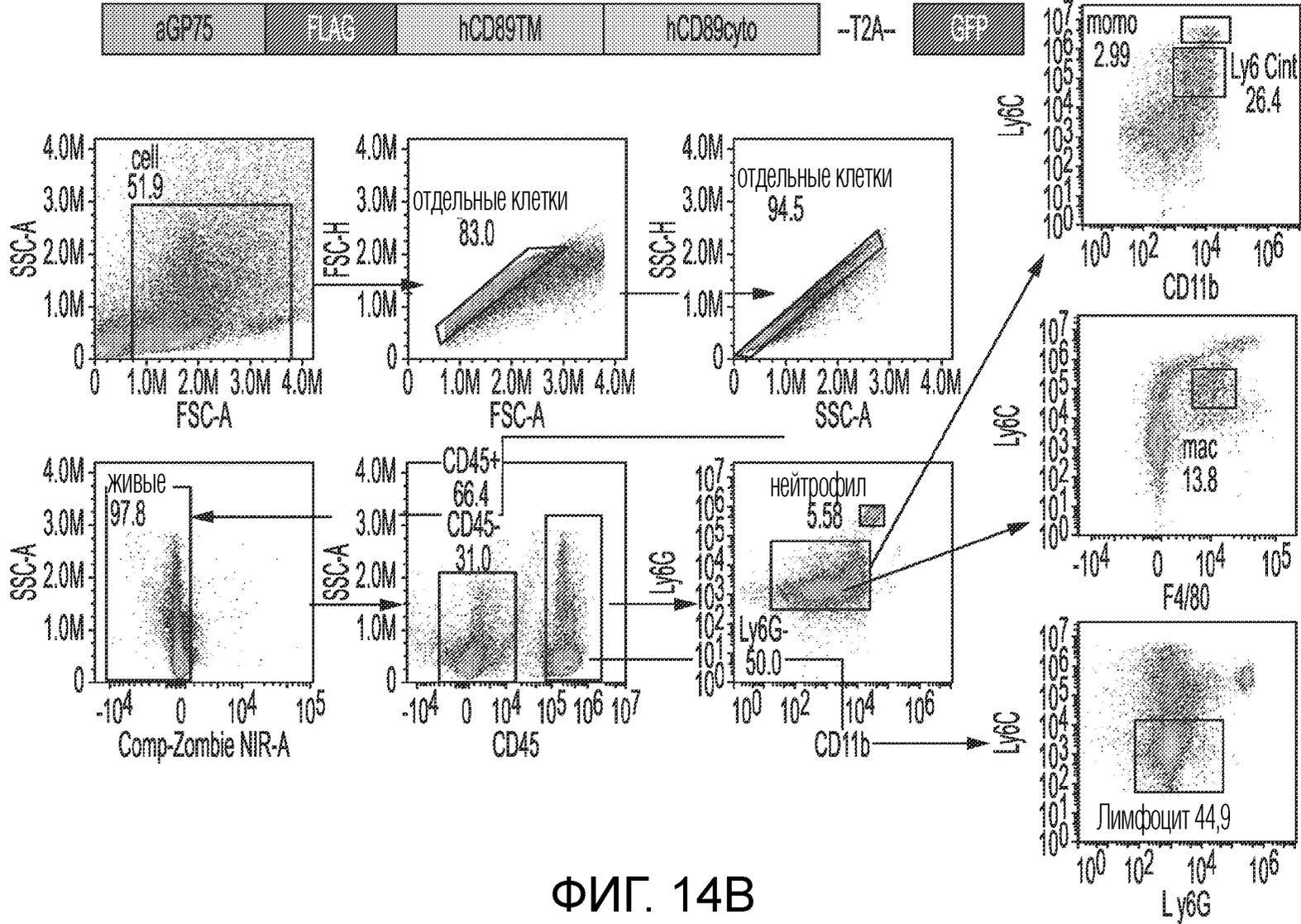
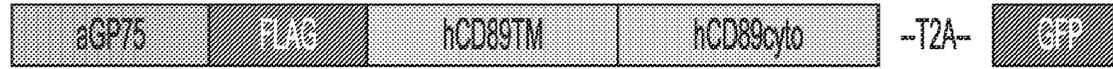


Экспериментальные конструкции на основе CD16

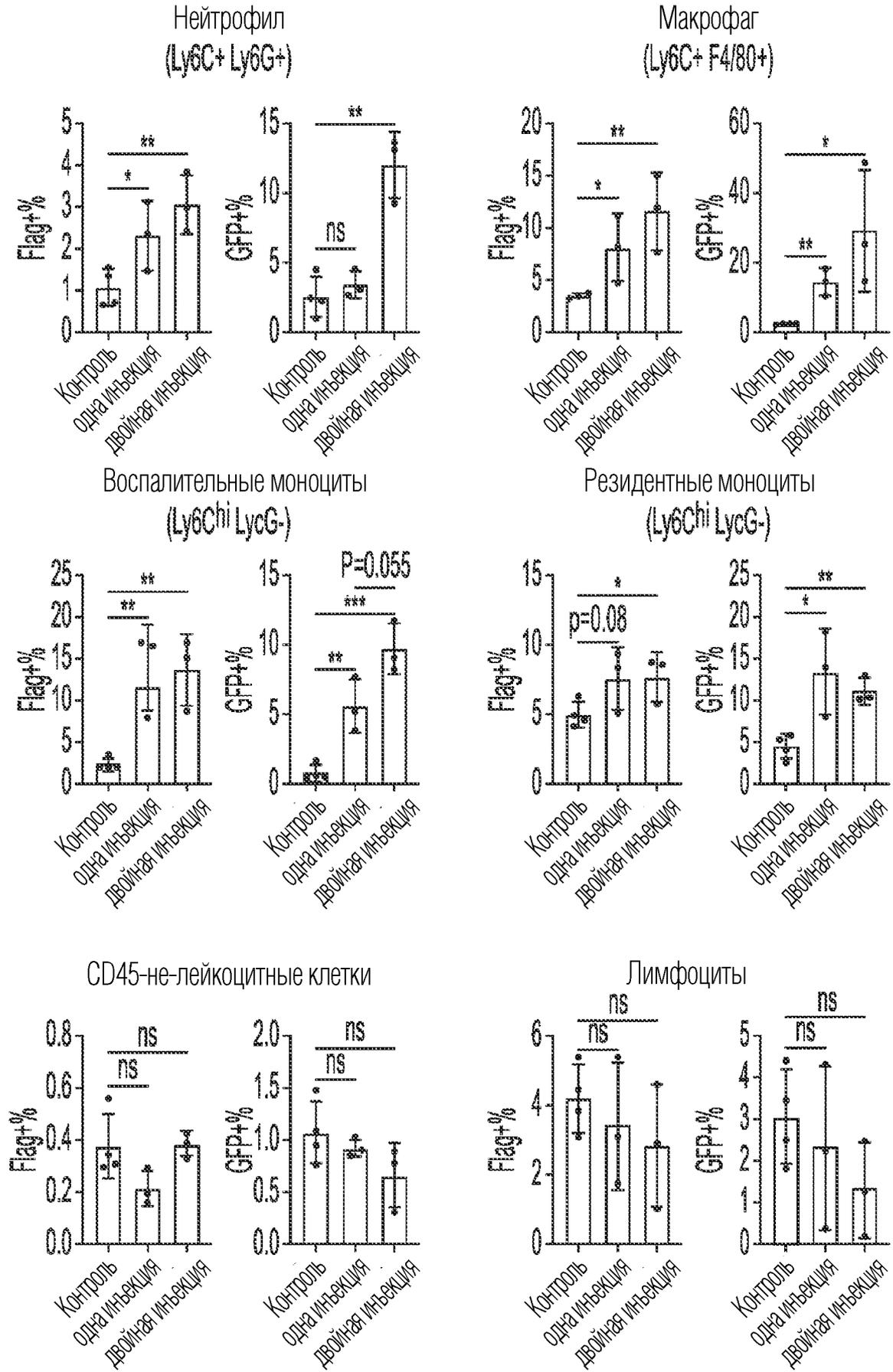


ФИГ. 14А

CD89α Слитая конструкция

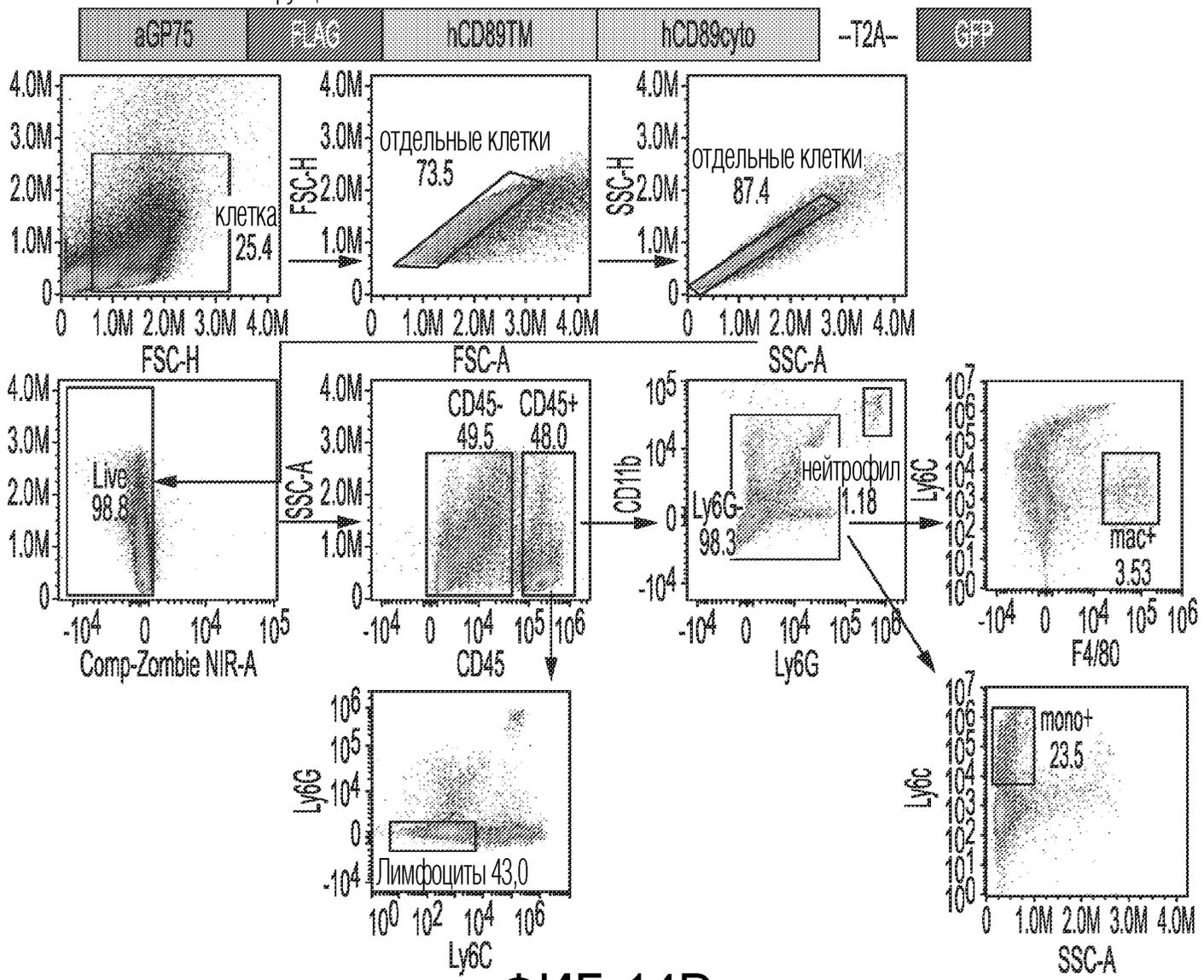


ФИГ. 14В

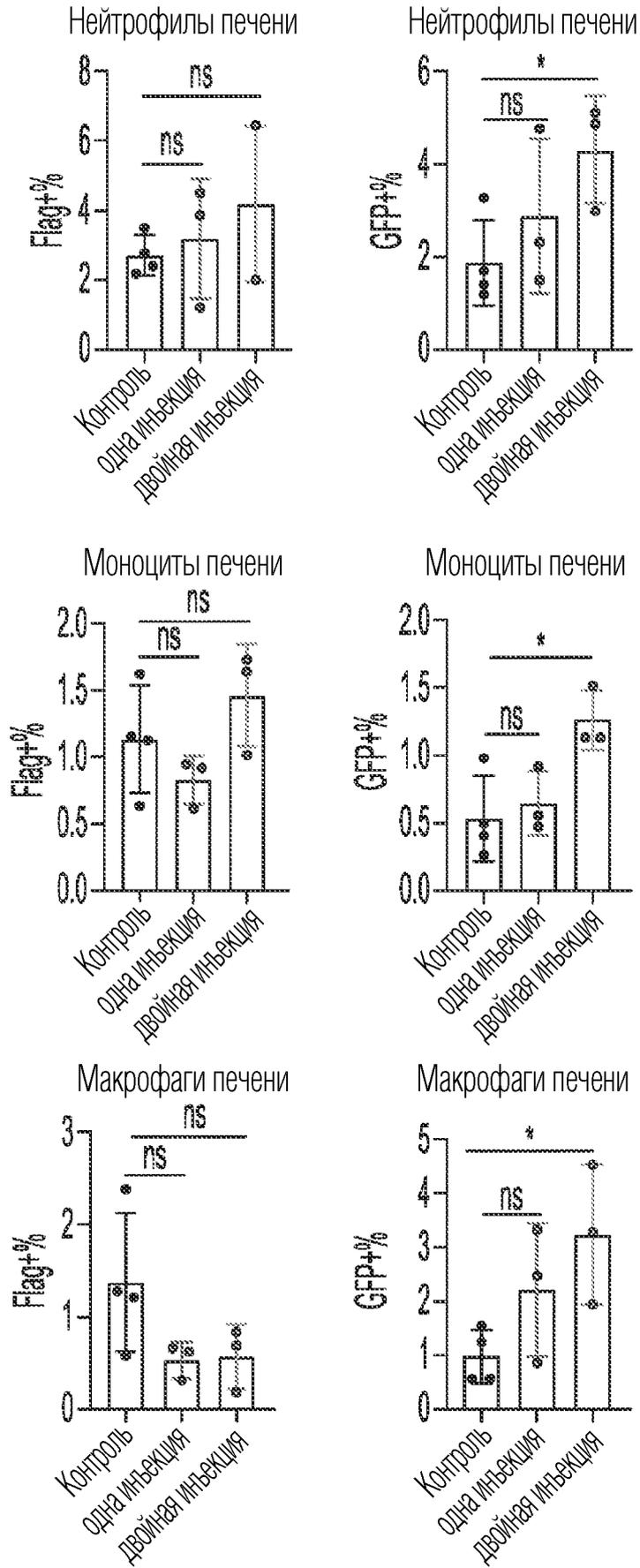


ФИГ. 14С

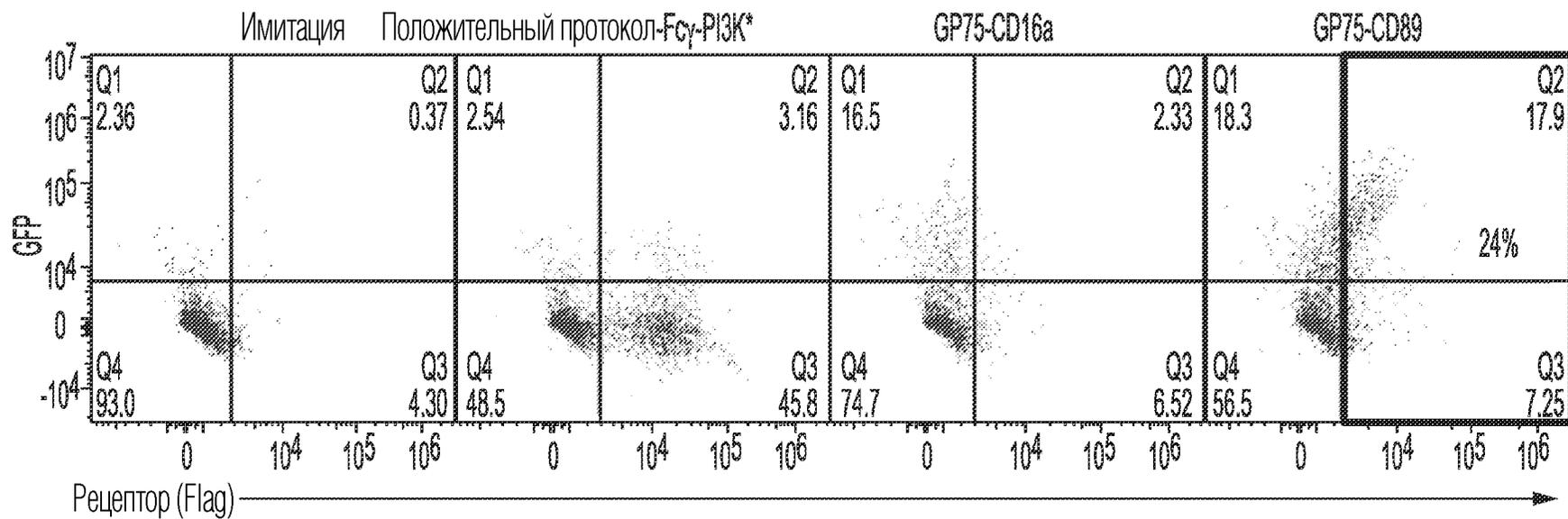
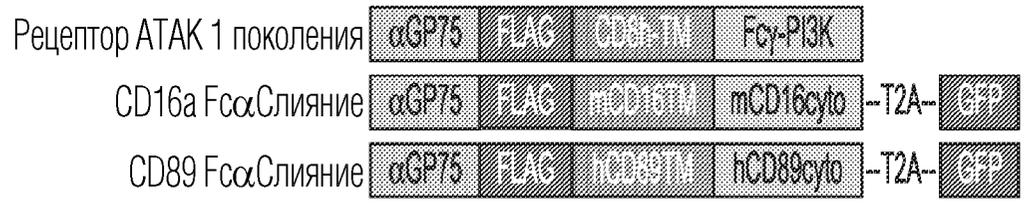
CD89α Слитая конструкция



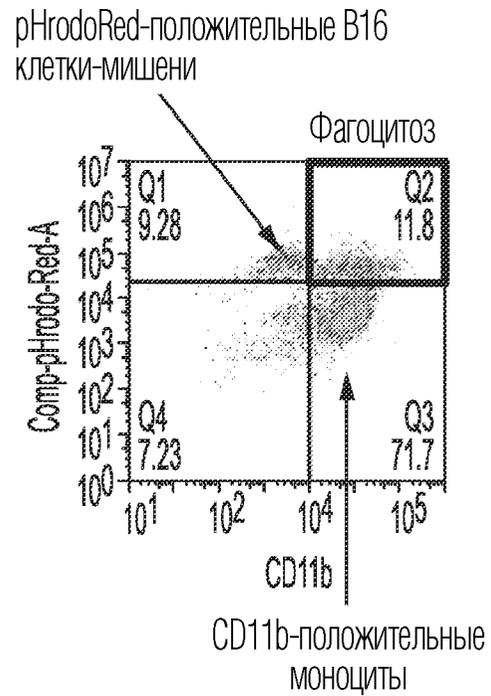
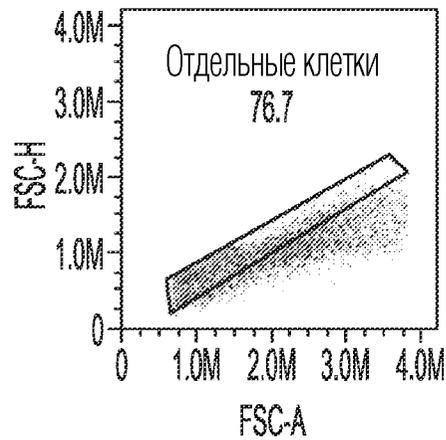
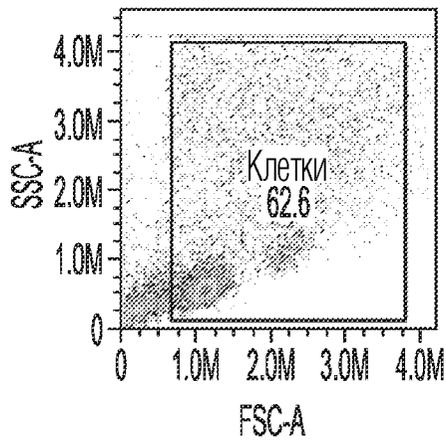
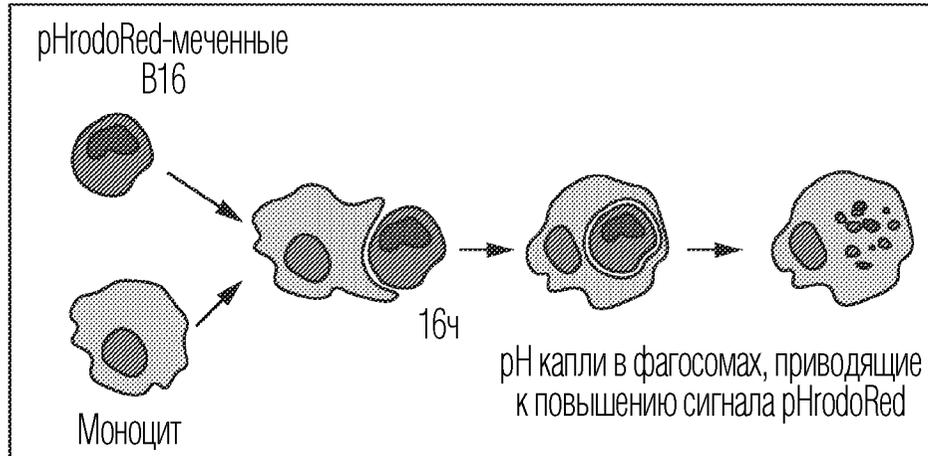
ФИГ. 14D



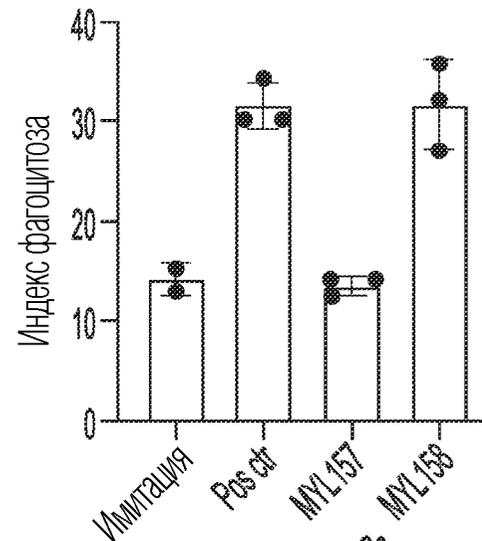
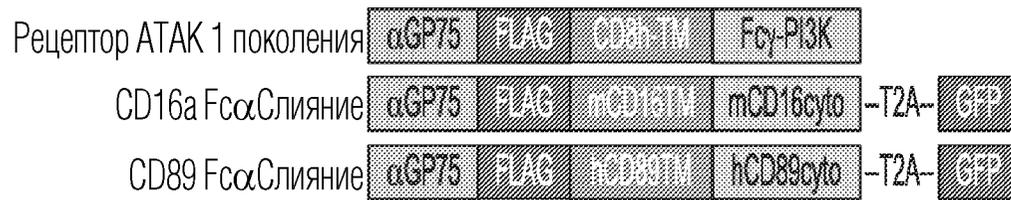
ФИГ. 14Е



