

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046755**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.18

(21) Номер заявки
201891614

(22) Дата подачи заявки
2017.01.10

(51) Int. Cl. *A61K 35/17* (2015.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) **ХИМЕРНЫЕ БЕЛКИ И СПОСОБЫ ИММУНОТЕРАПИИ**

(31) **62/277,322; 62/351,522; 62/399,902;
62/399,923; 62/399,939**

(32) **2016.01.11; 2016.06.17; 2016.09.26;
2016.09.26; 2016.09.26**

(33) **US**

(43) **2019.02.28**

(86) **PCT/US2017/012881**

(87) **WO 2017/123556 2017.07.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ТЕ БОРД ОФ ТРАСТИЗ ОФ ТЕ
ЛИЛЭНД СТЭНФОРД ДЖУНИОР
ЮНИВЕРСИТИ (US)**

(72) Изобретатель:

Ци Лэй С., Ван Бин С. (US)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(56) **WO-A2-2015092024
US-A-5888813
US-A1-20060182741
US-A1-20070231319
WO-A1-2015142661
US-A1-20150291966
US-A1-20150044772
WO-A1-2015048690
US-A1-20140068797
WO-A2-2015077789**

(57) В изобретении представлены системы для регуляции иммунных клеток и способы иммунотерапии. Данные системы настоящего изобретения для регуляции иммунных клеток включают химерный рецепторный полипептид, химерный адаптерный полипептид, ген-модулирующий полипептид (GMP) и расщепляющий элемент.

B1

046755

**046755
B1**

Перекрестные ссылки

Настоящая заявка претендует на приоритет от предварительной заявки на патент США No. 62/277322, поданной 11 января 2016 г., предварительной заявки на патент США № 62/351522, поданной 17 июня 2016 г., предварительной заявки на патент США № 62/399902, поданной 26 сентября 2016 г., предварительной заявки на патент США № 62/399923, поданной 26 сентября 2016 г., и предварительной заявки на патент США № 62/399939, поданной 26 сентября 2016 г., каждая из которых включена сюда во всей полноте путем ссылки.

Уровень техники

Регуляция клеточной активности может включать связывание лиганда с мембраносвязанным рецептором, содержащим внеклеточный связывающий лиганд домен и внутриклеточный (например, цитоплазматический) сигнальный домен. Образование комплекса между лигандом и связывающим лиганд доменом может вызвать конформационную и/или химическую модификацию рецептора, что приведет к передаче сигнала внутрь клетки. В некоторых ситуациях цитоплазматическая часть рецептора подвергается фосфорилированию (например, транс- и/или автофосфорилированию), вызывая изменение его активности. Эти события могут быть сопряжены со вторичными мессенджерами и/или с привлечением кофакторных белков. В некоторых случаях изменения в цитоплазматической части приводят к связыванию с другими белками (например, кофакторными белками и/или другими рецепторами). Эти другие белки могут активироваться, а затем выполнять различные функции внутри клетки.

При соединении внеклеточного домена (например, связывающего лиганд домена) одного белка с внутриклеточным доменом (например, сигнальным доменом) другого белка, участвующего в передаче сигналов, образуется молекула (например, химерный рецептор), в которой сочетается распознавание антигена от первого с передачей сигналов от последнего. Такие химерные молекулы (например, химерные рецепторы или химерные рецепторы антигенов) могут применяться для различных целей, к примеру, для регулирования иммунных клеток при иммунотерапии. Иммунотерапия может включать модификацию собственных иммунных клеток пациента для экспрессии химерного рецептора, у которого к сигнальному домену иммунных клеток привита произвольная специфичность к лигандам. Сигнальный домен иммунных клеток может вовлекаться в активацию и/или дезактивацию иммунных клеток в ответ на такие заболевания, как рак.

Стандартные методы иммунотерапии страдают различными недостатками. Такие недостатки включают недостаточную сигнализацию костимулирующих рецепторов для стойких и/или адекватных иммунных реакций для терапевтических эффектов, неадекватную специфичность модифицированных иммунных клеток к пораженным клеткам типа раковых клеток (например, действие и токсичность на мишени вне опухоли) и такие побочные эффекты, как синдром высвобождения цитокинов (CRS). Сигнализация в иммунных клетках может включать в себя различные рецепторы, в том числе костимулирующие рецепторы. Недостаточность сигналов от костимулирующих рецепторов может приводить к снижению ответов иммунных клеток и снижению эффективности иммунотерапии. Внецелевые эффекты и побочные эффекты типа синдрома высвобождения цитокинов могут приводить к дальнейшим медицинским осложнениям, включающим воспалительные реакции, недостаточность органов и, в крайнем случае, смерть.