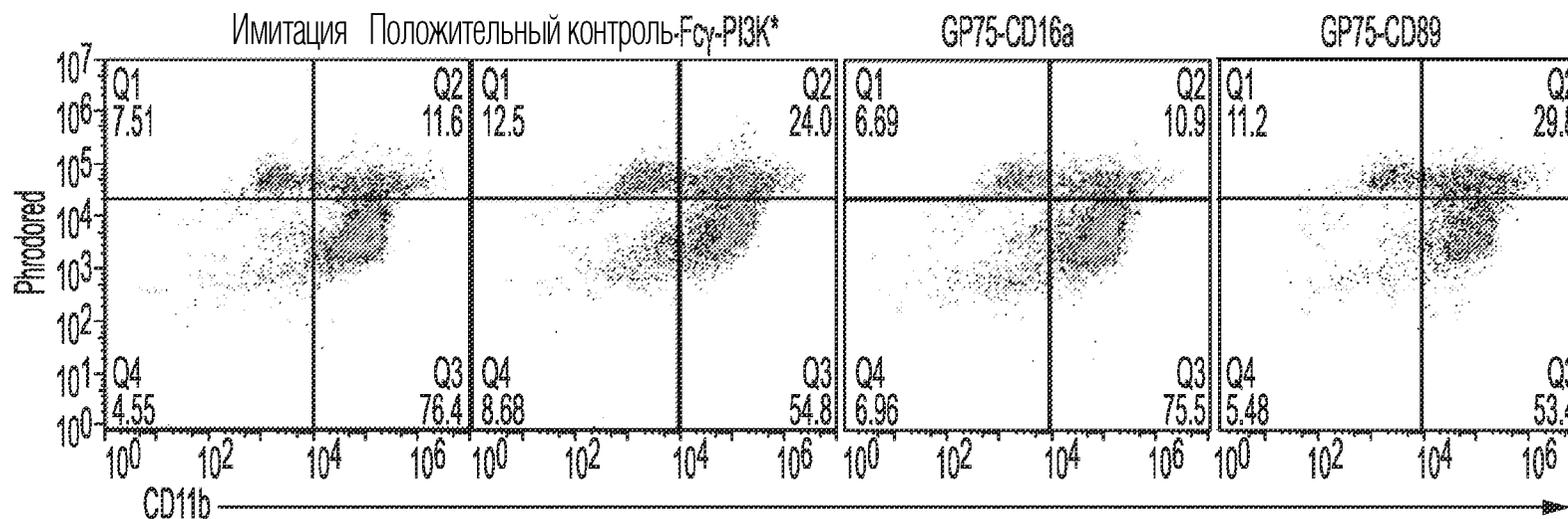
ФИГ. 14F



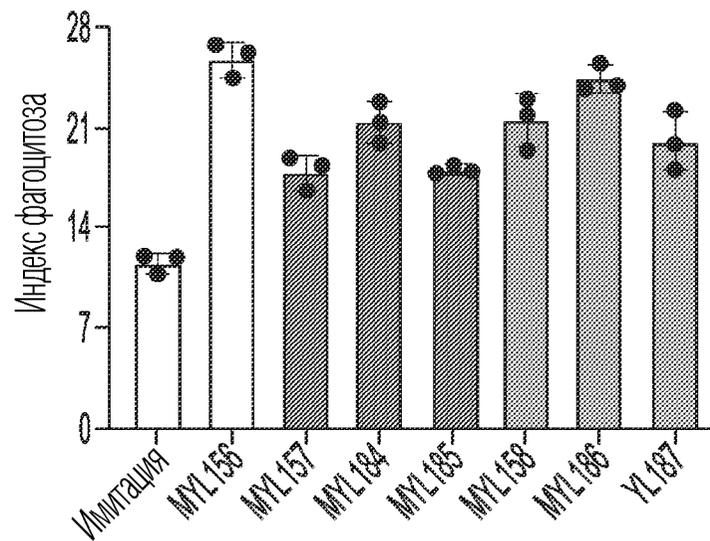
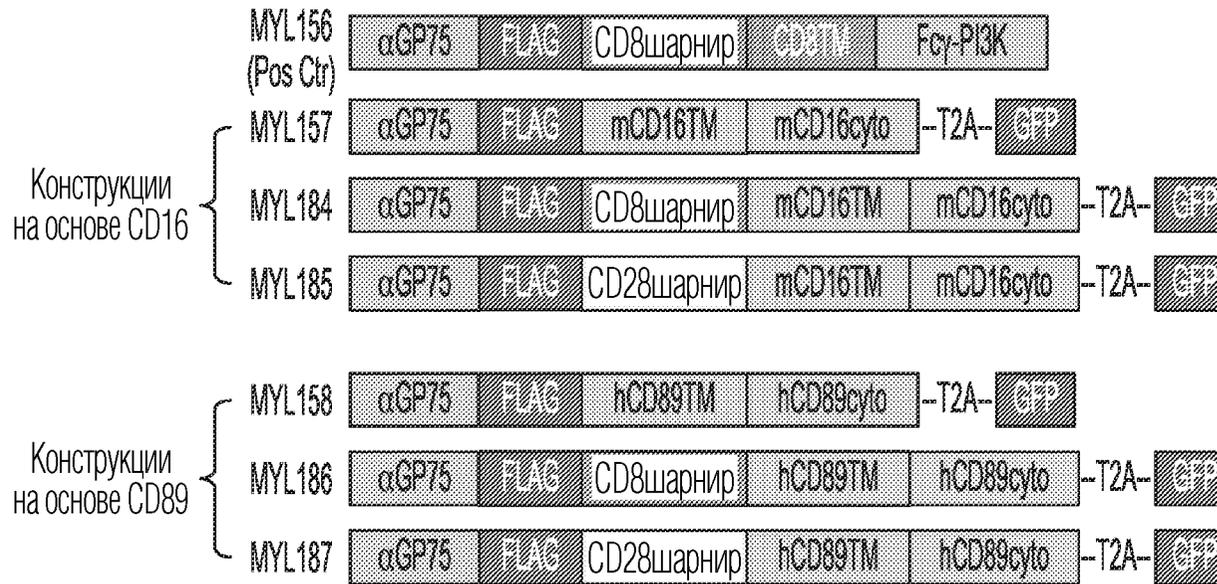
ФИГ. 15А



$$\text{Индекс фагоцитоза (\%)} = \frac{Q2}{(Q2+Q3)} \times 100$$



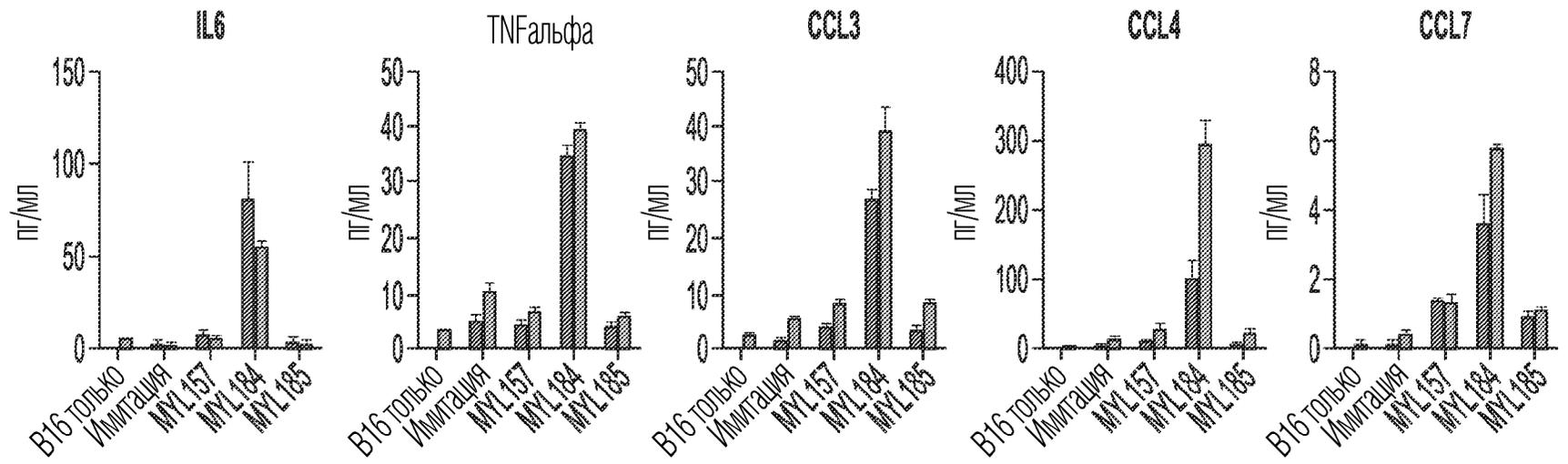
ФИГ. 15В



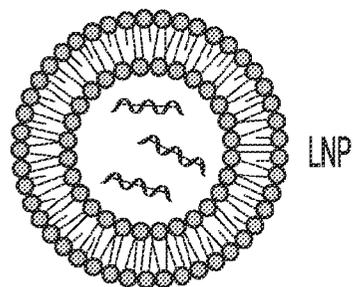
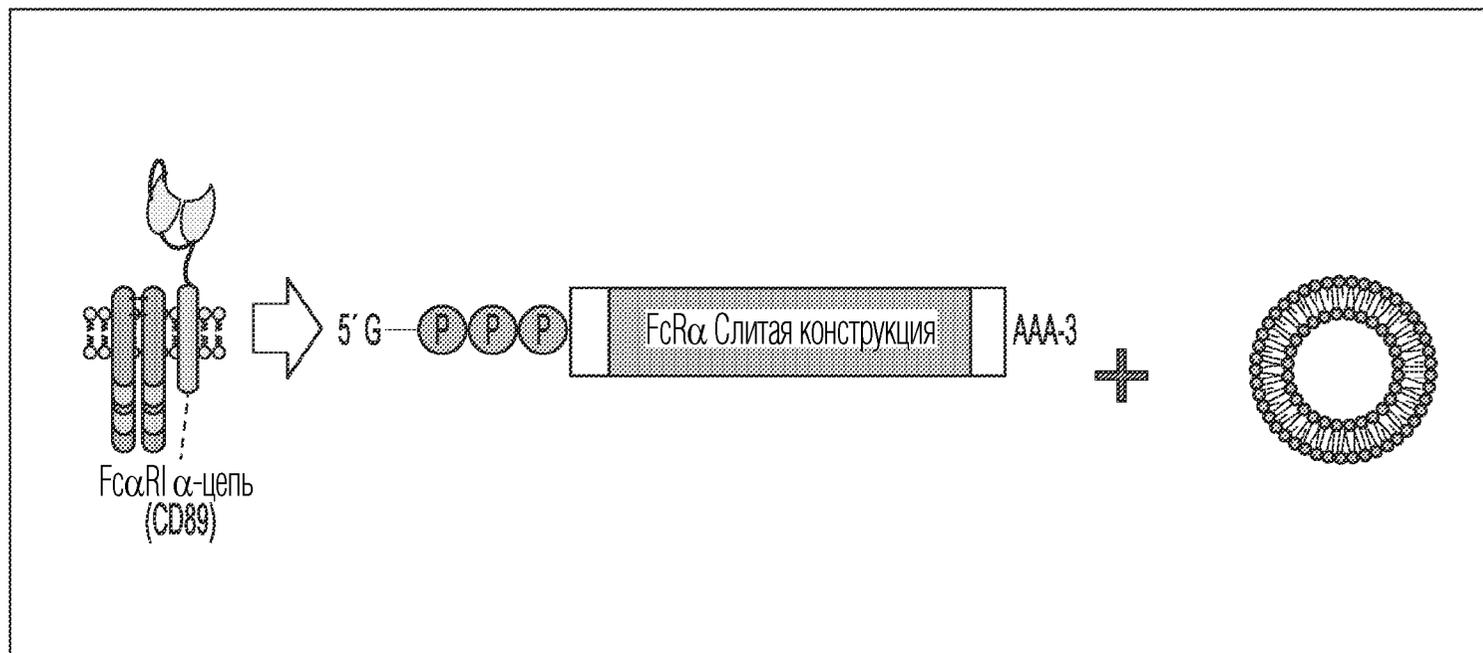
ФИГ. 15С



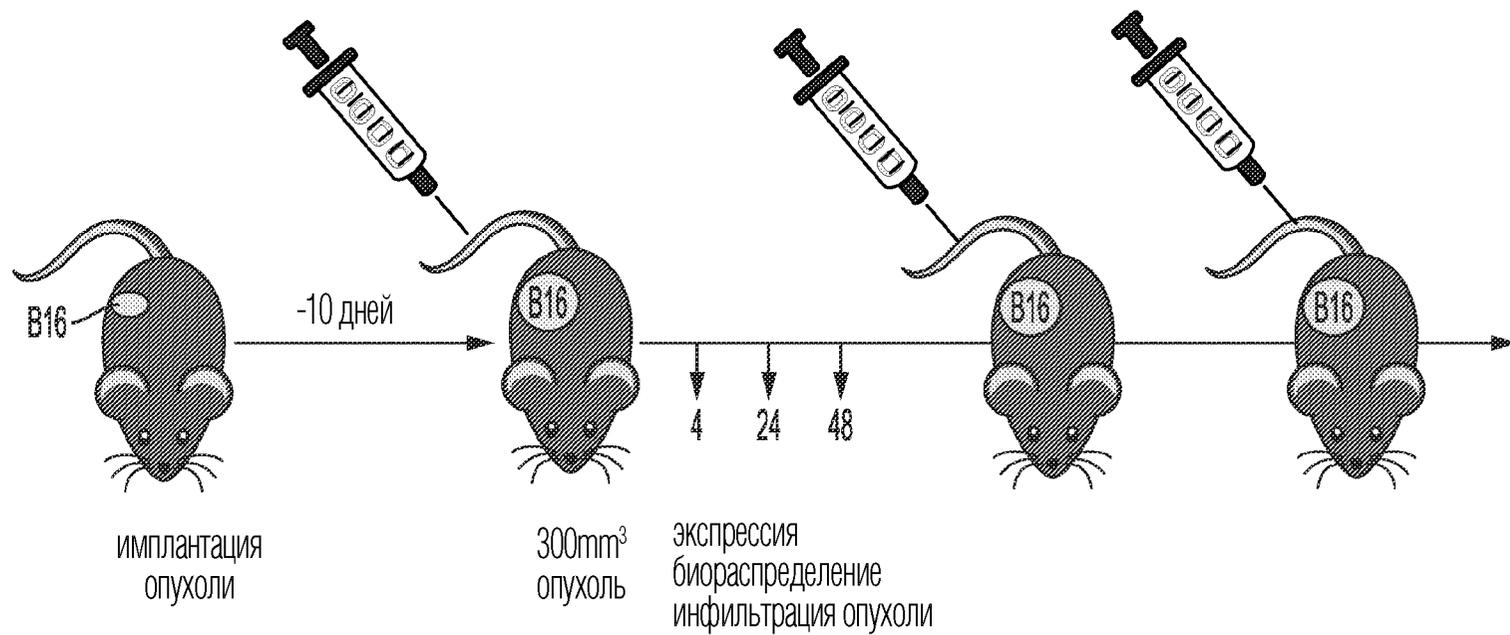
Только моноцит  
 Моноцит + опухолевая клетка-мишень



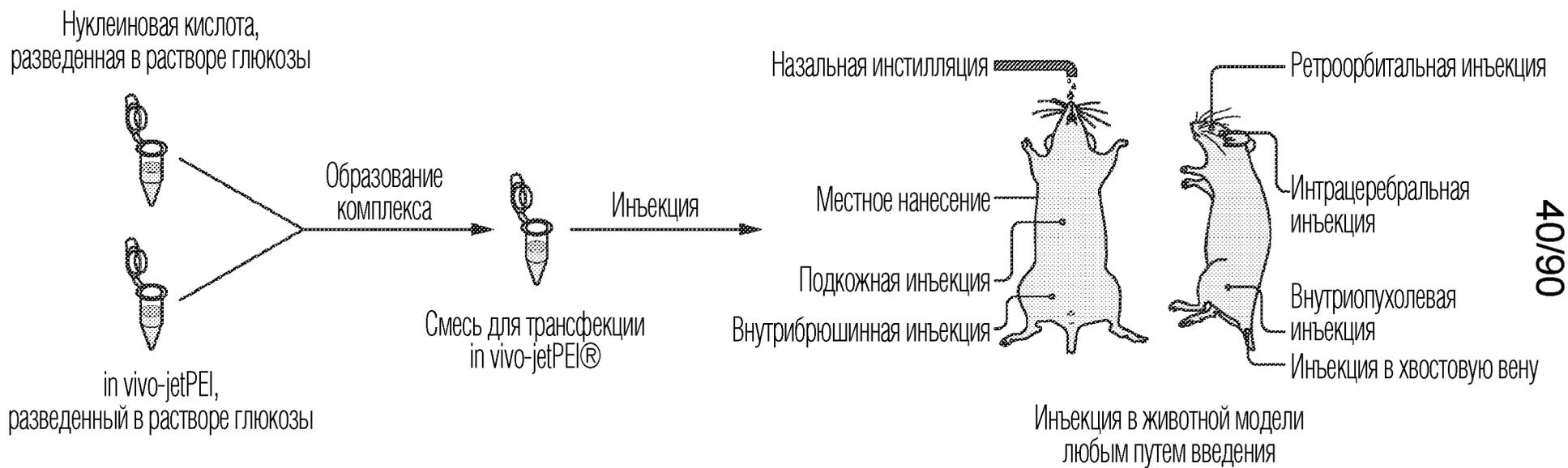
ФИГ. 15D



ФИГ. 16

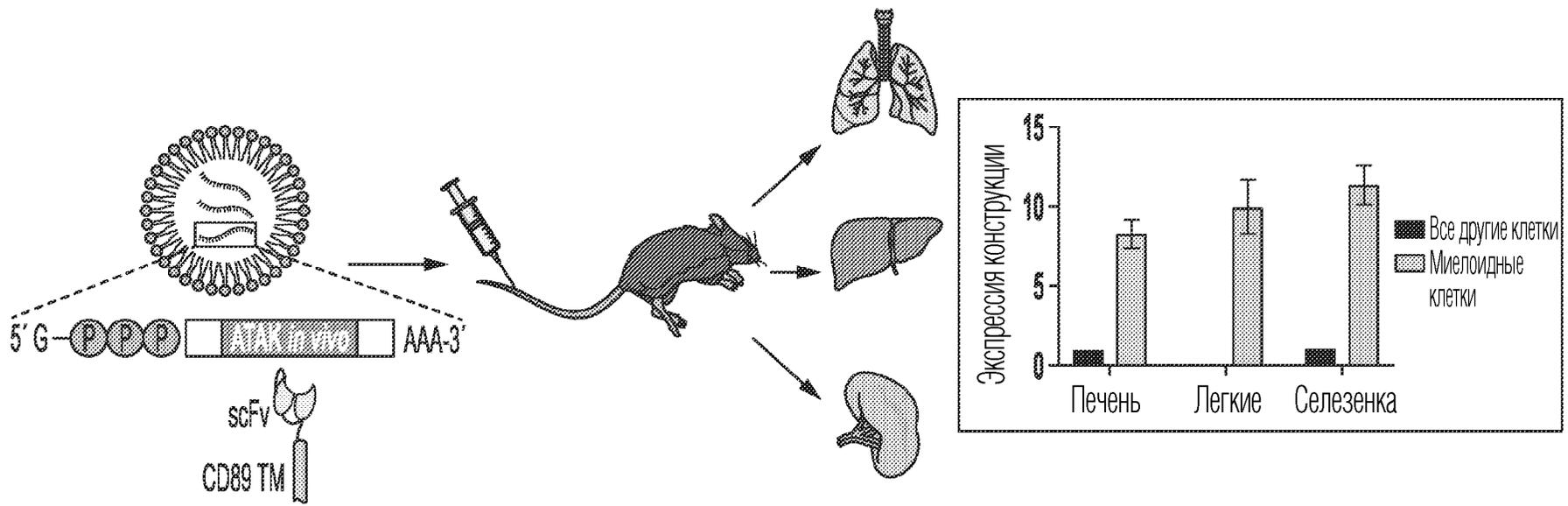


ФИГ. 17А



40/90

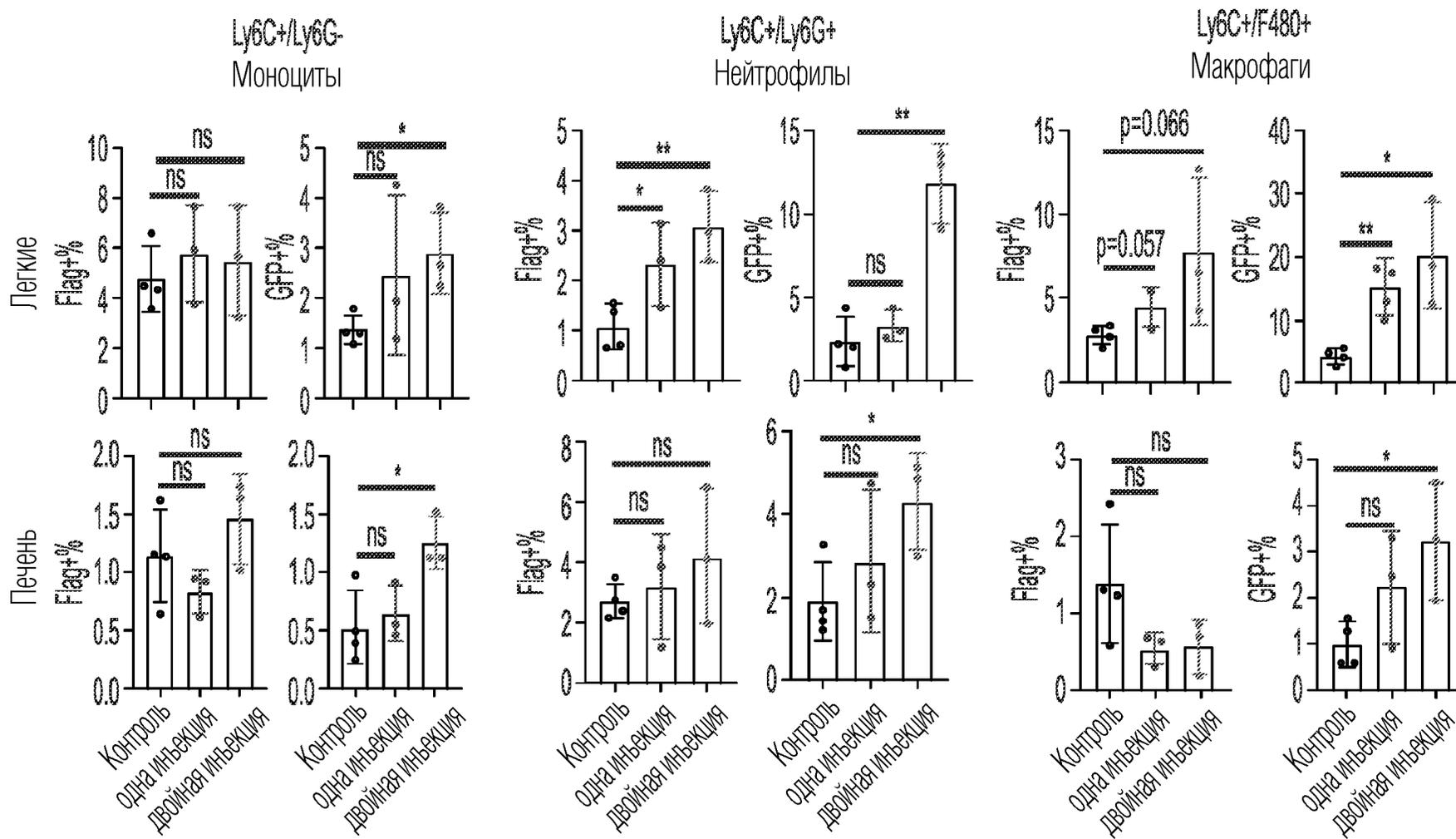
ФИГ. 17В



ФИГ. 18А



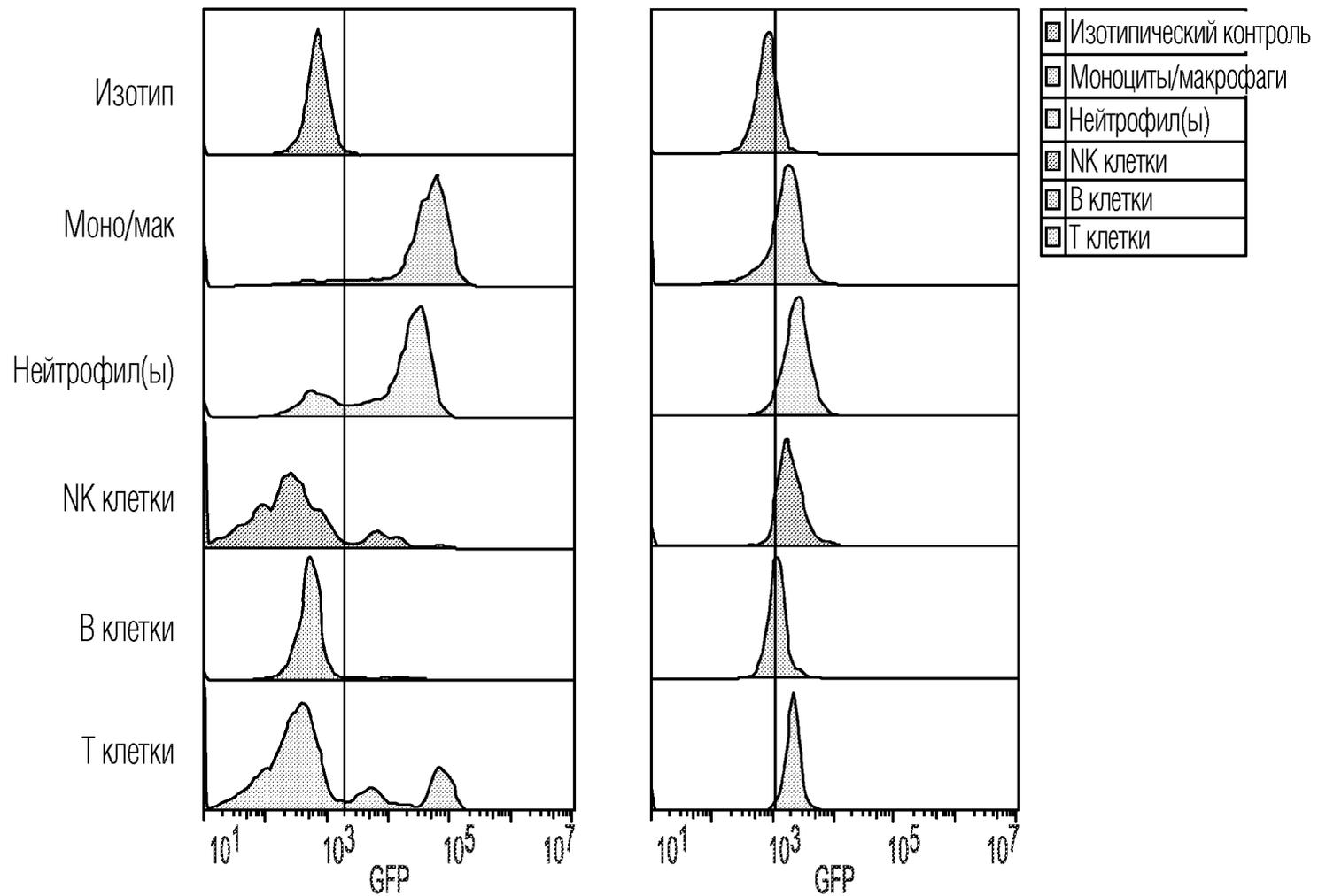
*hCD89 = CD89 человека*



ФИГ. 18В



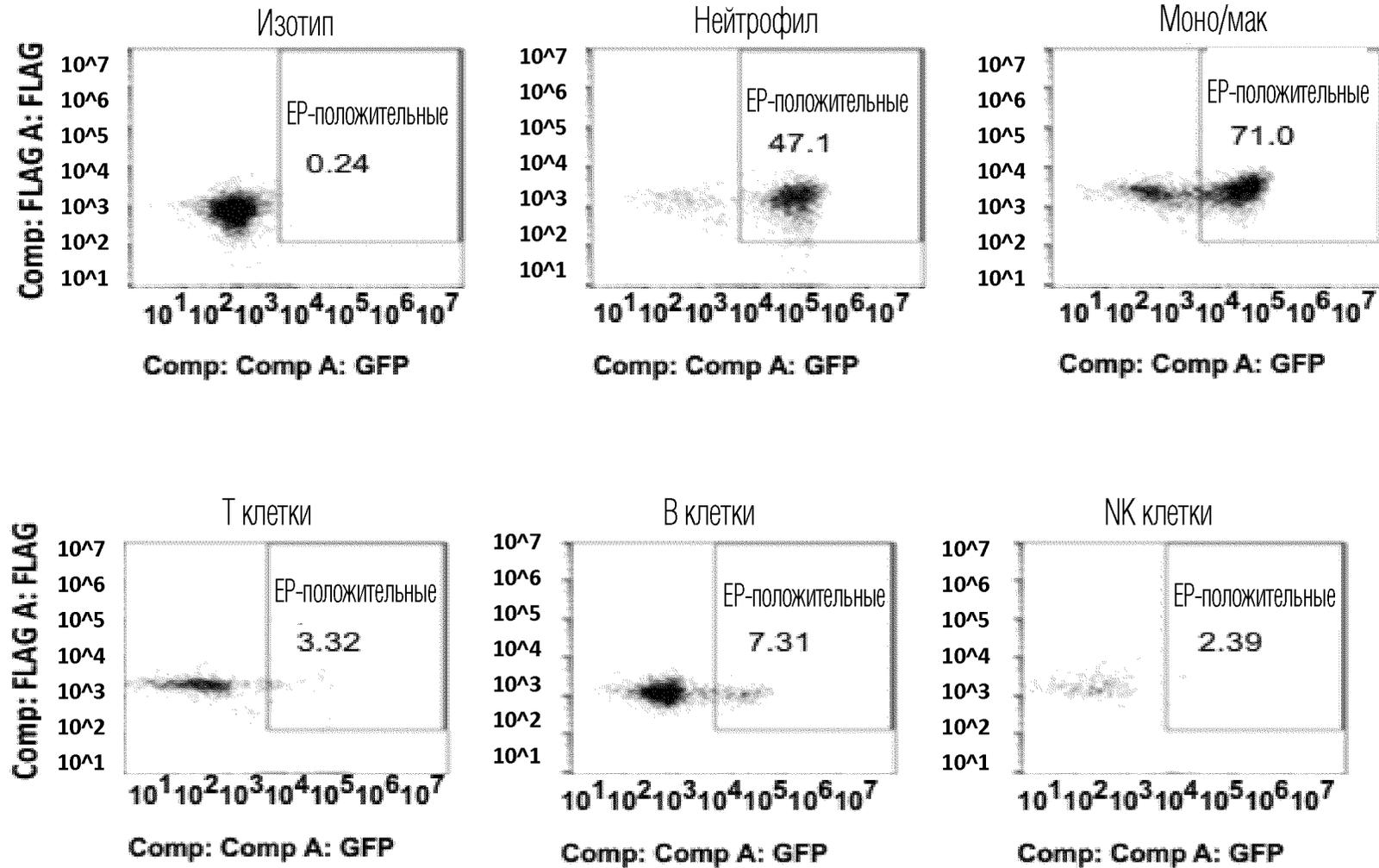
*hCD89 = CD89 человека*



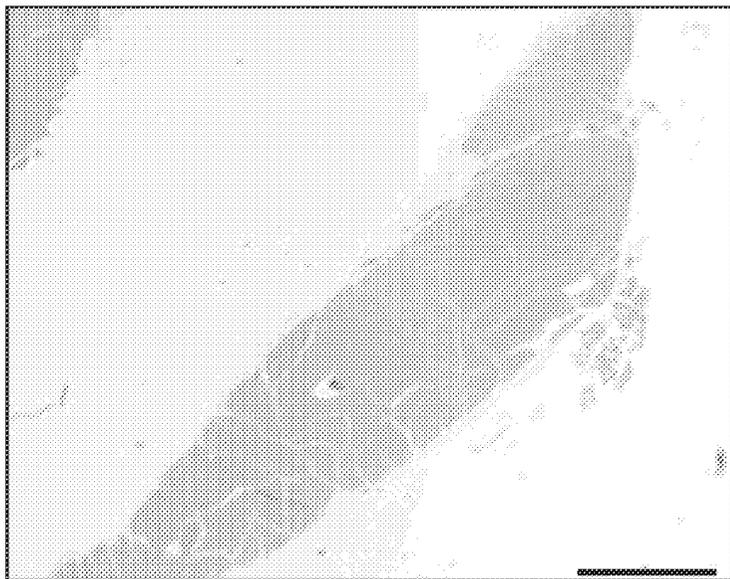
ФИГ. 18С



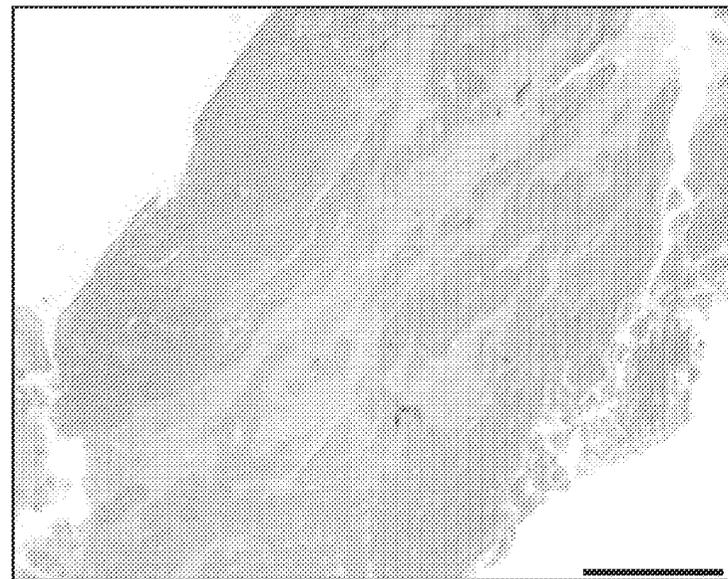
*hCD89 = CD89 человека*



ФИГ. 18D

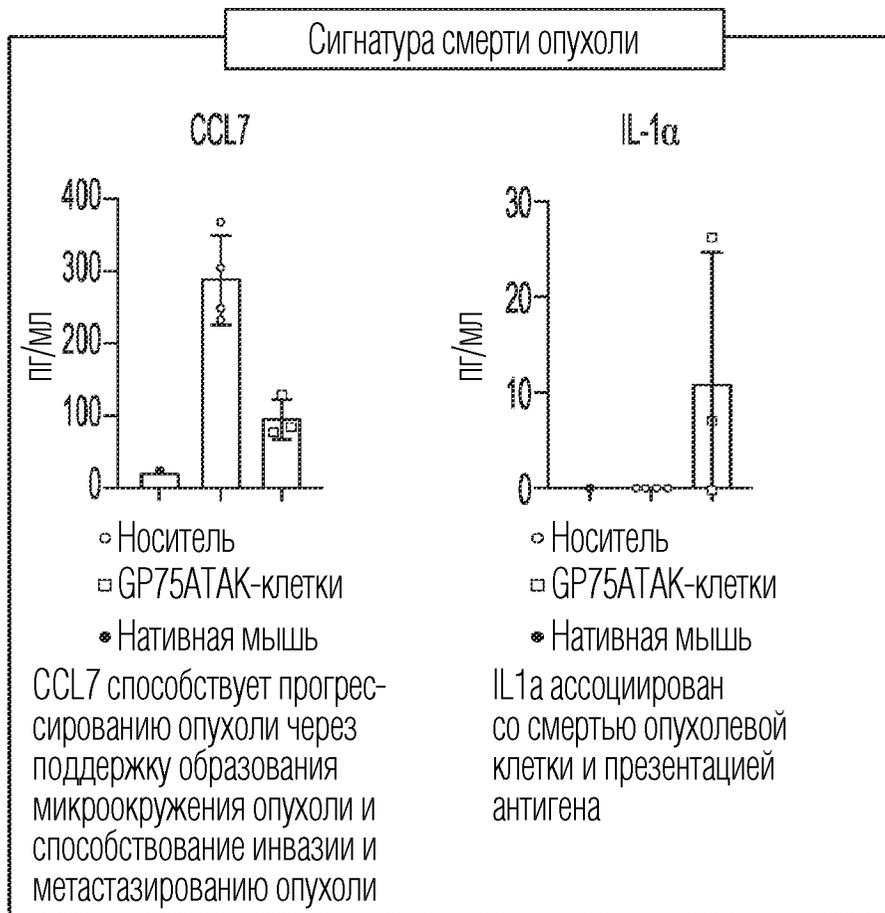


2/4 обработанные имеют полный ответ согласно гистологии.  
Опухоль не определена

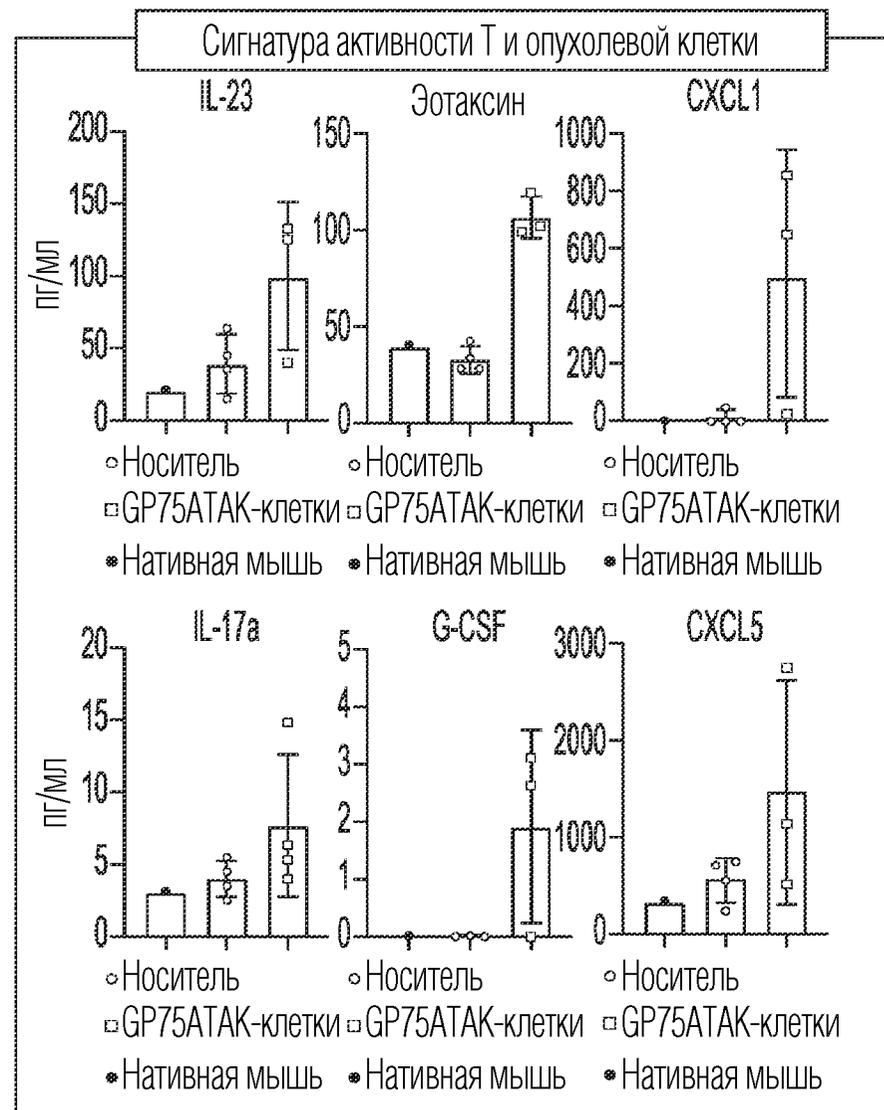


Не леченная группа демонстрирует большие опухоли с  
незначительной или отсутствующей инфильтрацией клеток.  
Присутствует некротическая сердцевина

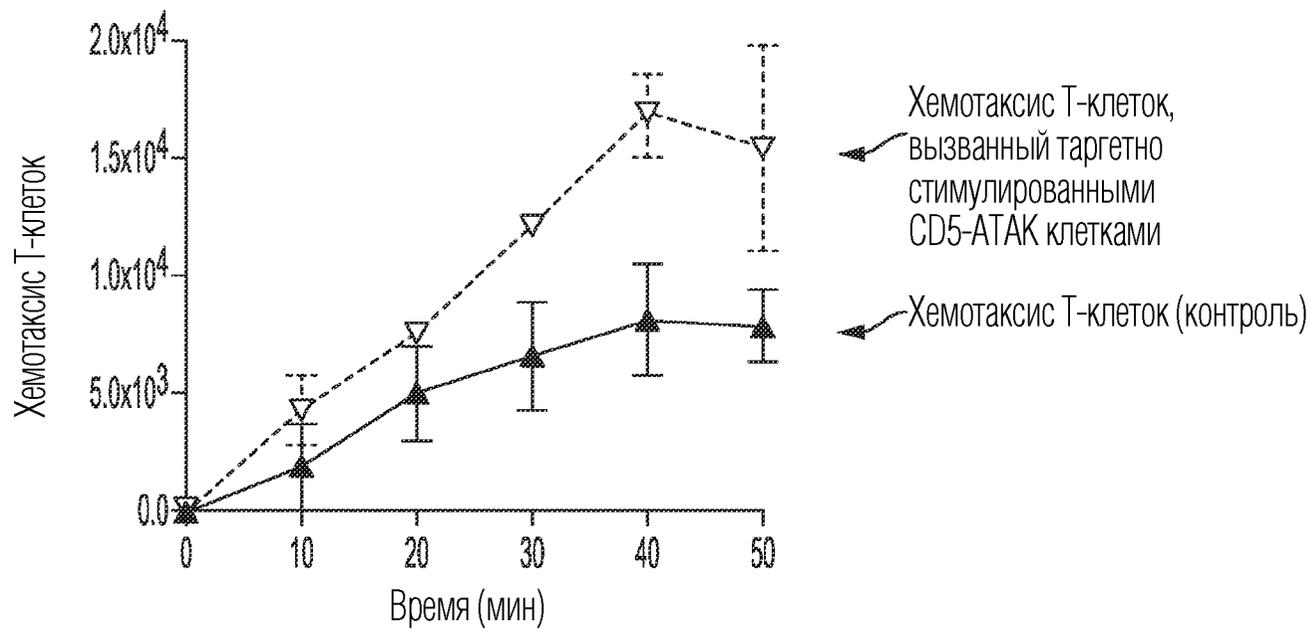
ФИГ. 19



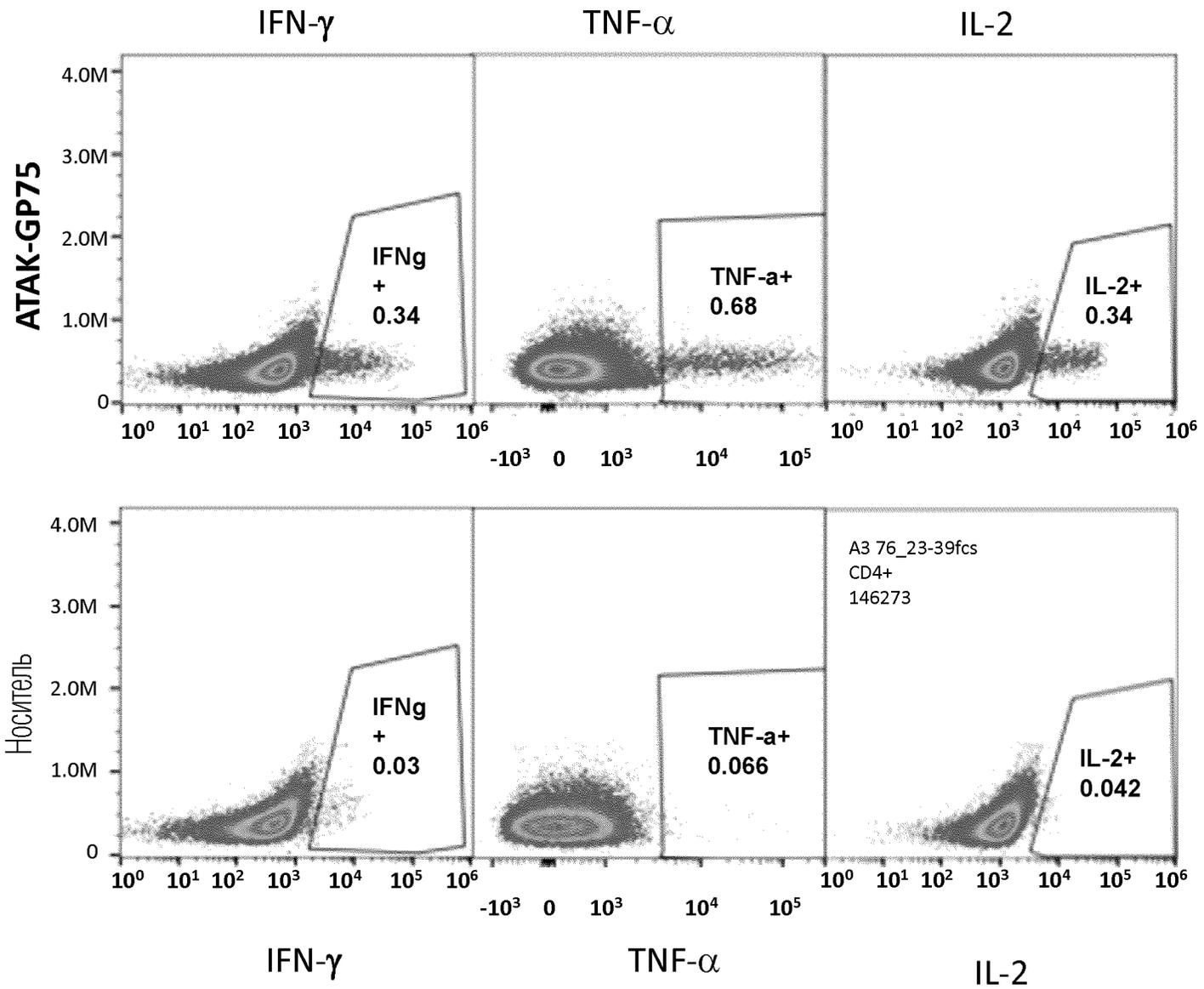
**ФИГ. 20А**



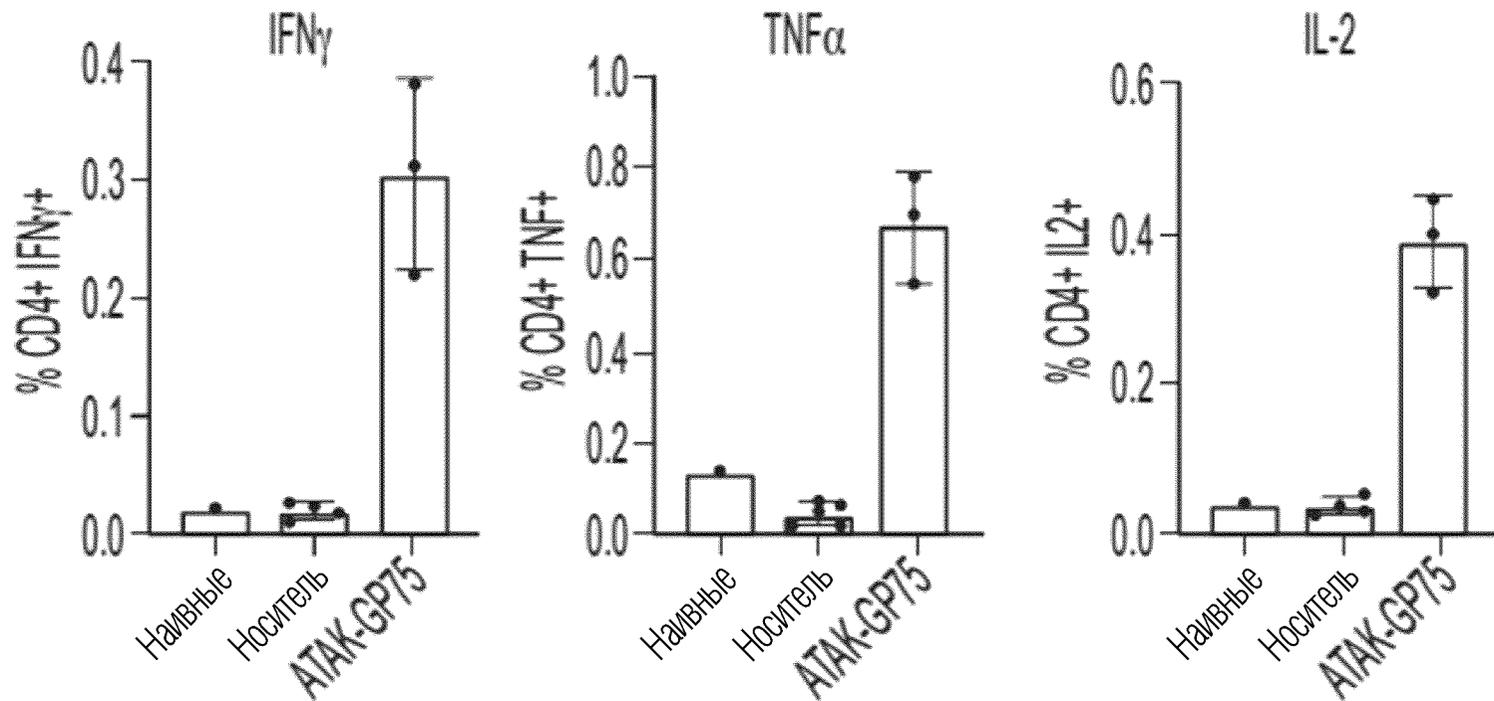
**ФИГ. 20В**



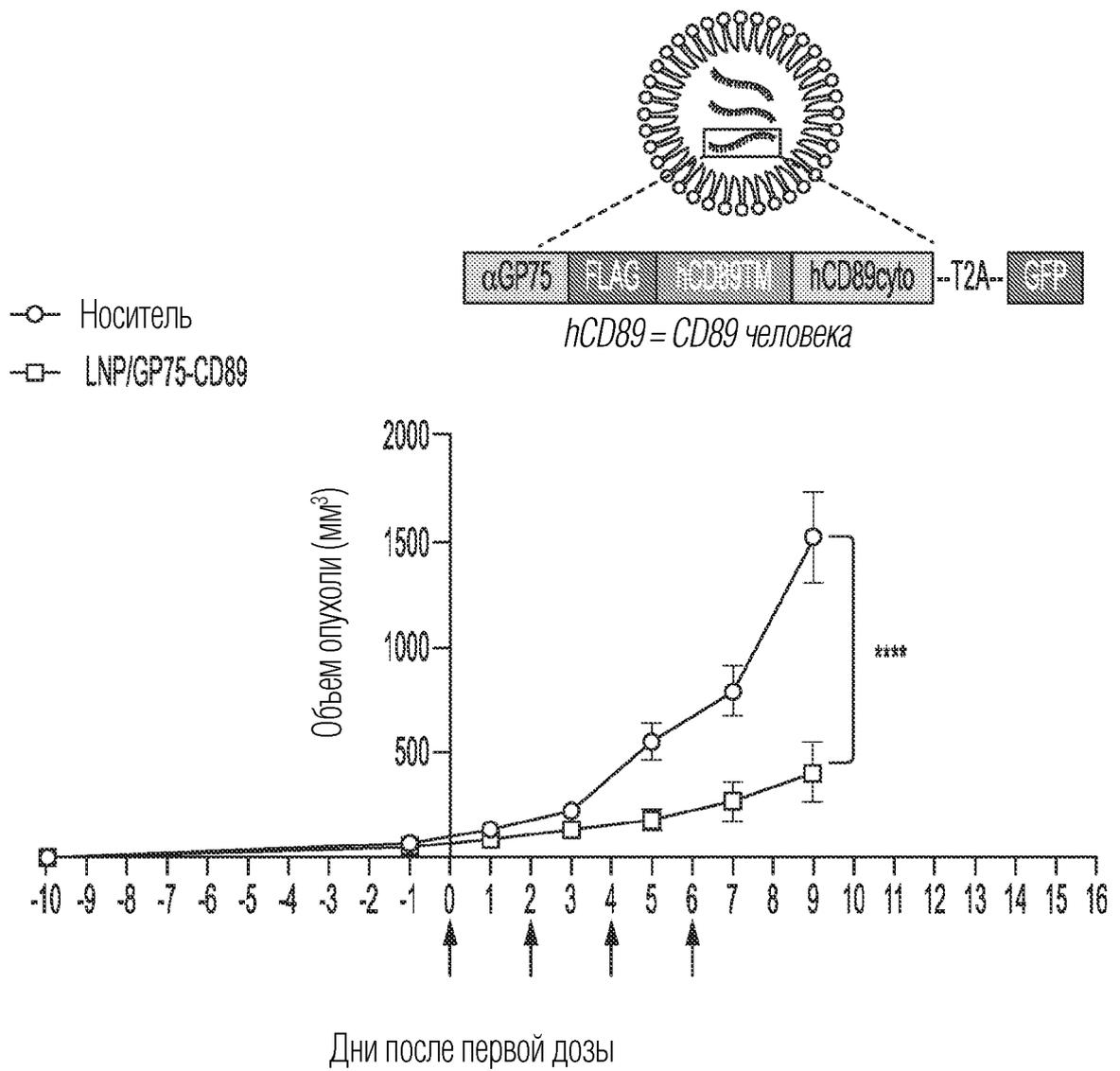
ФИГ. 20С



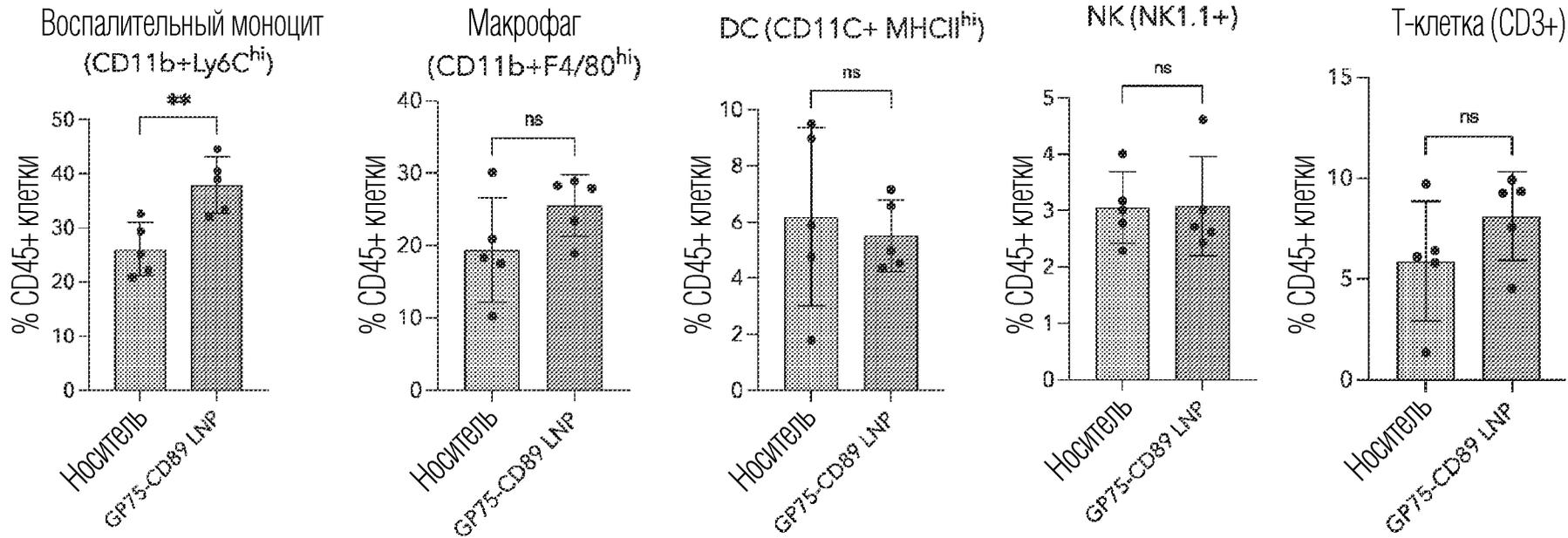
ФИГ. 21



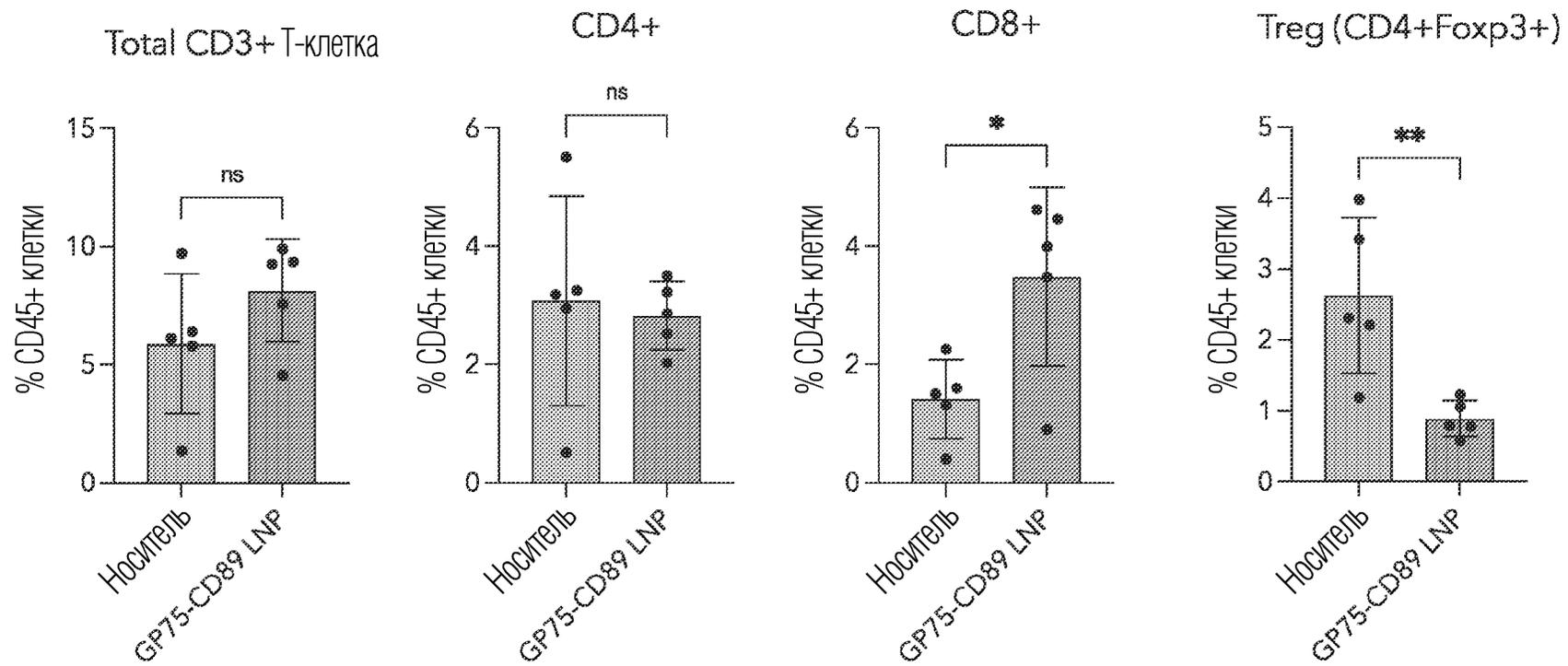
ФИГ. 21 (продолжение)



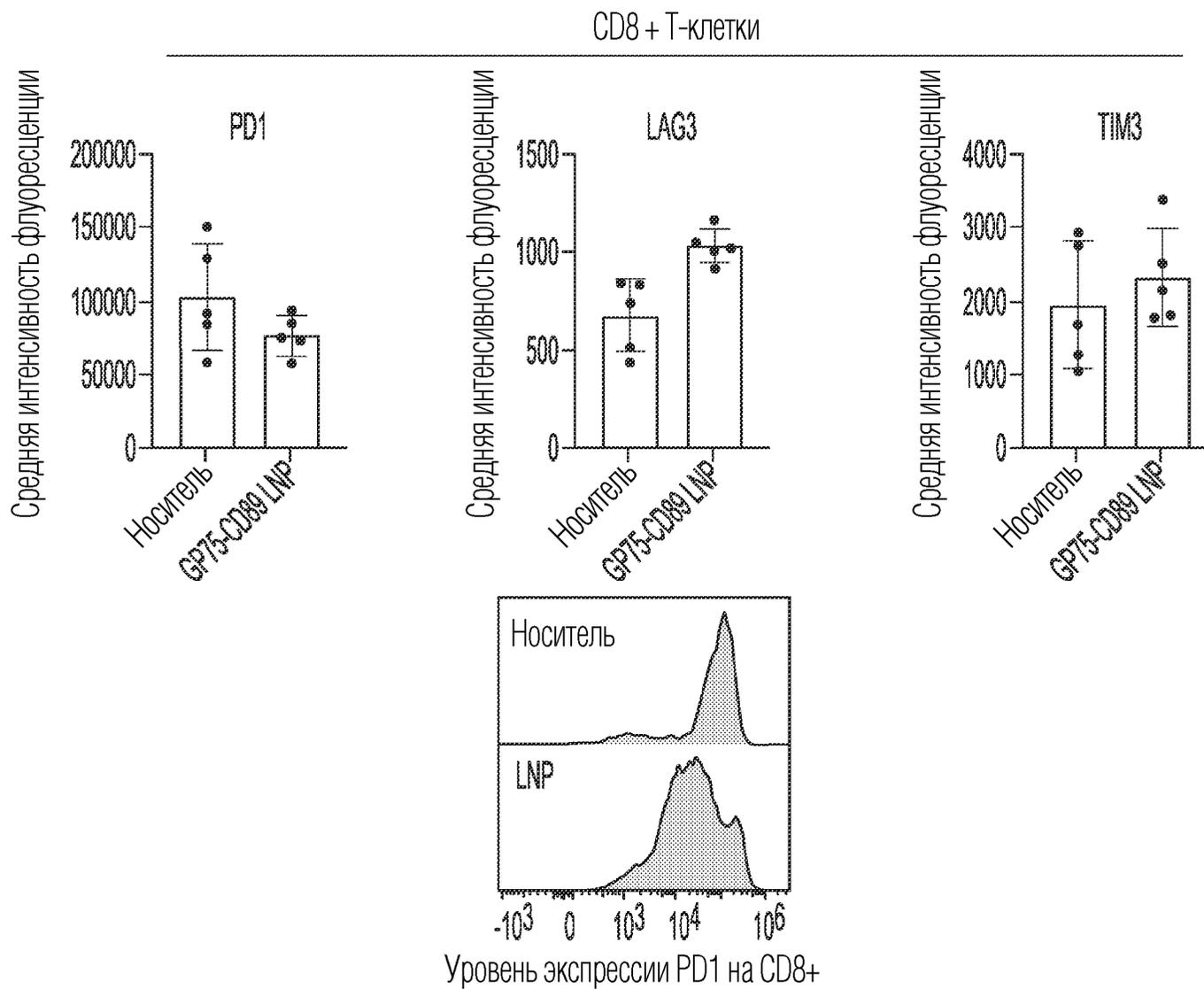
ФИГ. 22



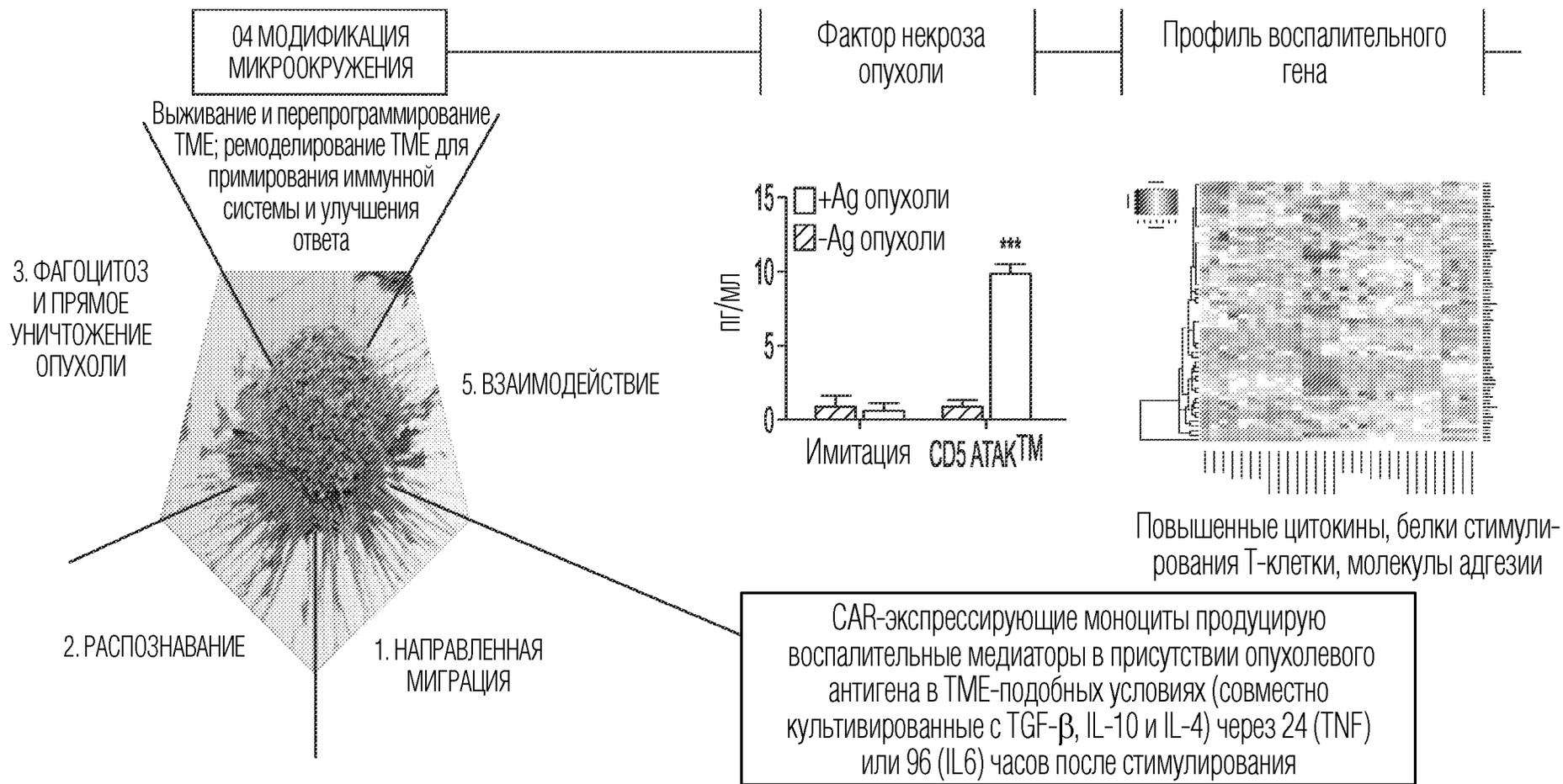
ФИГ. 23



ФИГ. 24



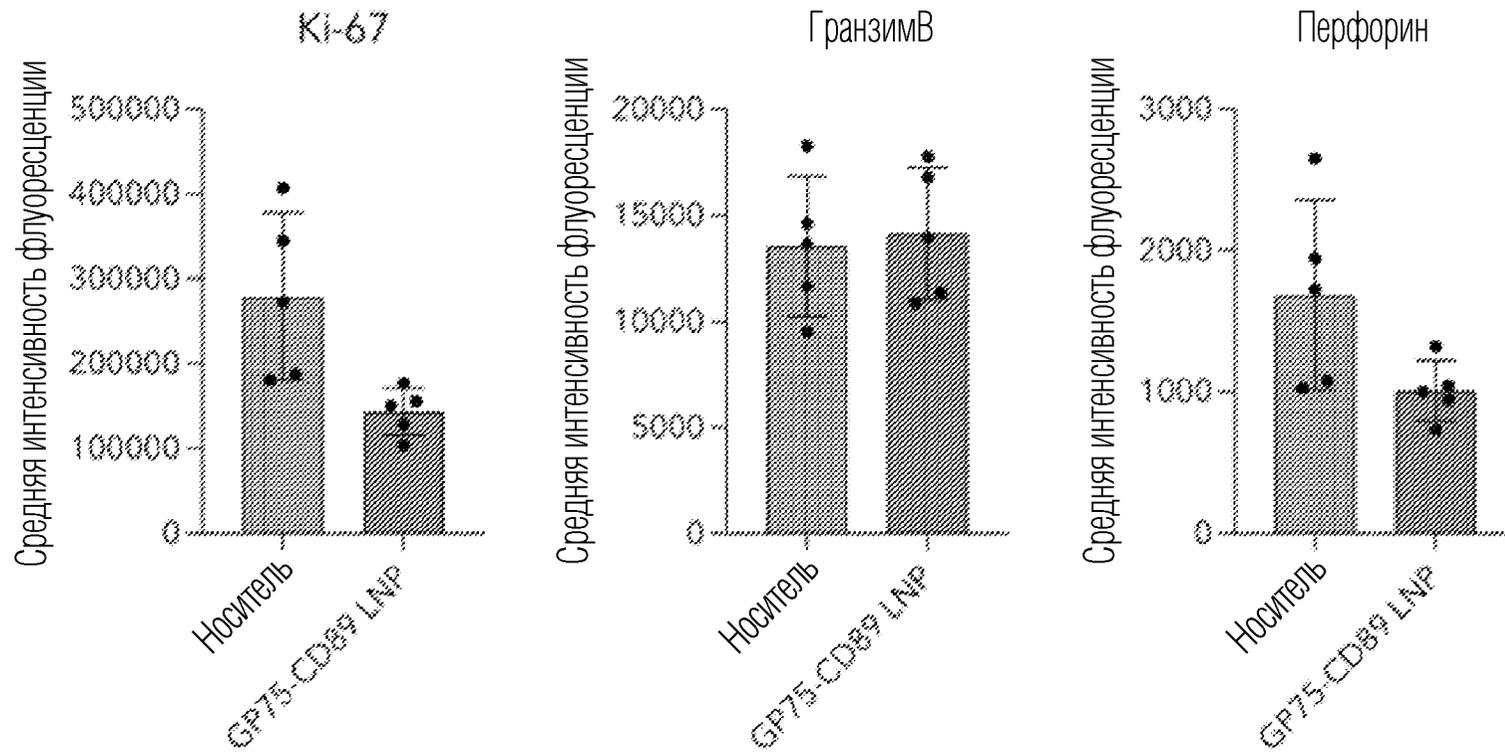
ФИГ. 25



54/90

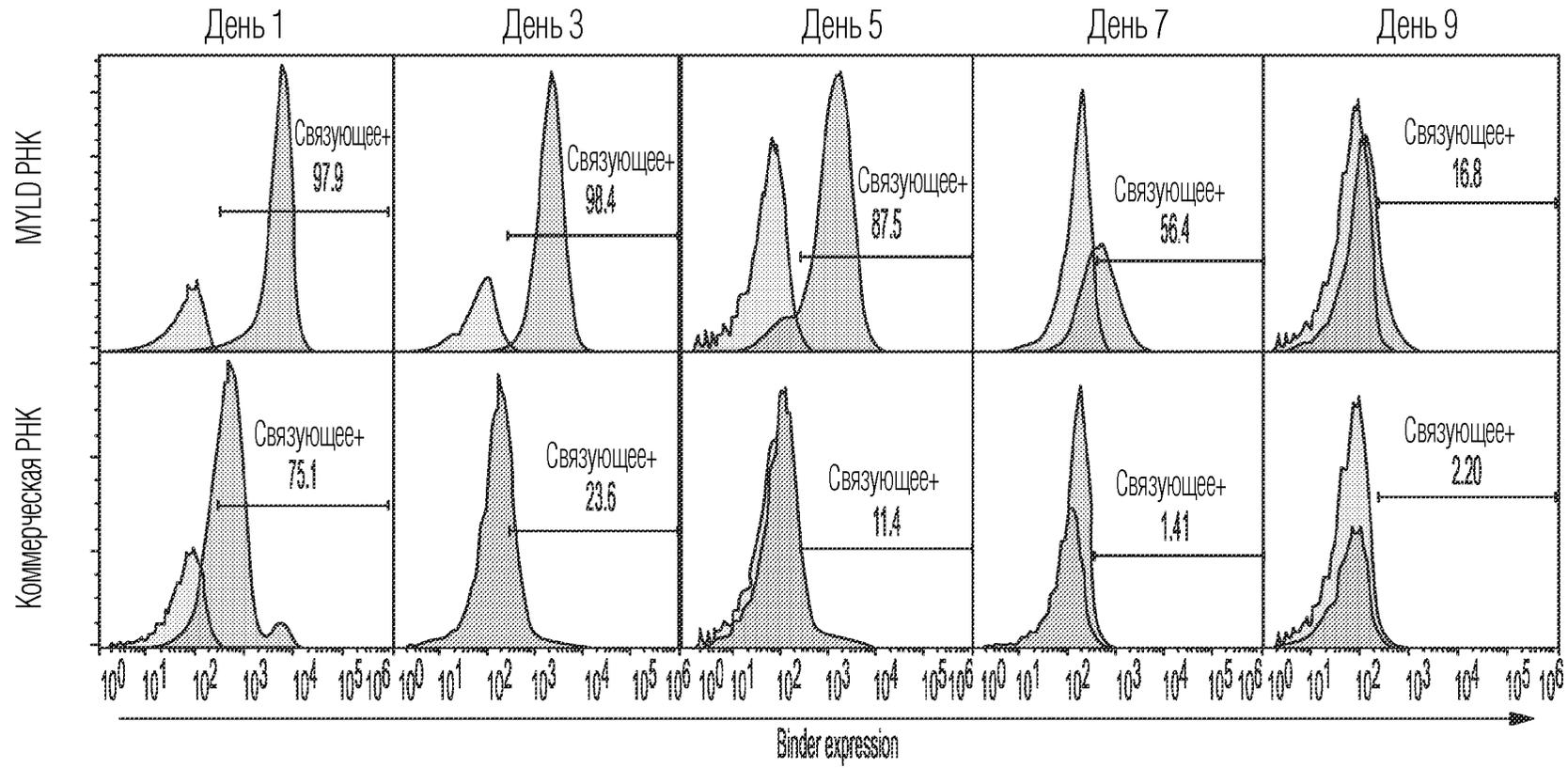
ФИГ. 26

CD8 + Т-клетки

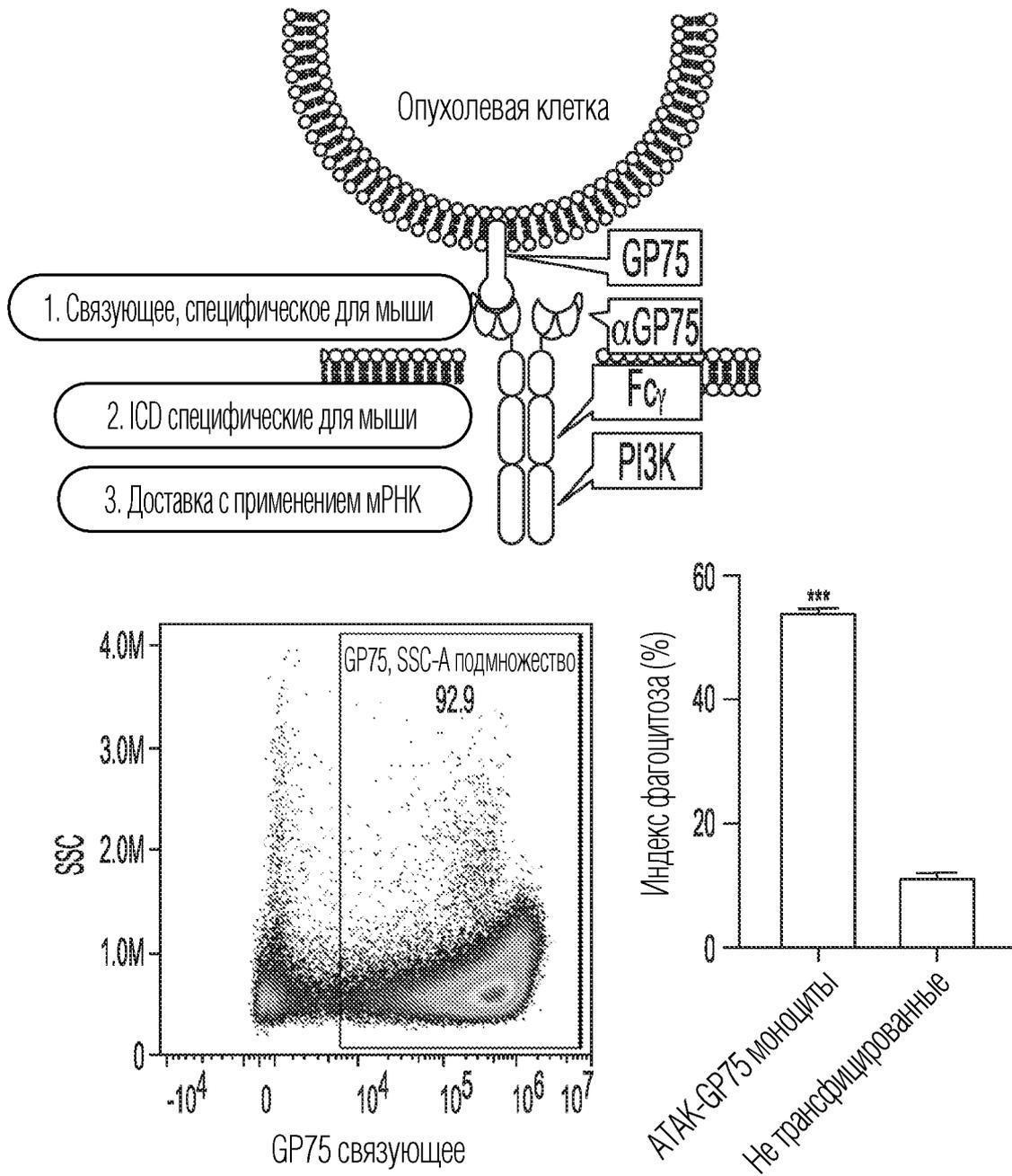


ФИГ. 27

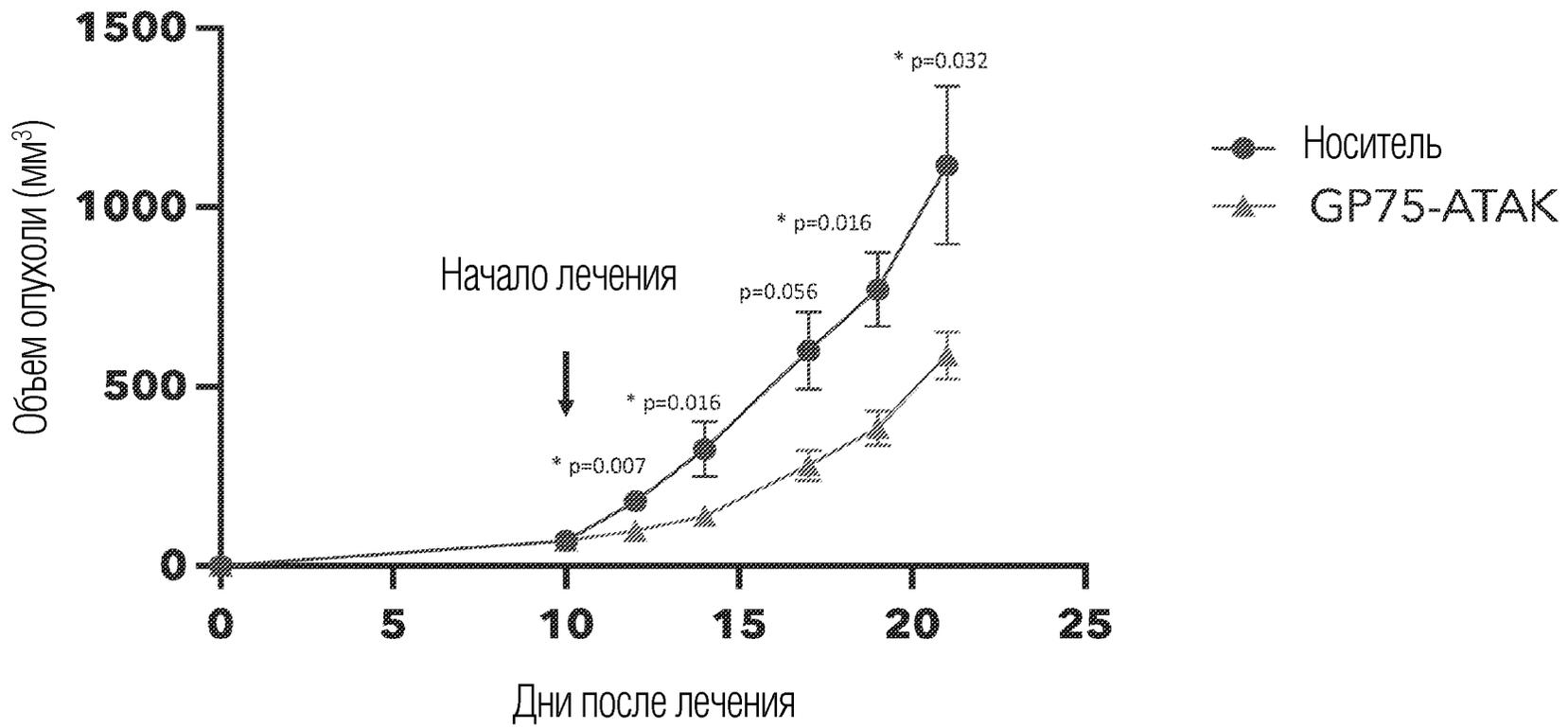
Анализ эффективности ТНР-1 мРНК



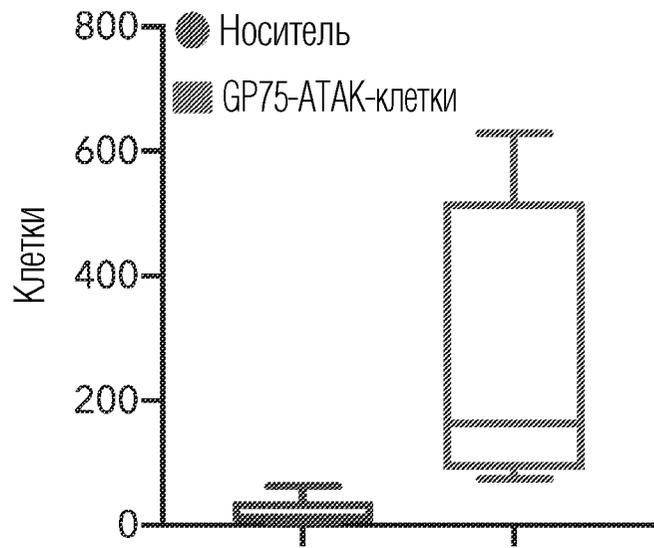
ФИГ. 28



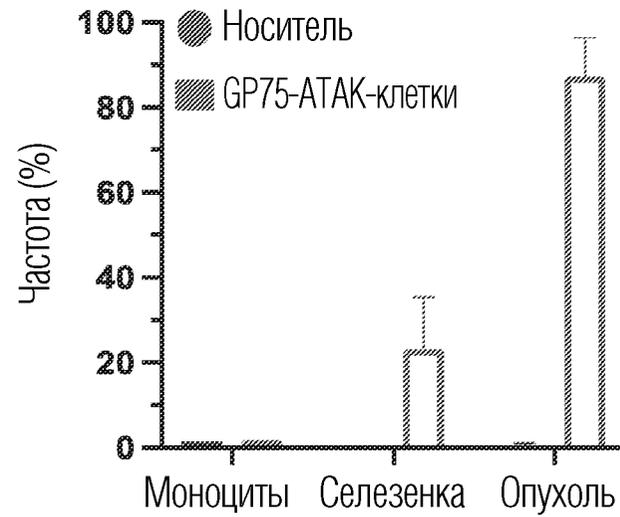
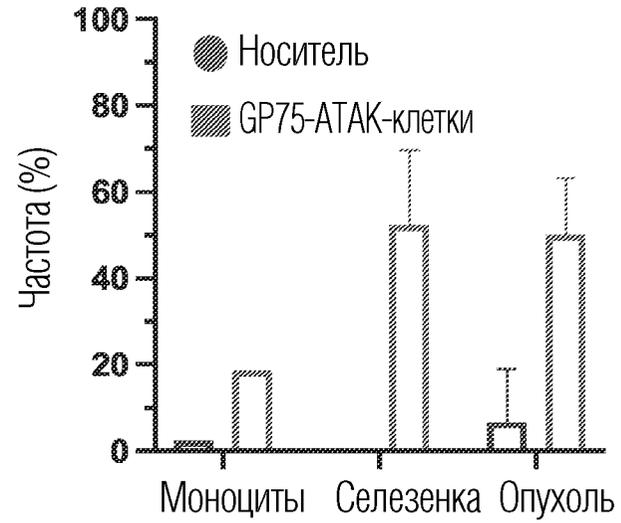
ФИГ. 29

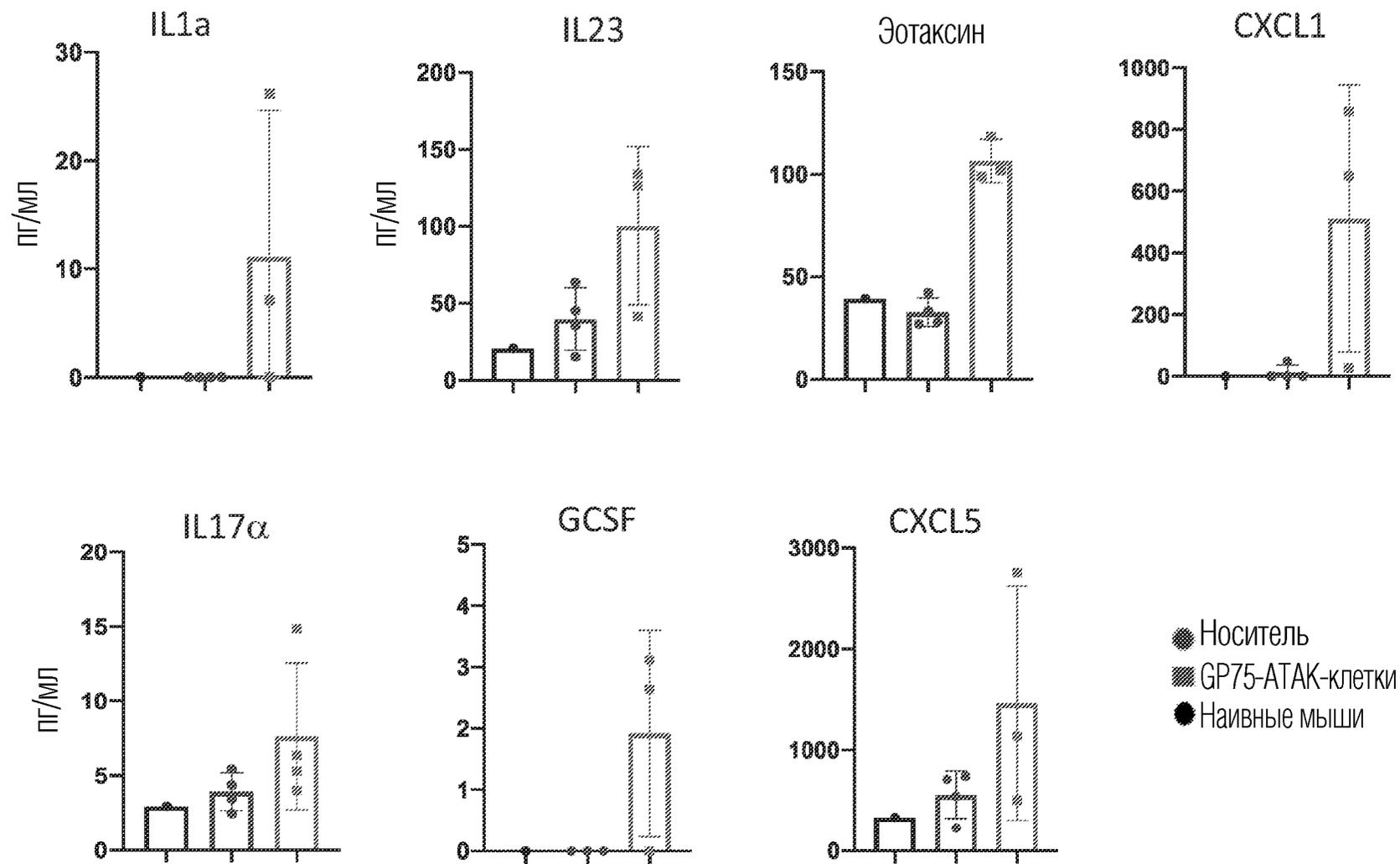


ФИГ. 30

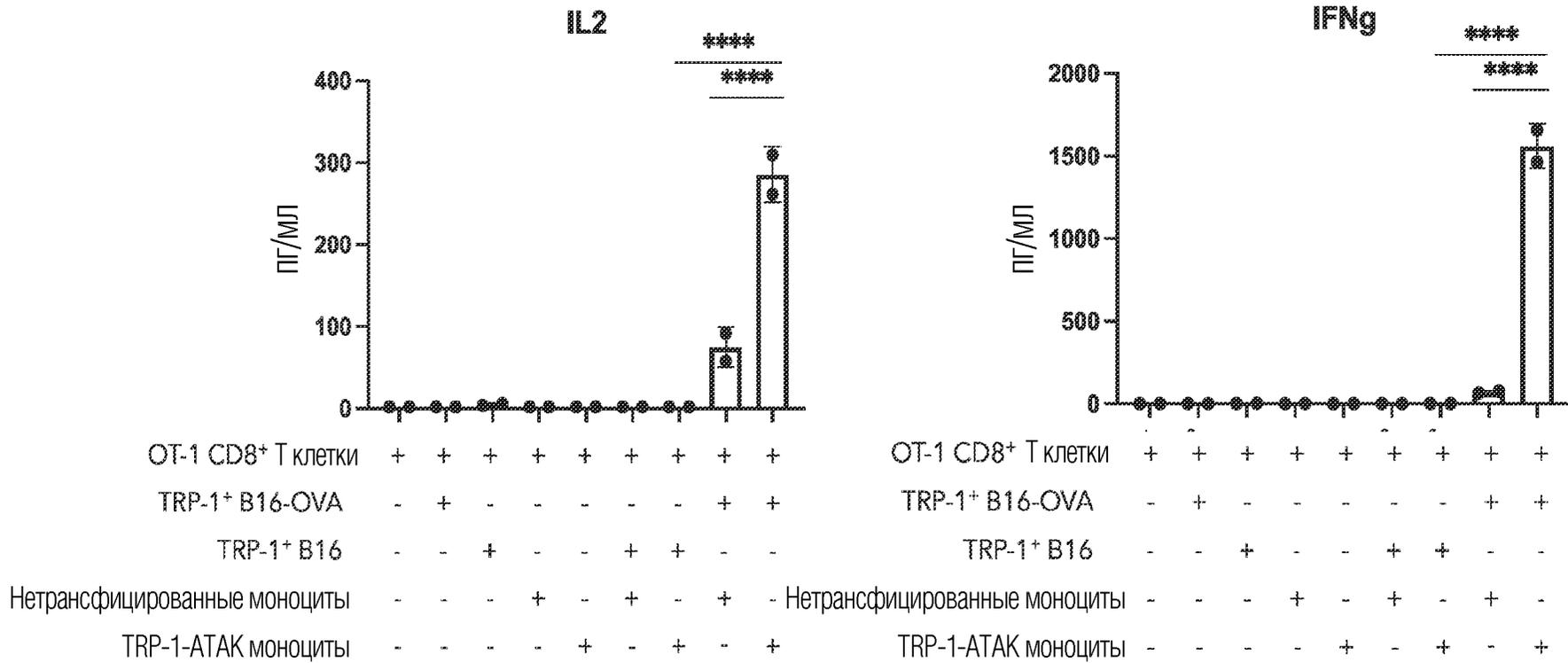


ФИГ. 31



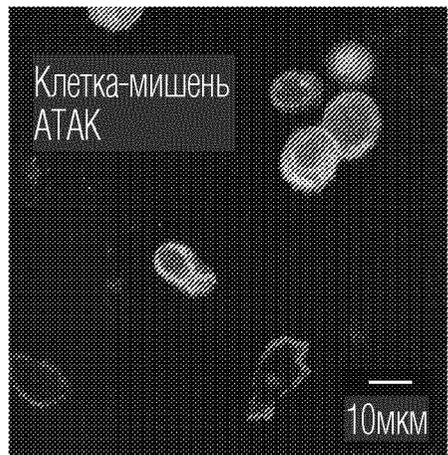


ФИГ. 32

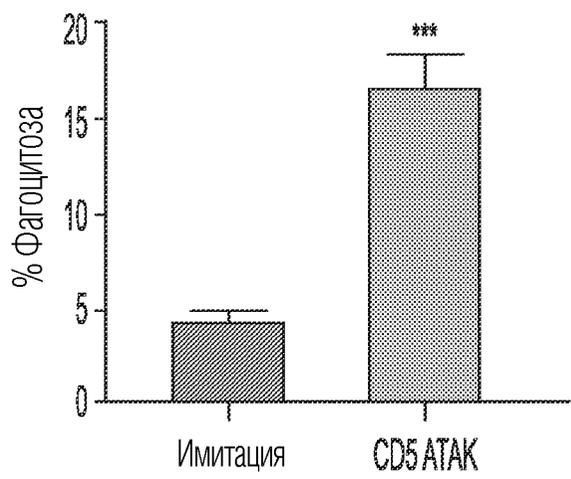


ФИГ. 33

✓ Распознавание опухоли

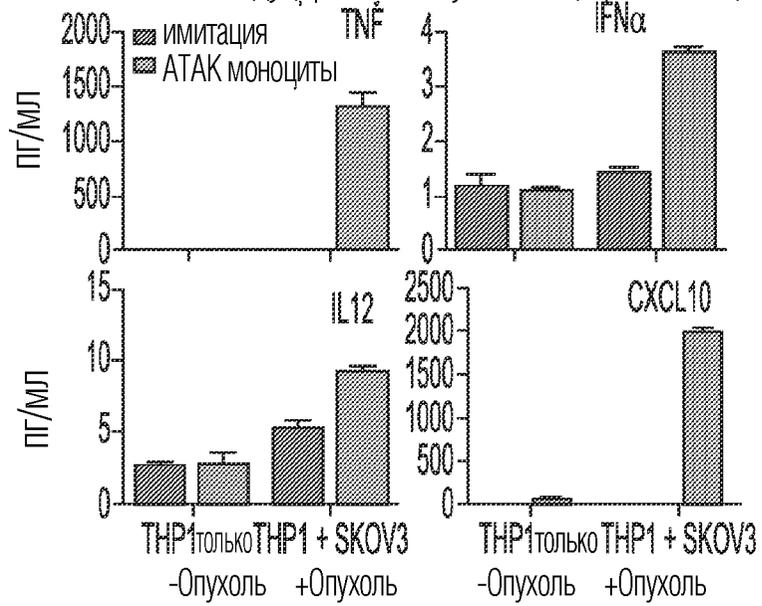


✓ Уничтожение опухоли

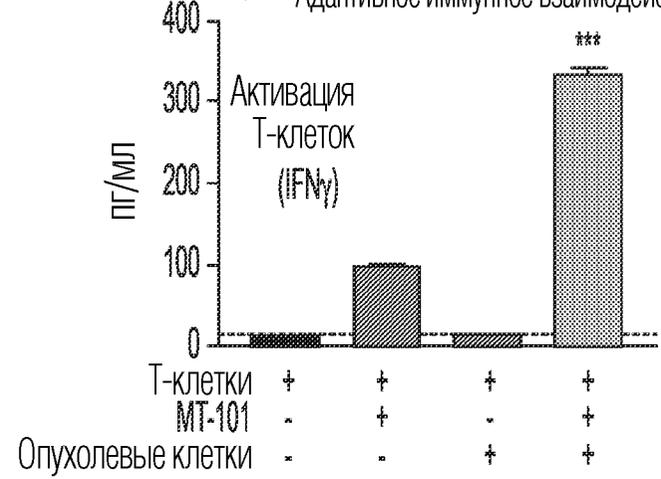


✓ Нагревание TME

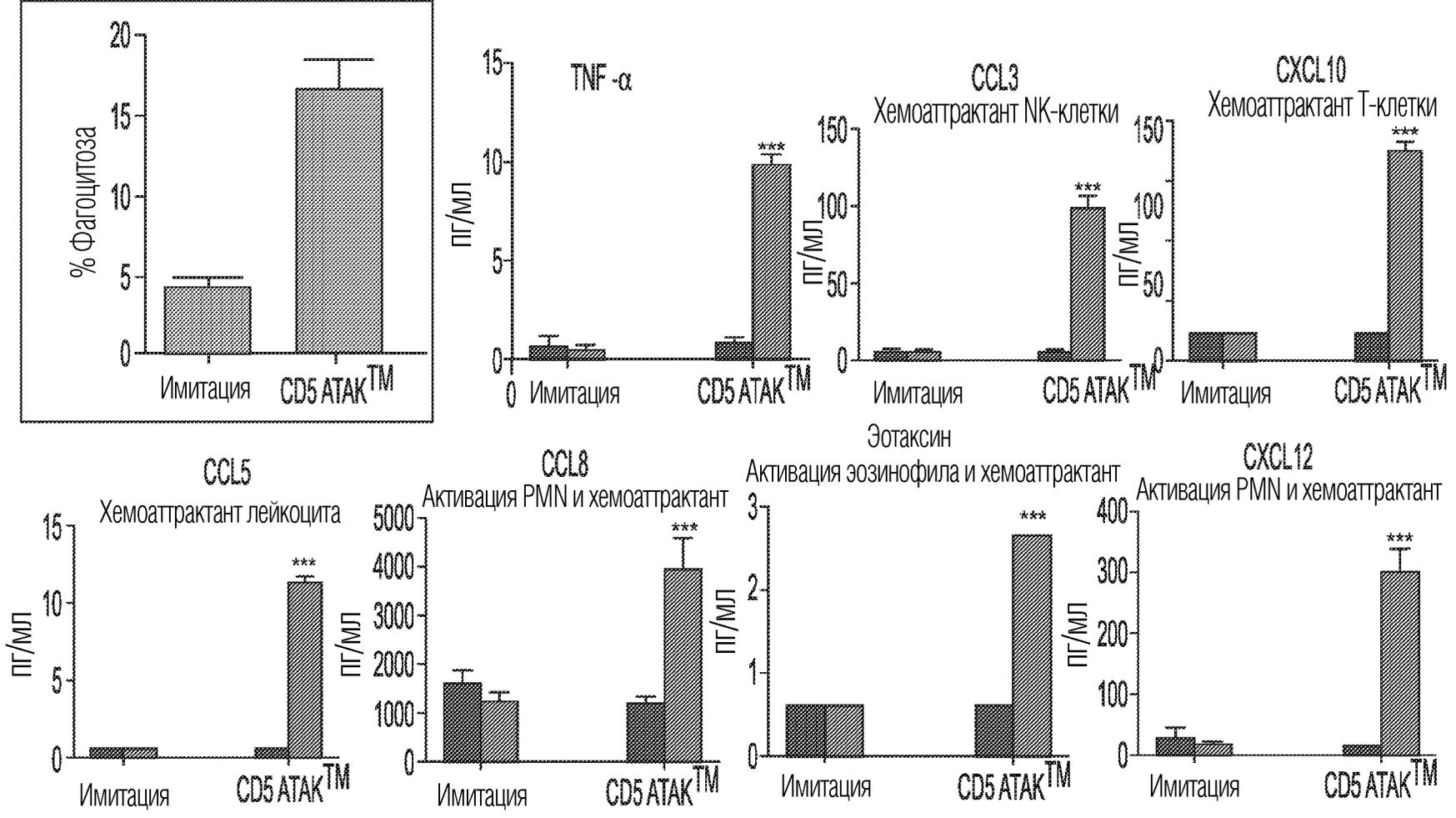
Индукция опухолеспецифических цитокинов



✓ Адаптивное иммунное взаимодействие

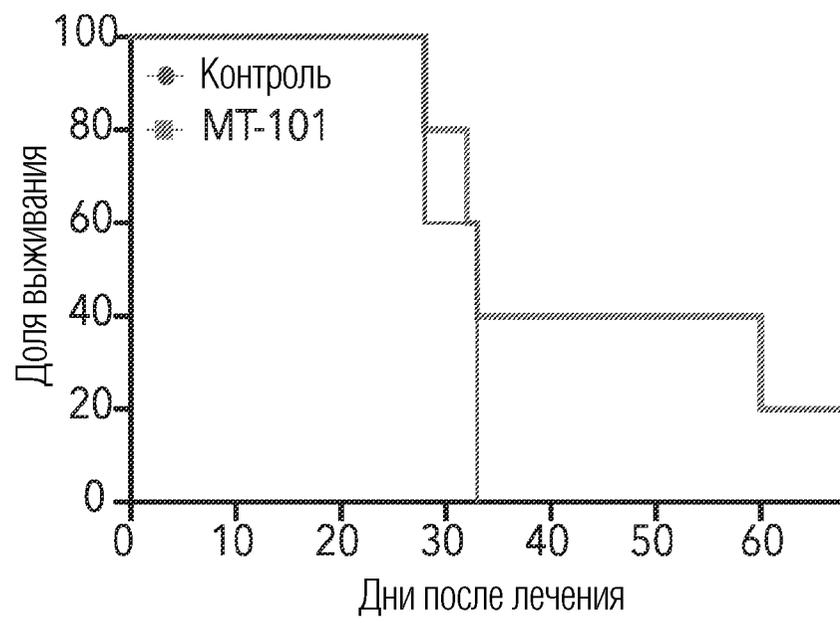


ФИГ. 34

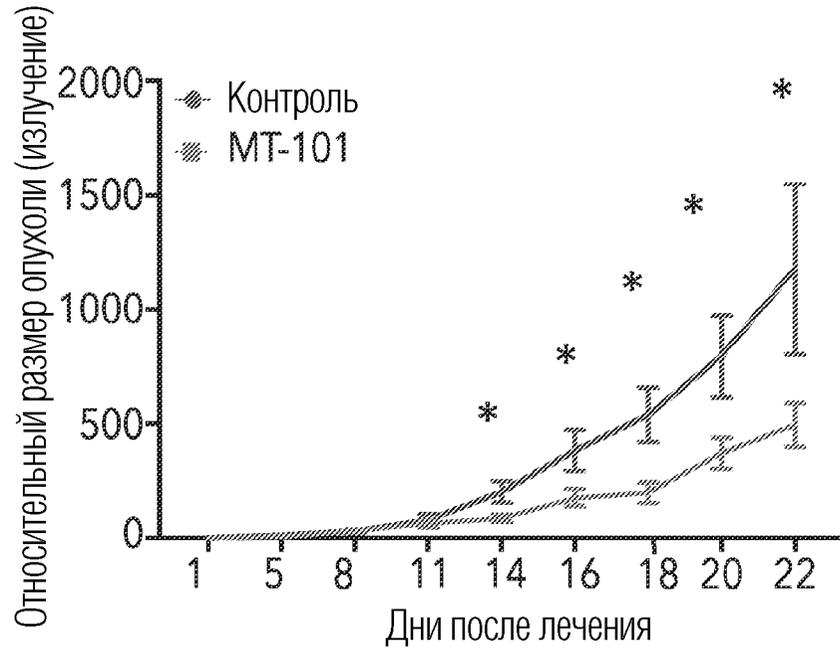


ФИГ. 35

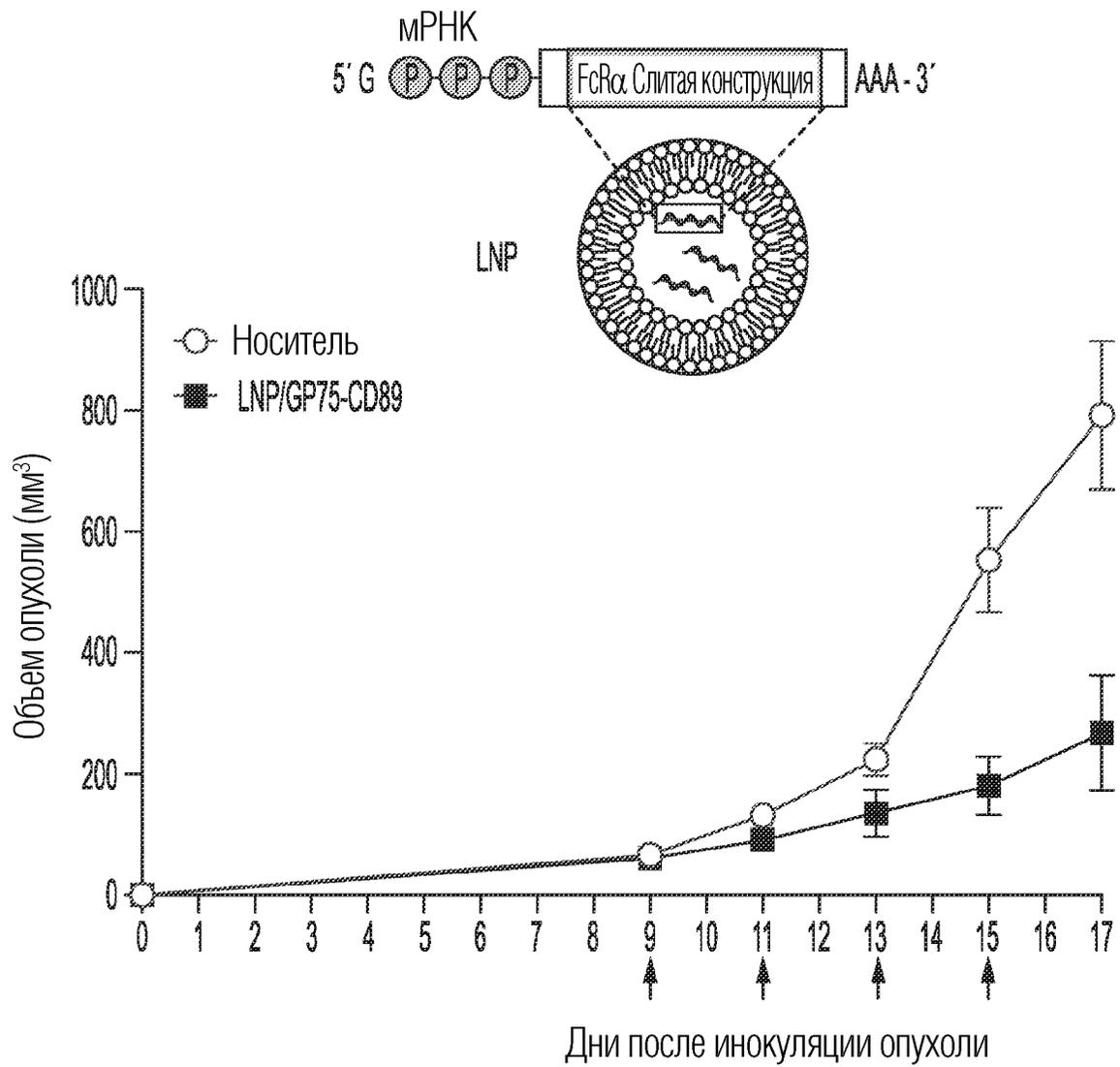
Модель лейкоза  
 ТХ удвоенная ожидаемая продолжительность жизни



Модель Т-клеточной лимфомы  
 Пониженное прогрессирование опухоли

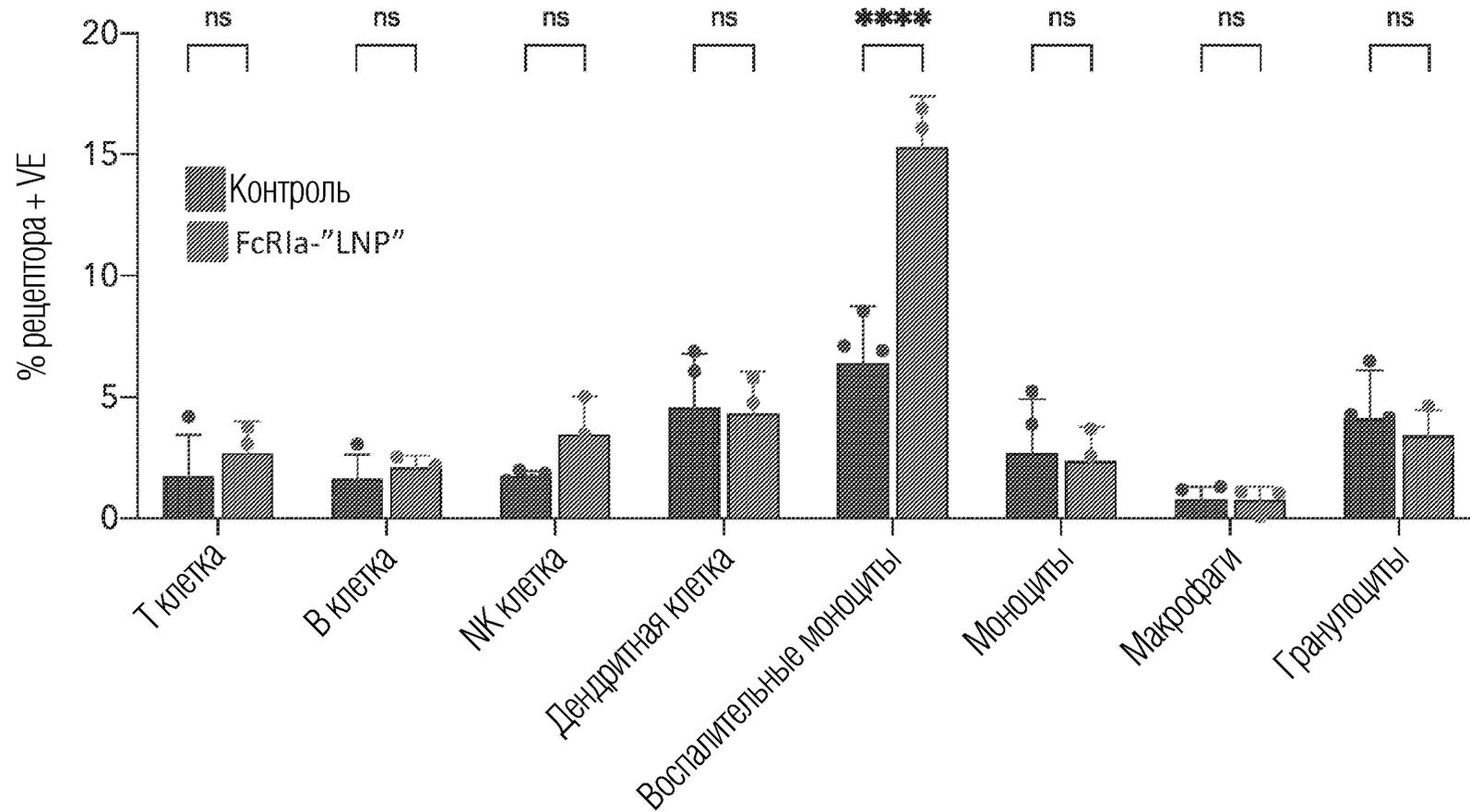


ФИГ. 36



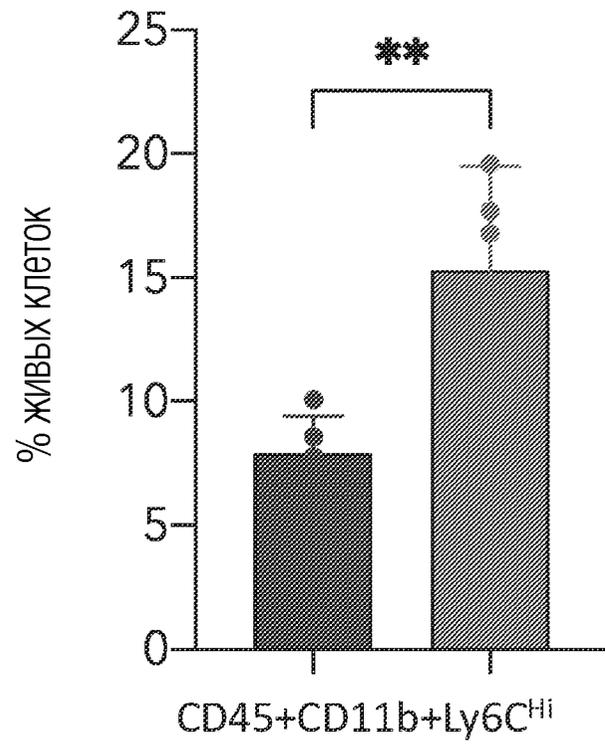
ФИГ. 37

>15% опухолевых миелоидных клеток экспрессируют конструкцию GP-75-Fc $\alpha$ R

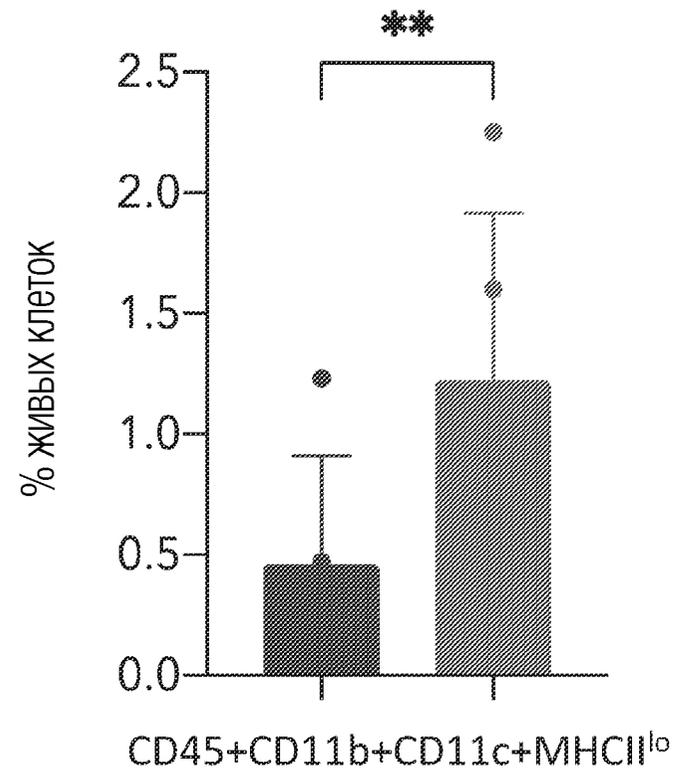


ФИГ. 38

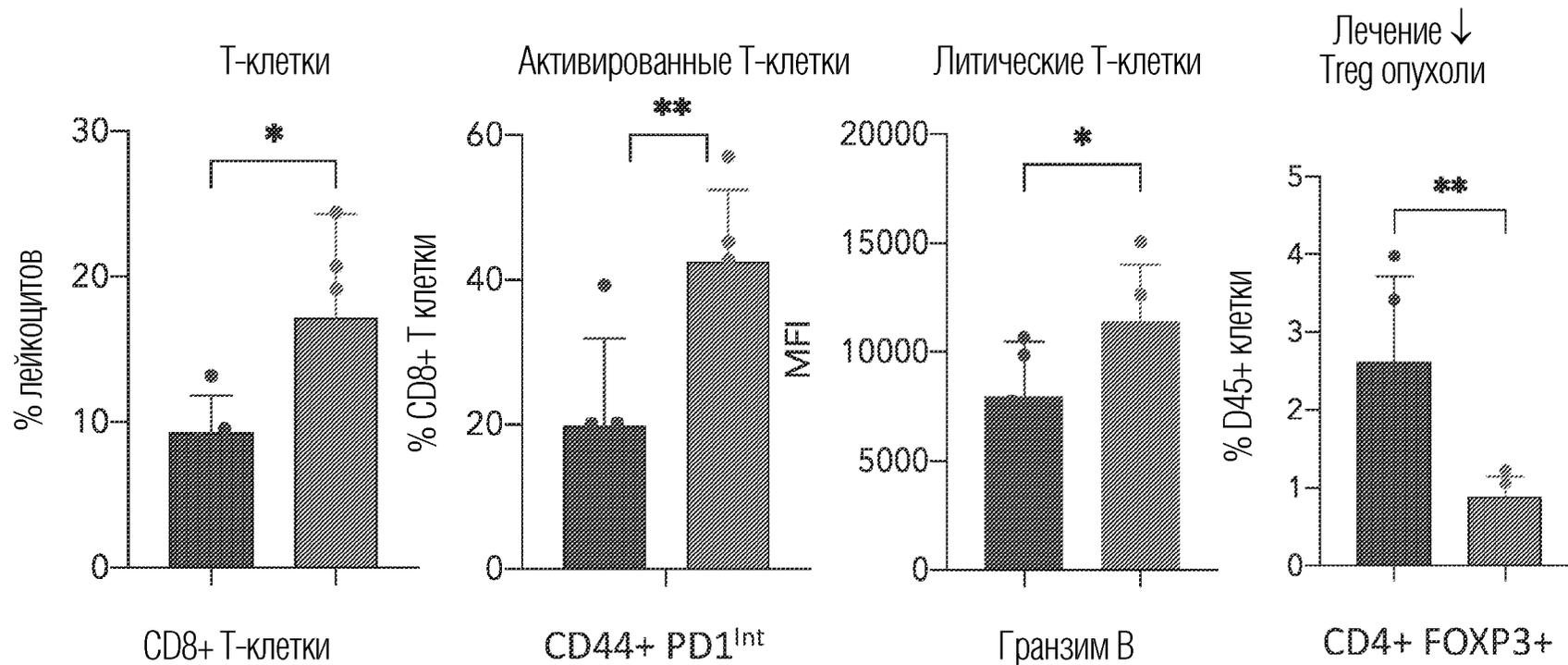
Лечение ↑ воспалительные  
моноциты опухоли



Лечение ↑ дендритные  
клетки опухоли



ФИГ. 39

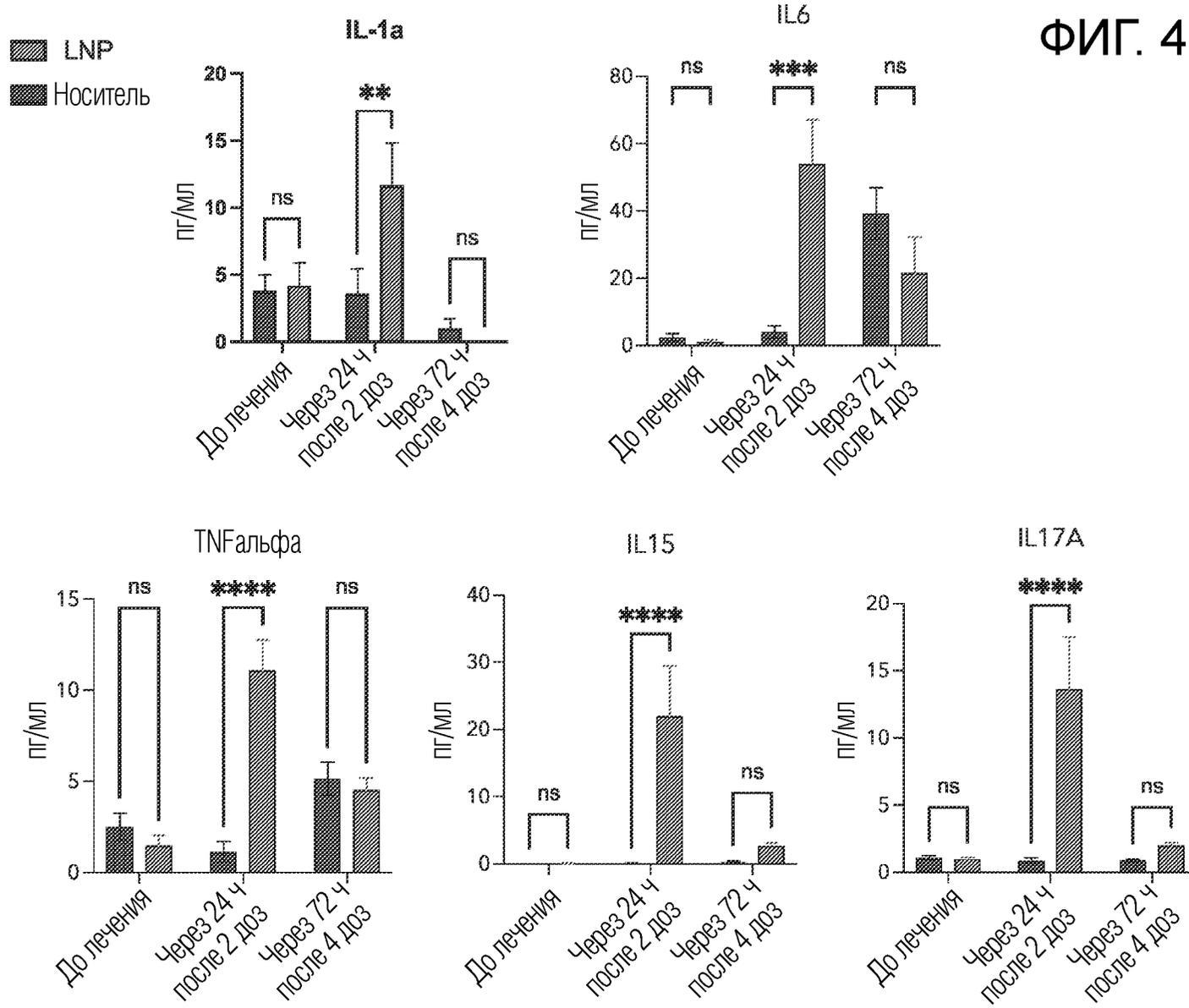


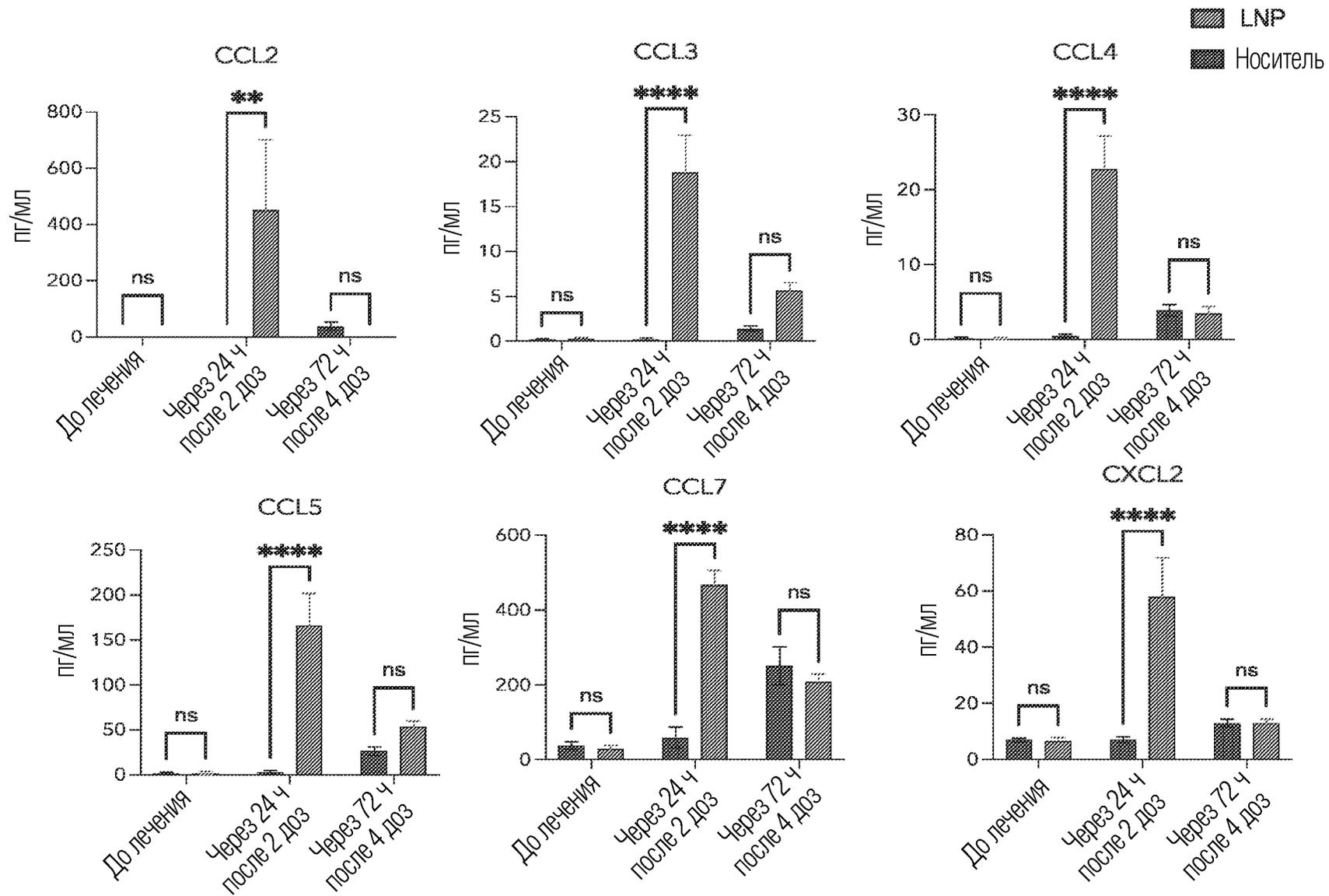
Лечение ↑ активированные CD8+ Т-клетки опухоли

Лечение ↓  
Treg опухоли

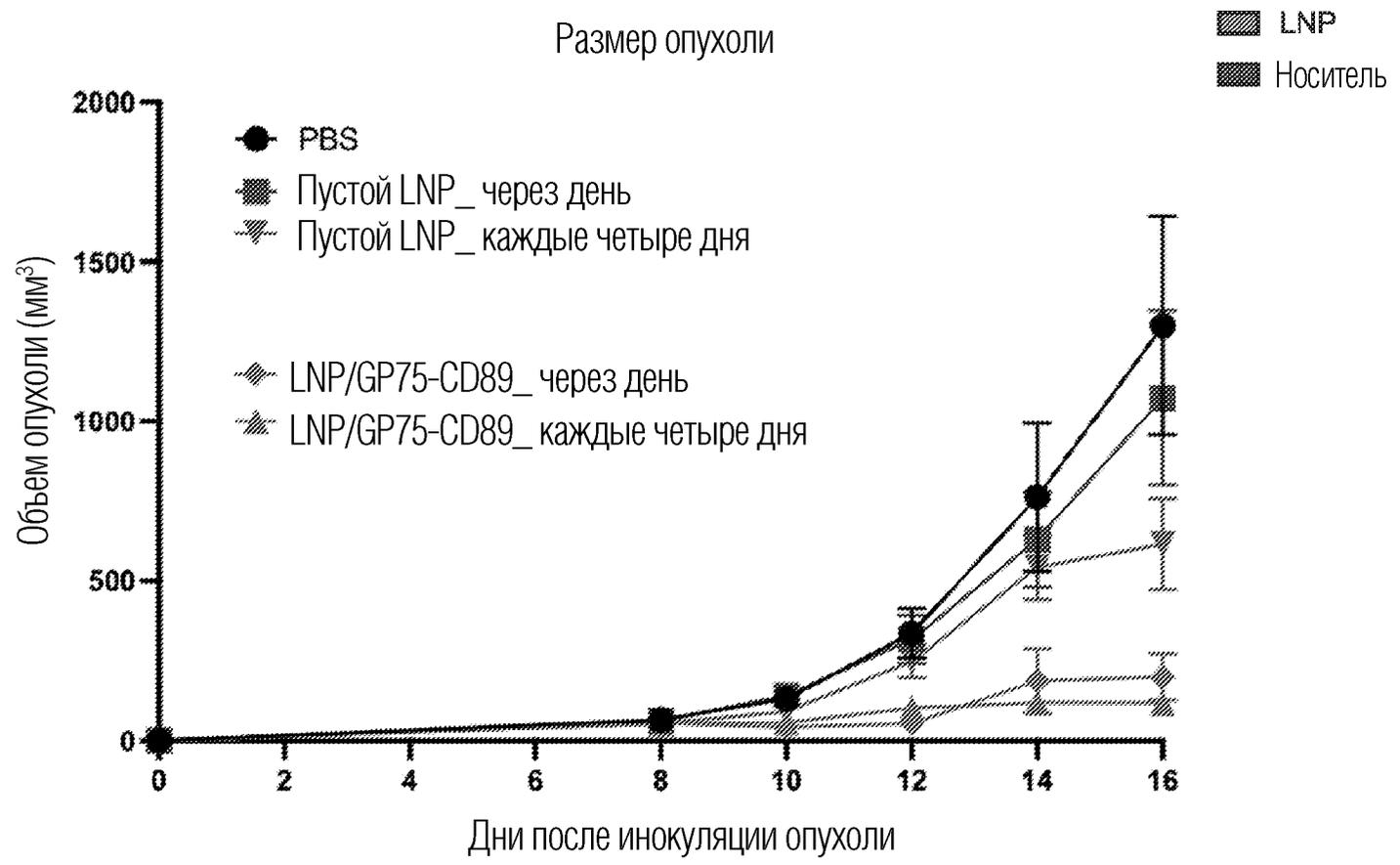
ФИГ. 40

ФИГ. 41

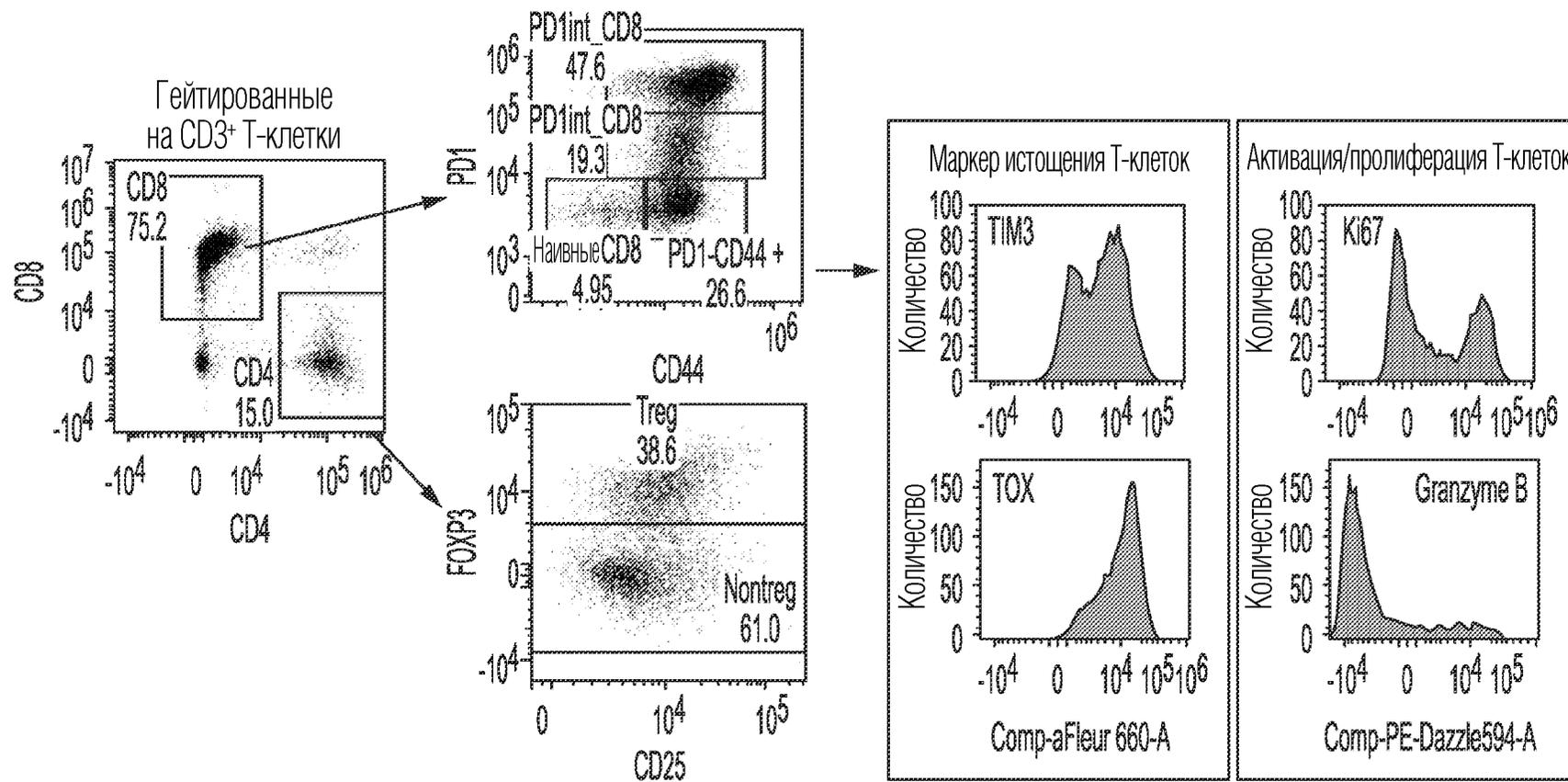




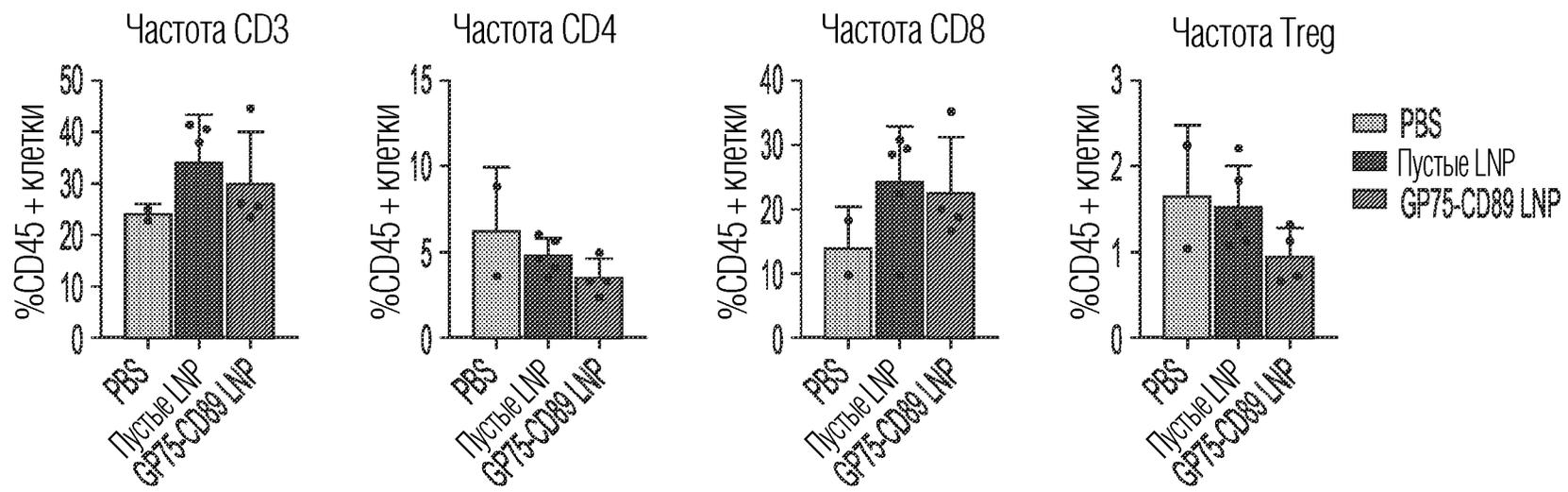
ФИГ. 42



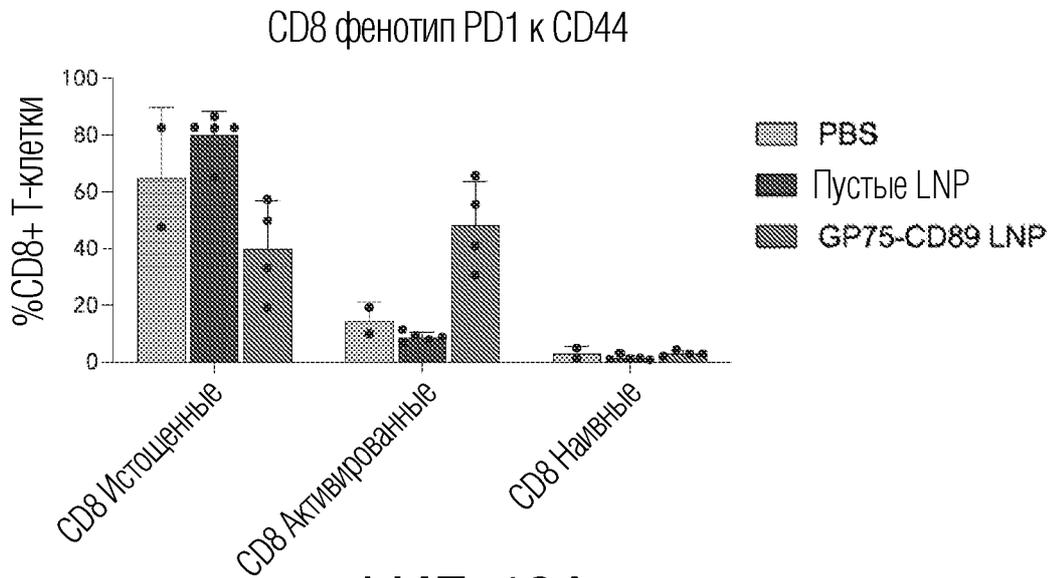
ФИГ. 43



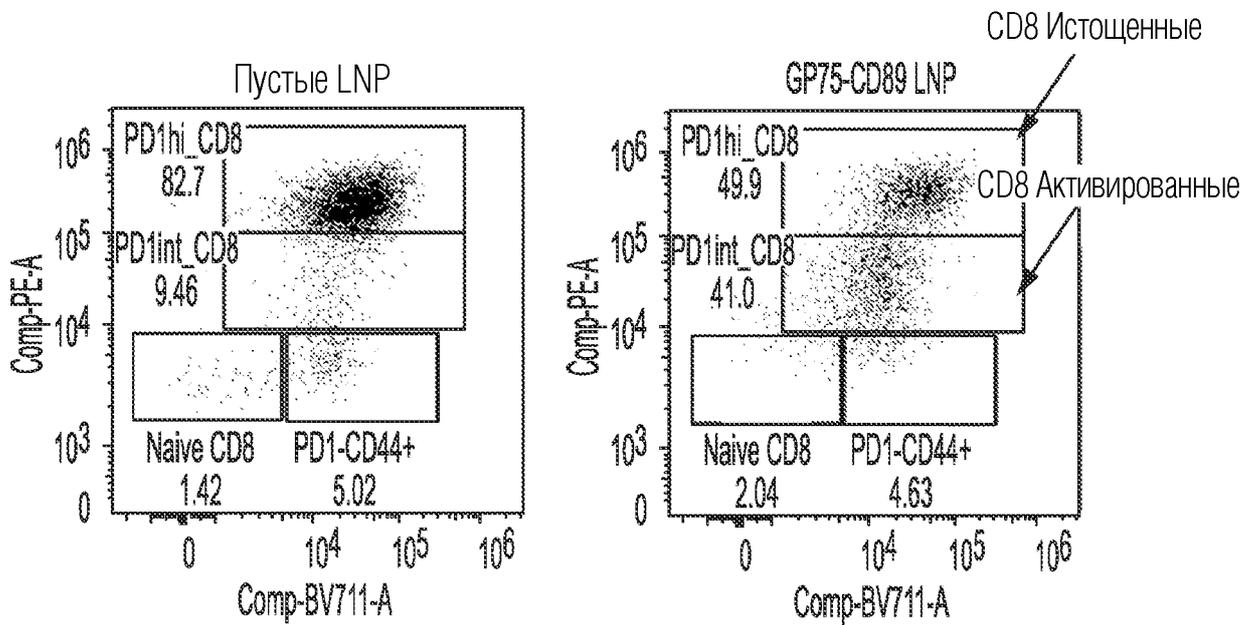
ФИГ. 44



ФИГ. 45

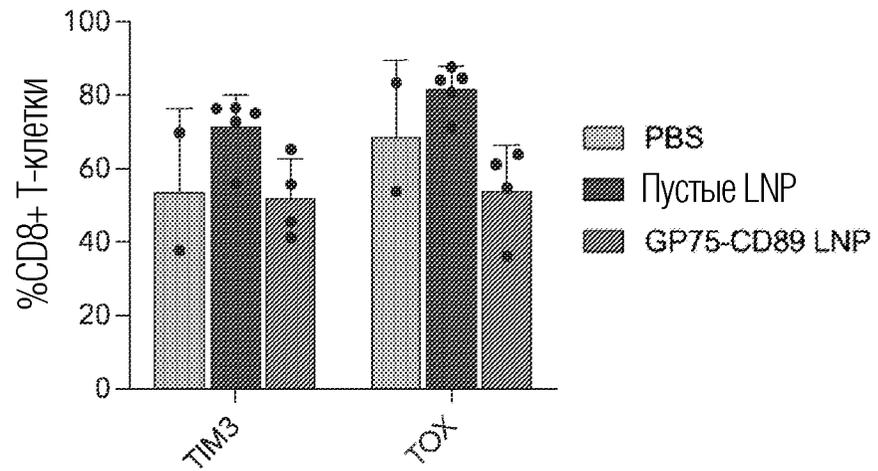


ФИГ. 46А

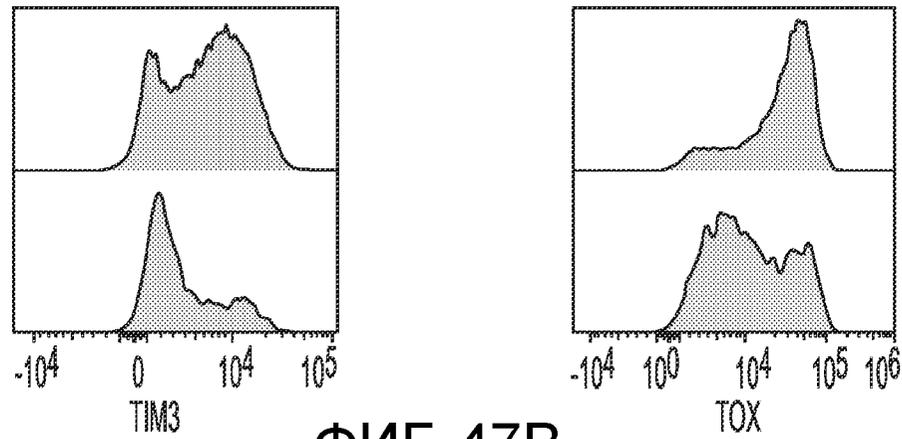


ФИГ. 46В

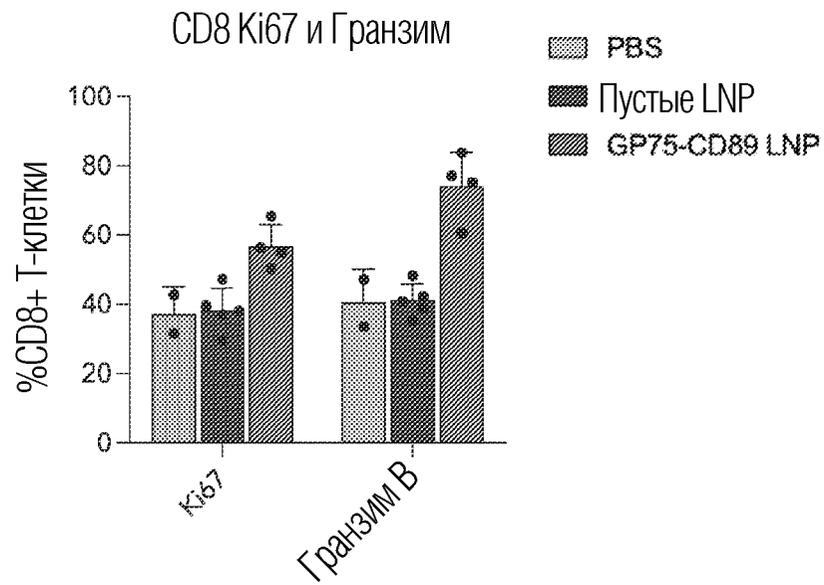
CD8 TIM3 и TOX



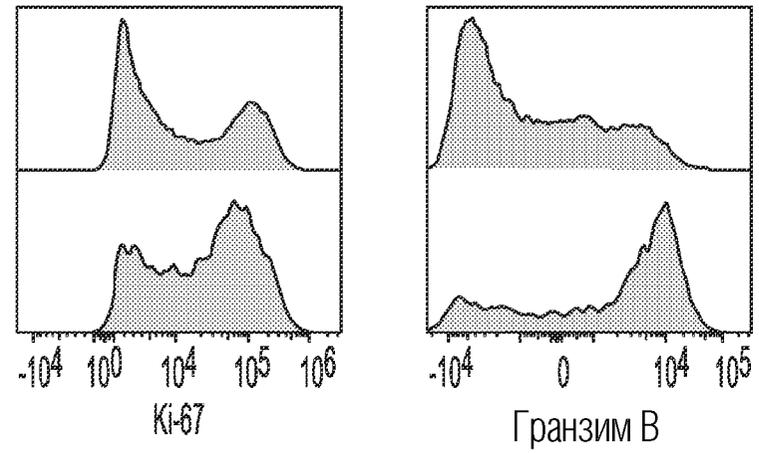
ФИГ. 47А



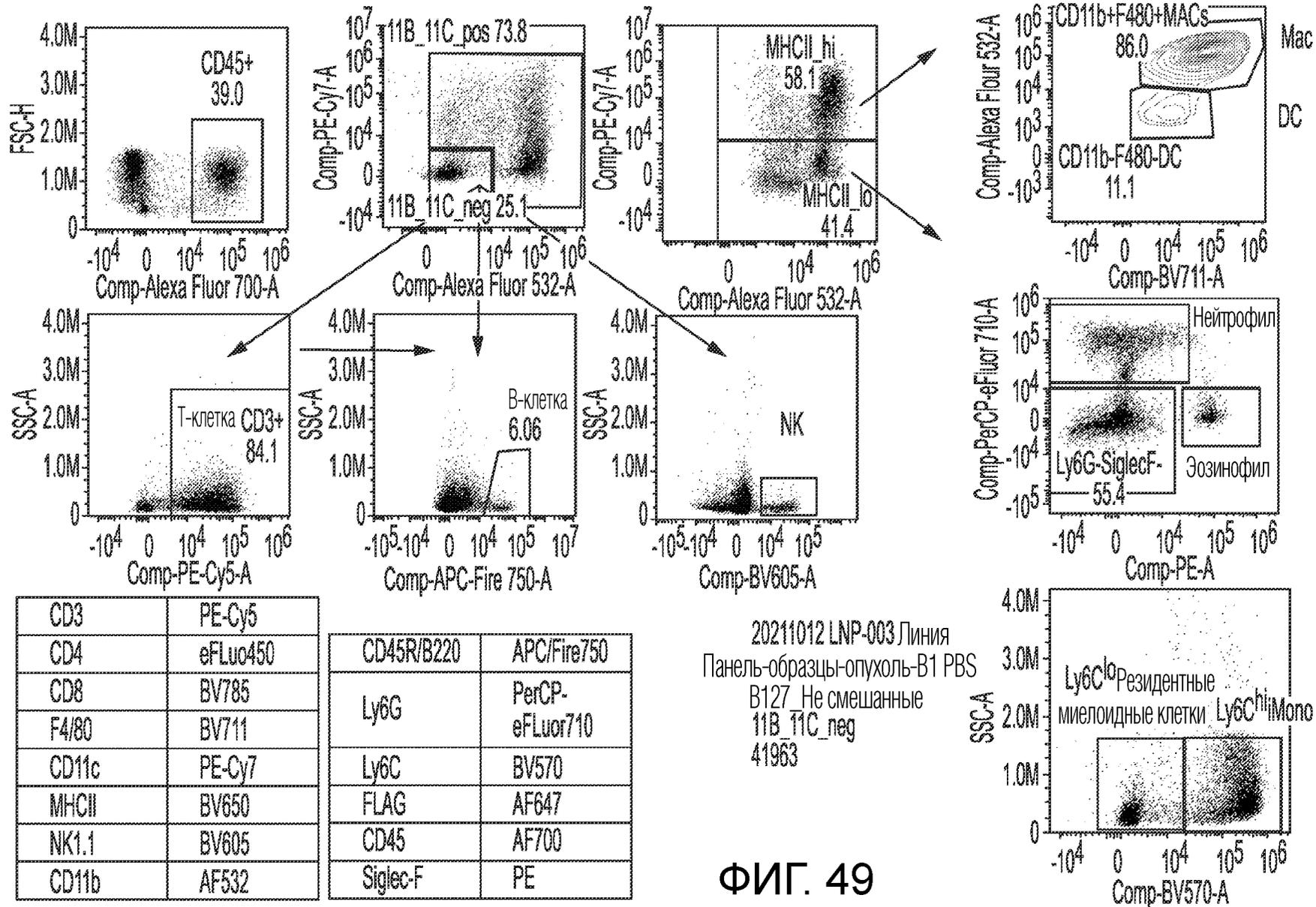
ФИГ. 47В



ФИГ. 48А

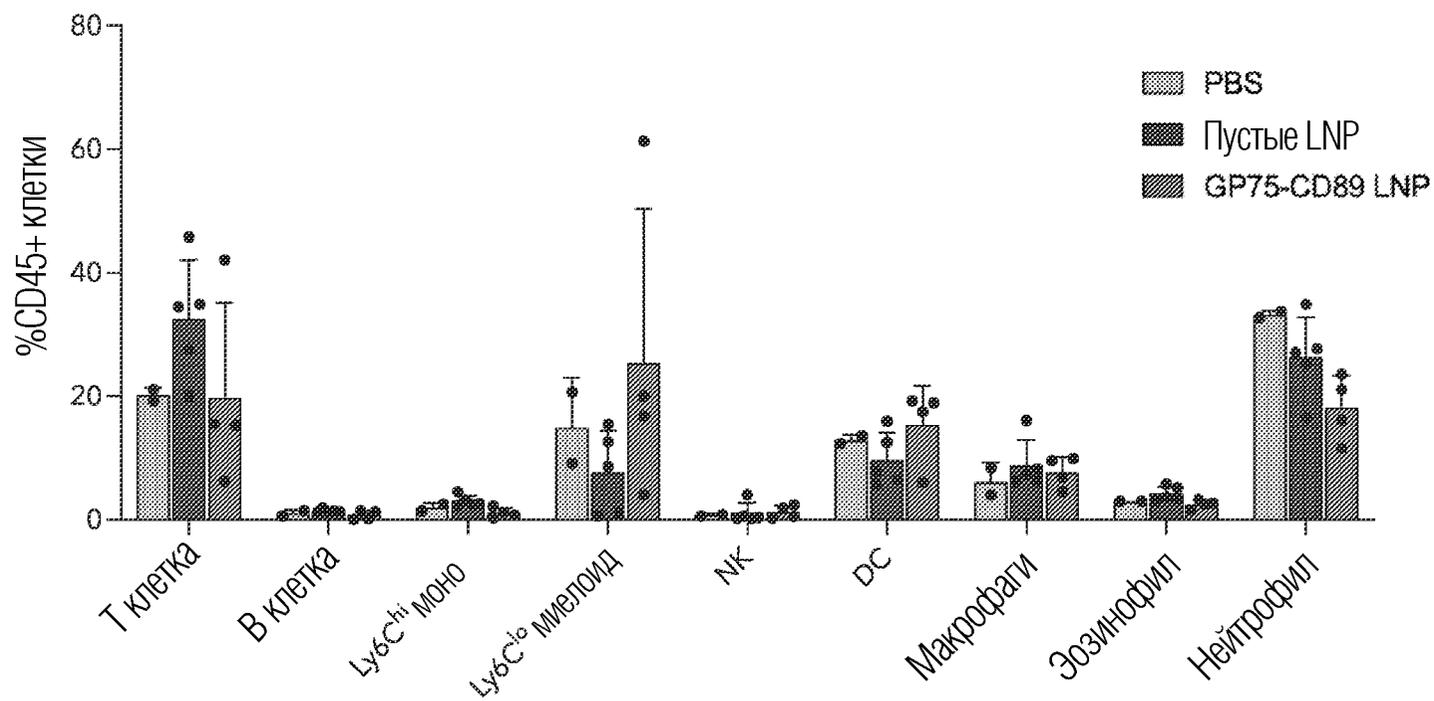


ФИГ. 48В



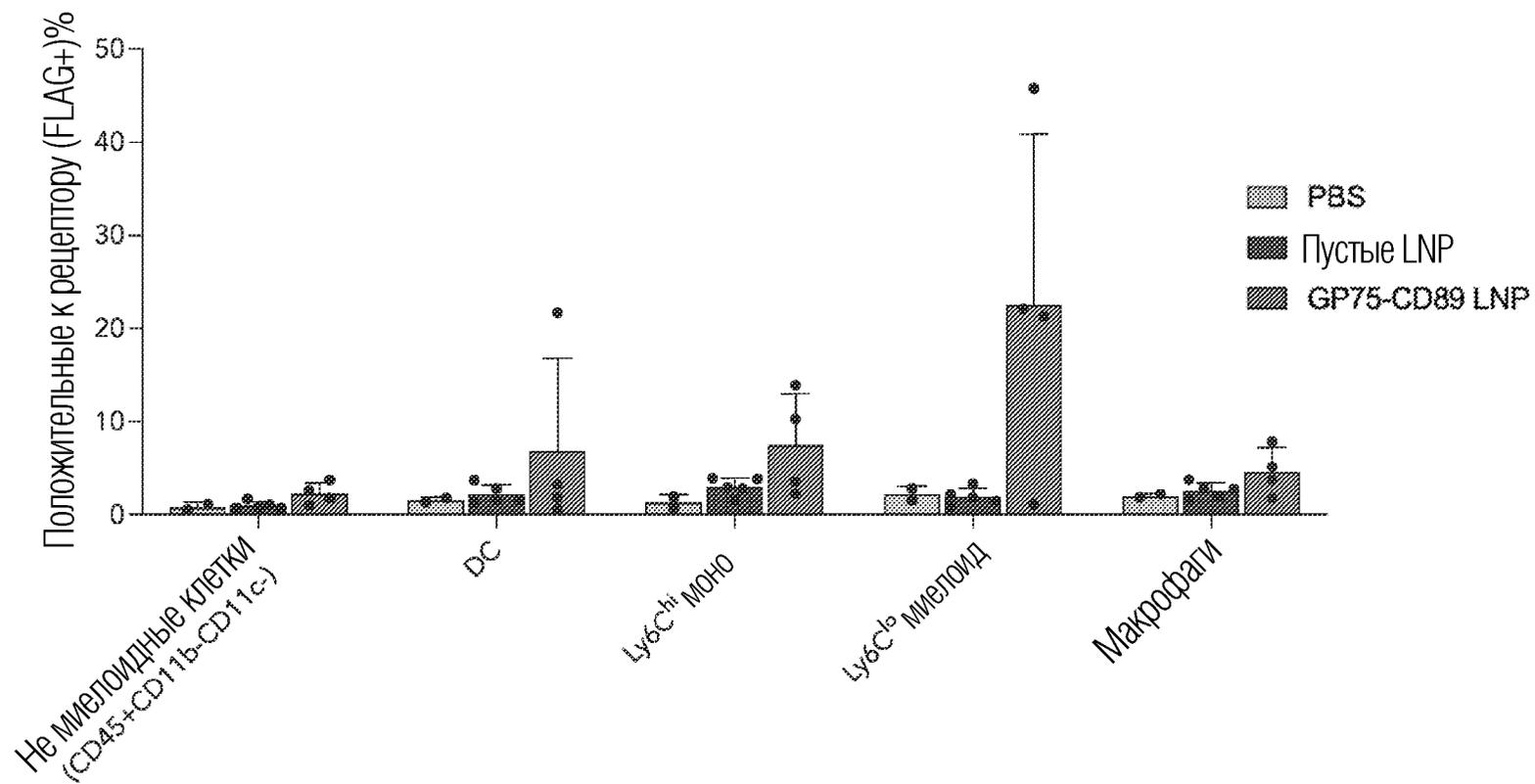
ФИГ. 49

Частота популяции иммунных клеток среди CD45+ клеток

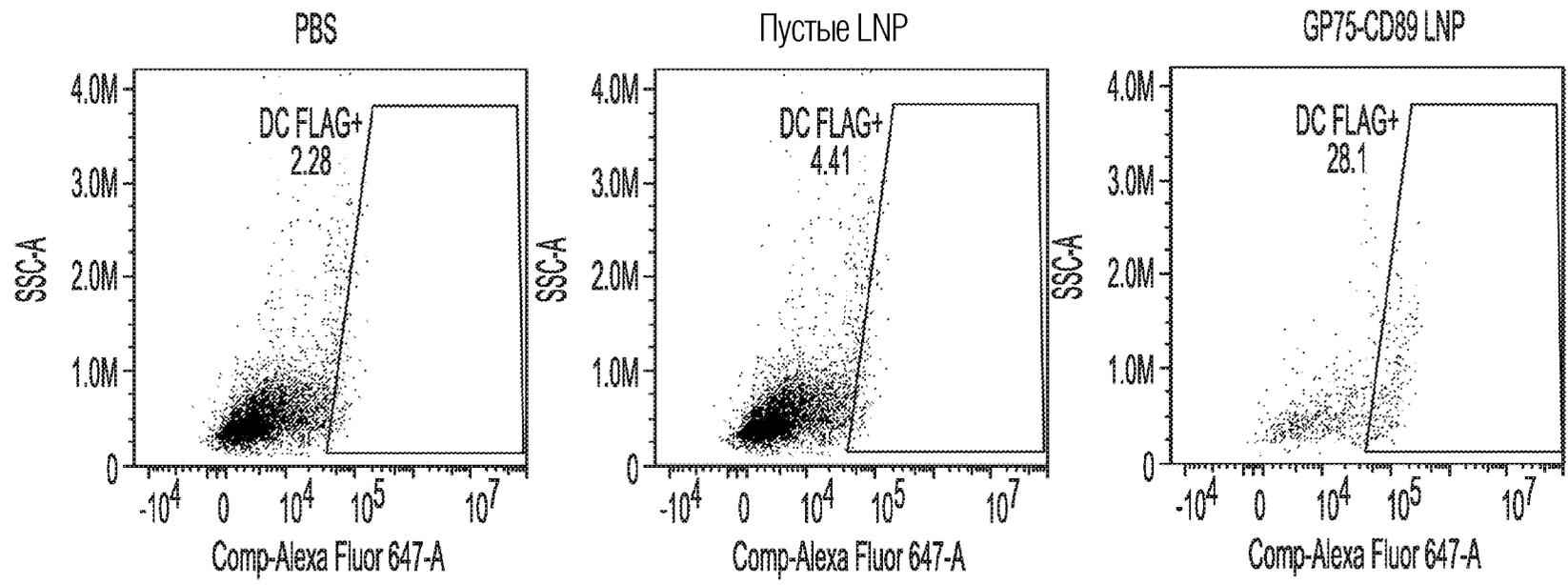


ФИГ. 50

Доля подмножеств иммунных клеток, экспрессирующих GP75-CD89 рецептора



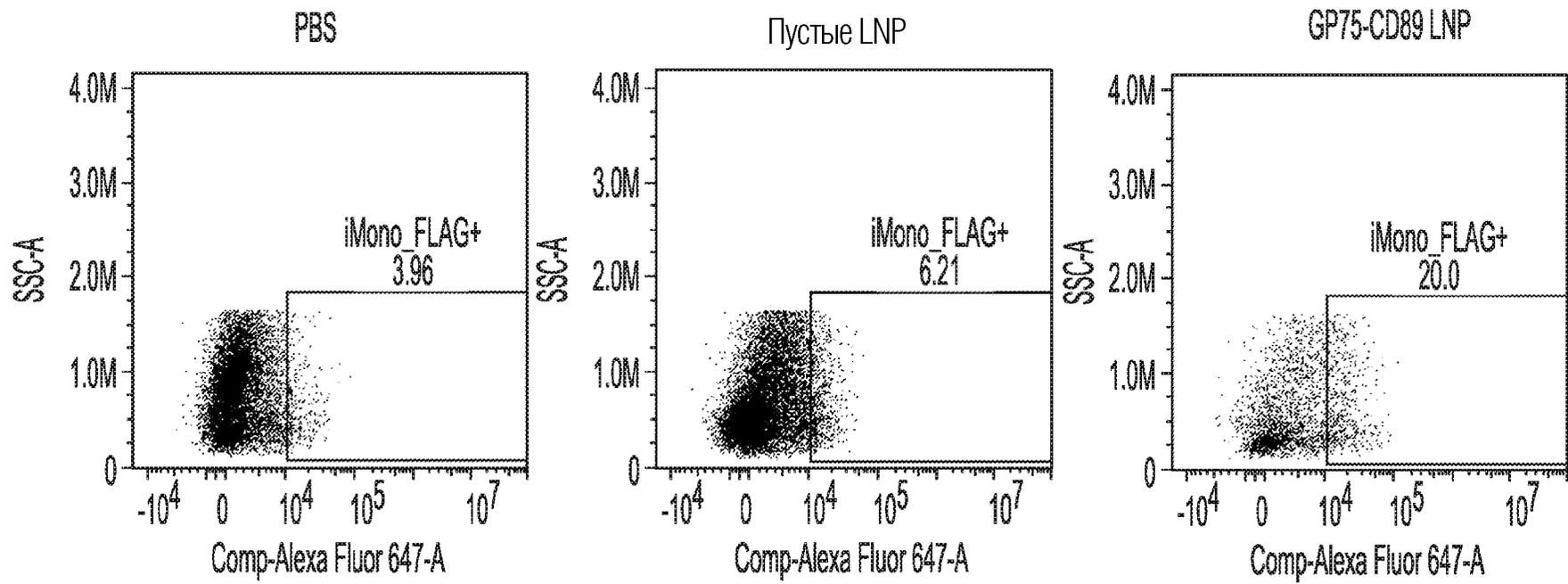
ФИГ. 51



Экспрессия рецептора (FLAG) →

*Леченные GP75-CD89 животные имеют довольно маленькие опухоли, что дает меньшее количество событий в потоке*

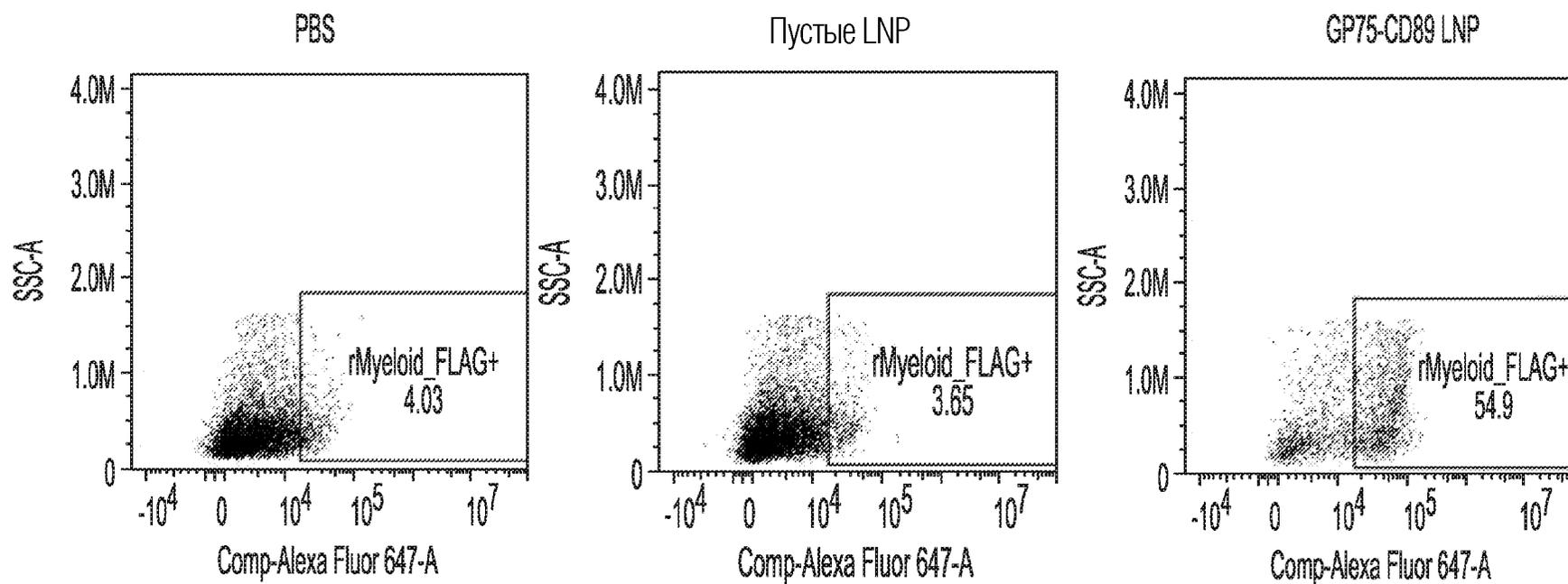
ФИГ. 52



Экспрессия рецептора (FLAG) →

*Леченные GP75-CD89 животные имеют довольно маленькие опухоли, что дает меньшее количество событий в потоке*

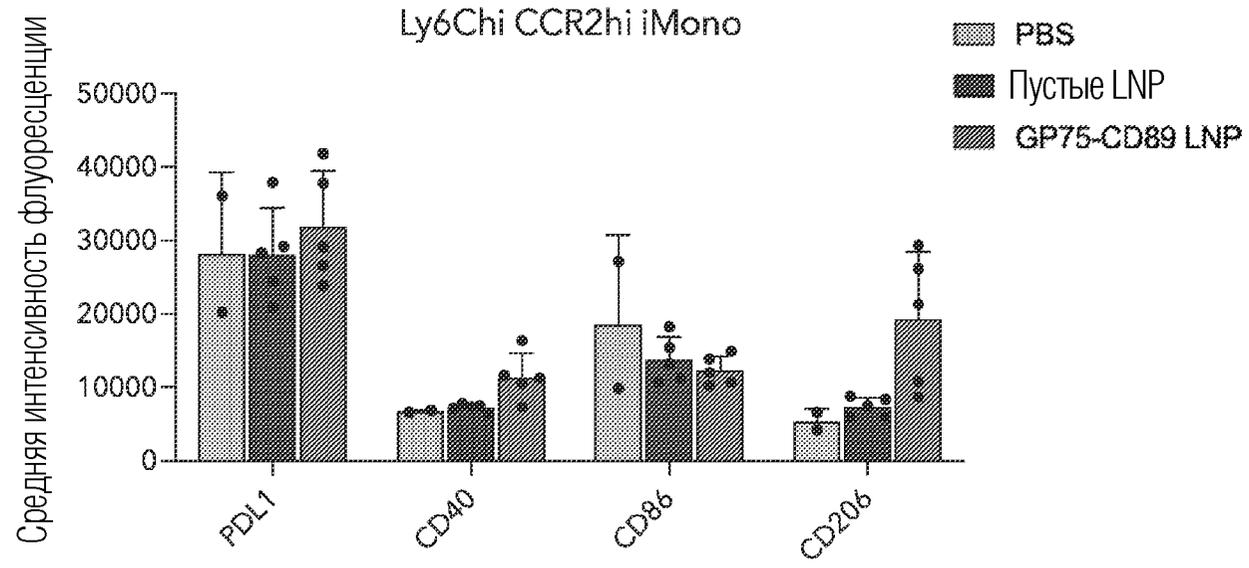
ФИГ. 53



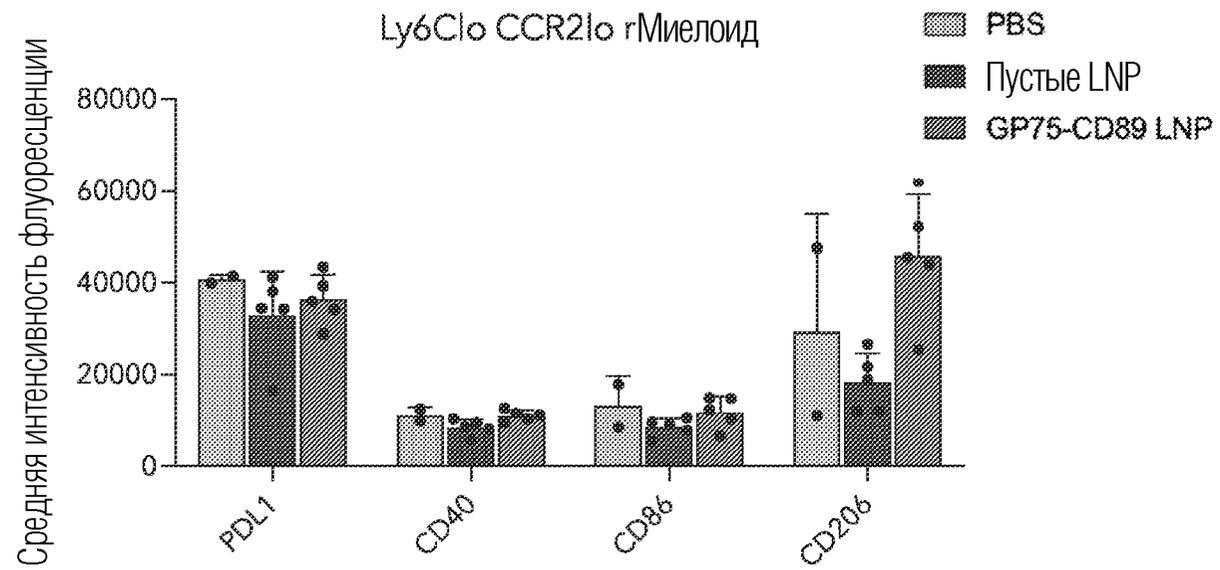
Экспрессия рецептора (FLAG) →

*Леченные GP75-CD89 животные имеют довольно маленькие опухоли, что дает меньшее количество событий в потоке*

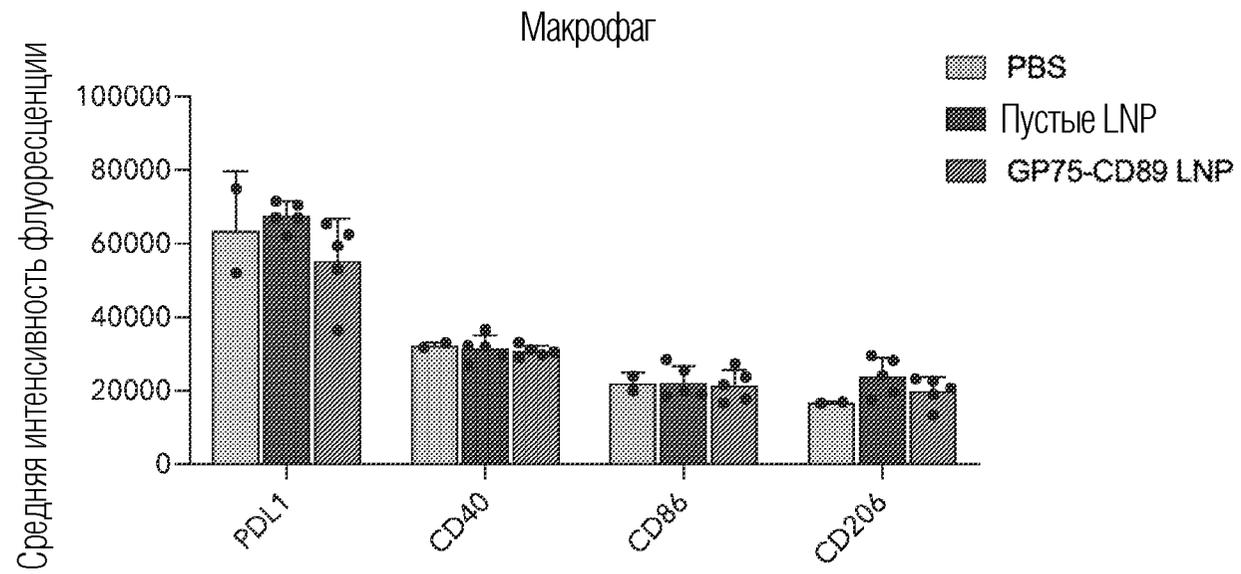
ФИГ. 54



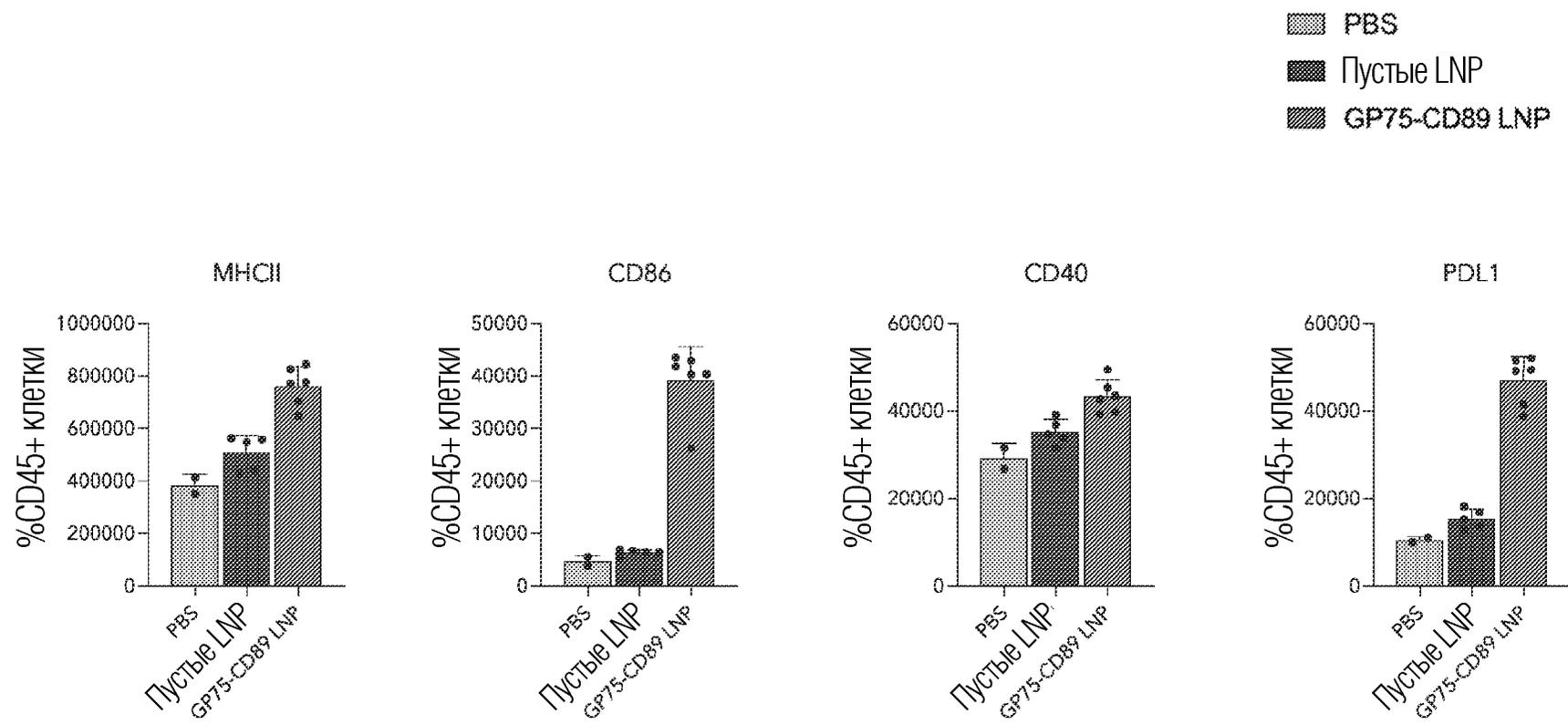
ФИГ. 55



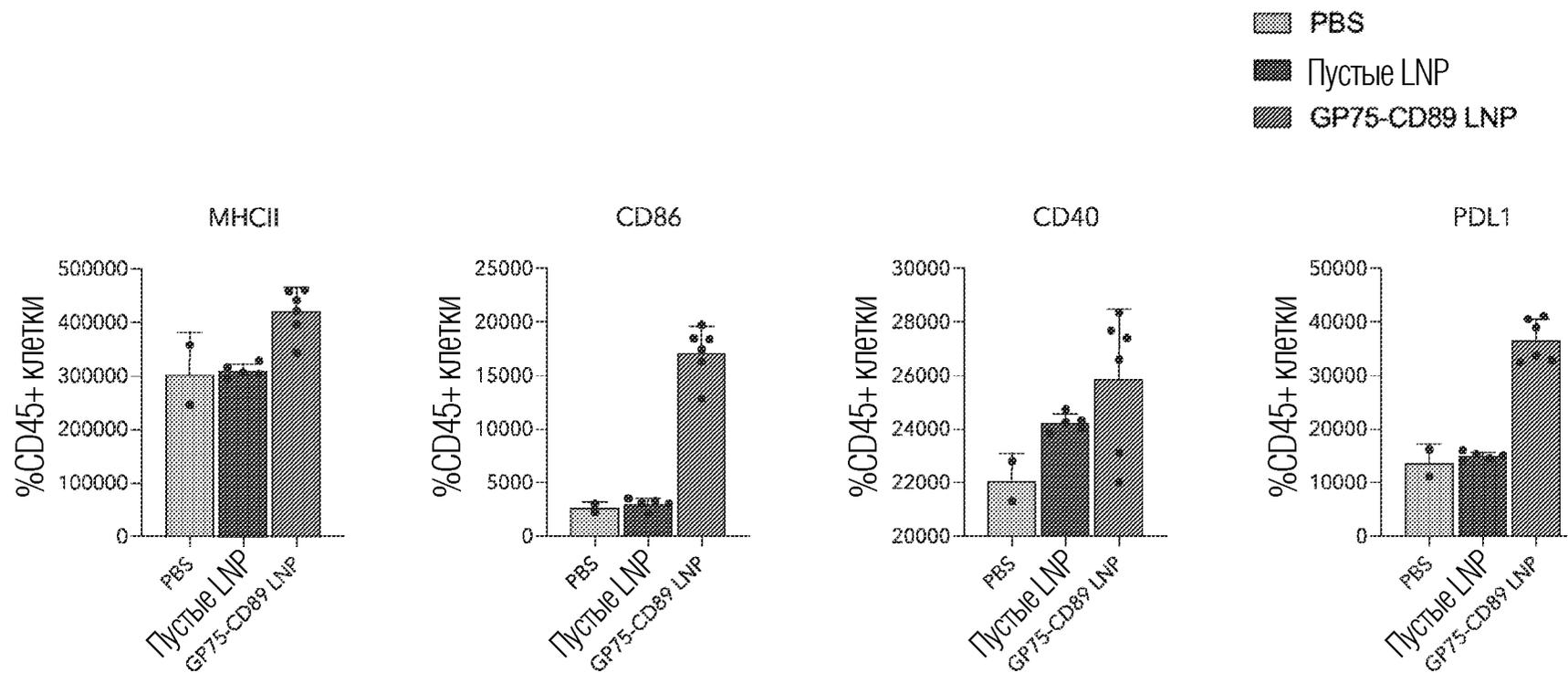
ФИГ. 56



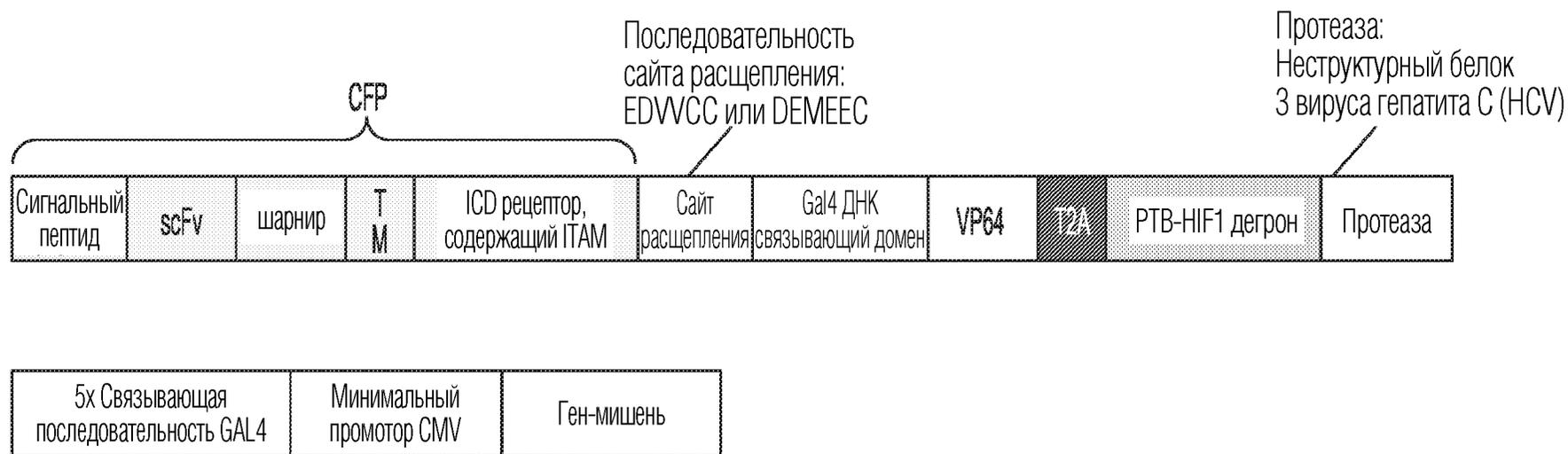
ФИГ. 57



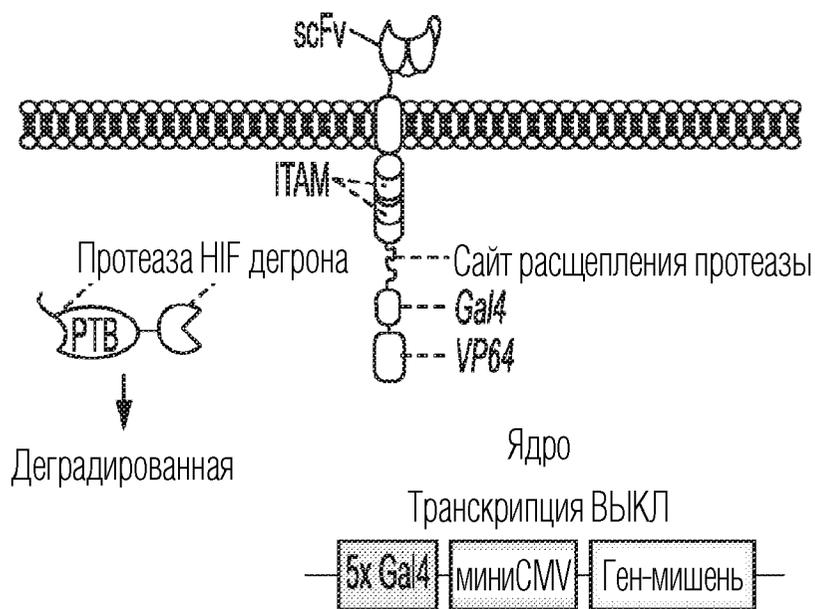
ФИГ. 58



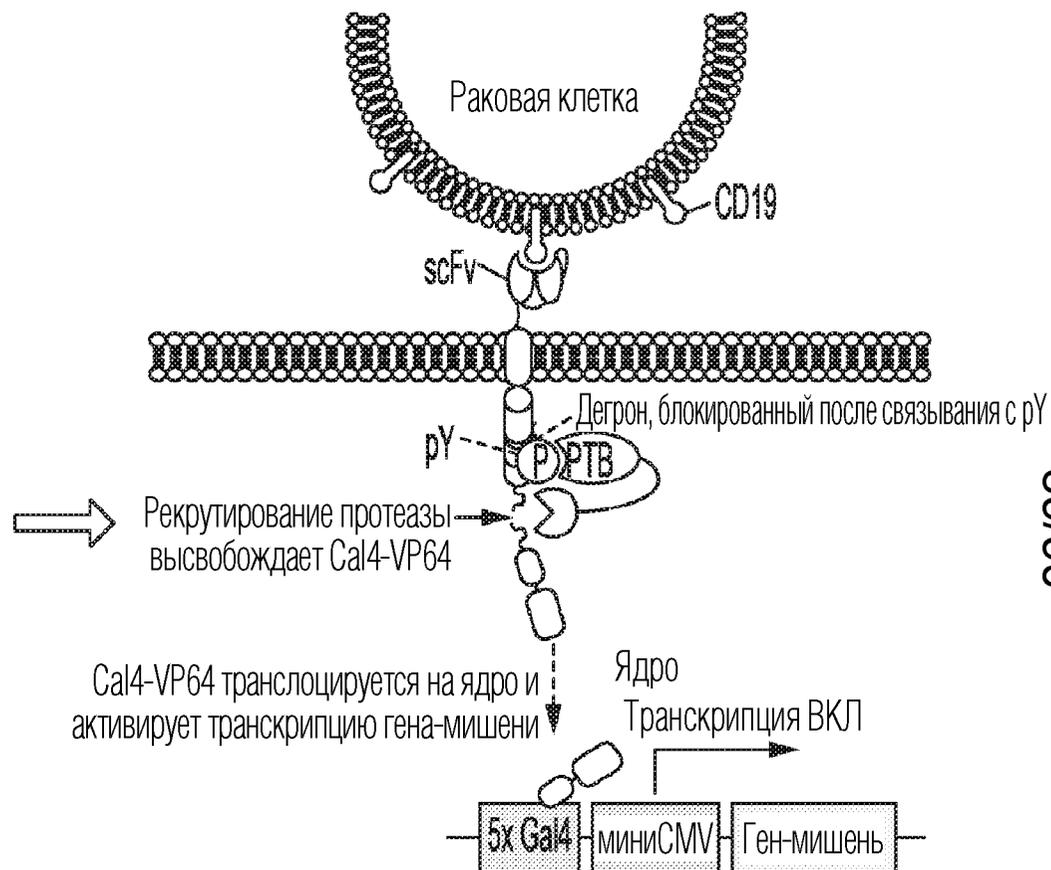
ФИГ. 59



ФИГ. 60



ФИГ. 61А



ФИГ. 61В

Главный основной белок 1 эозинофила человека



ФИГ. 62А



ФИГ. 62В