Сущность изобретения

Ввиду вышесказанного, существует значительная потребность в альтернативных композициях и способах проведения иммунотерапии. Композиции и способы настоящего изобретения отвечают этой потребности и обеспечивают дополнительные преимущества. В частности, различные аспекты изобретения обеспечивают системы регуляции иммунных клеток.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрена система условной регуляции иммунных клеток. Система включает: (a) химерный полипептид трансмембранного рецептора, включающий (i) внеклеточную область, содержащую взаимодействующий с антигеном домен, который связывает антиген, и (ii) внутриклеточную область, содержащую сигнальный домен иммунной клетки; (b) химерный адаптерный полипептид, содержащий участок рецепторного связывания, который связывает рецепторный полипептид, если рецепторный полипептид подвергся модификации при связывании с антигеном; (c) генерирующий полипептид (GMP), содержащий исполнительный элемент, соединенный с сайтом распознавания расщепления; и (d) расщепляющий элемент, который расщепляет сайт распознавания расщепления, когда находится вблизи сайта распознавания расщепления, высвобождая исполнительный элемент из GMP; причем: (i) расщепляющий элемент входит в состав внутриклеточной области рецепторного полипептида, а GMP входит в состав химерного адаптерного полипептида; (ii) расщепляющий элемент образует комплекс со вторым адаптерным полипептидом, который связывает рецепторный полипептид, подвергающийся модификации при связывании рецептора с антигеном, а GMP входит в состав химерного адаптерного полипептида; или (iii) расщепляющий элемент входит в состав химерного адаптерного полипептида, а GMP входит в состав внутриклеточной области рецепторного полипептида. В некоторых воплощениях расщепляющий элемент входит в состав внутриклеточной области рецепторного полипептида, а GMP входит в состав химерного адаптерного полипептида. В некоторых воплощениях расщепляющий элемент комплексуется со вторым адаптерным полипептидом, который связывает рецепторный

полипептид, подвергающийся модификации при связывании рецептора с антигеном, а GMP входит в состав химерного адаптерного полипептида. В некоторых воплощениях расщепляющий элемент входит в состав химерного адаптерного полипептида, а GMP входит в состав внутриклеточной области рецепторного полипептида.

В некоторых воплощениях иммунные клетки представлены лимфоцитами. В некоторых воплощениях лимфоциты представлены Т-клетками. В некоторых воплощениях лимфоциты представлены клетками натуральных киллеров (NK).

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает антитело. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает по меньшей мере одно из Fc-области, Fv-области, тяжелой цепи или легкой цепи антитела. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает Fc-область антитела.

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен включает по меньшей мере Fab, одноцепочечный Fv (scFv), внеклеточный рецепторный домен или Fc-связывающий домен. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен включает Fc-связывающий домен, содержащий Fc-рецептор или его фрагмент. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен включает Fc-связывающий домен, содержащий FcγRI (CD64), FcγRIa, FcγRIb, FcγRIc, FcγRIIA (CD32), FcγRIIA (CD32, H131), FcγRIIA (CD32, R131), FcγRIIB (CD32), FcγRIIB-1, FcγRIIB-2, FcγRIIA (CD16a, V158), FcγRIIA (CD16a, F158), FcγRIIB (CD16b, FcγRIIB-NA1), FcγRIIB (CD16b, FcγRIIB-NA2), FcεRI, FcεRII (CD23), FcαRI (CD89), Fcα/μR, FcRn либо производное, вариант или фрагмент любого из них.

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает антиген, включающий антитело, которое в свою очередь связывает антиген, выбранный из группы, в которую входят: β-амилоид 1-40, 4-1BB, 5AC, 5T4, киназа-1 типа рецептора активина, ACVR2B, антиген аденокарциномы, AGS-22M6, альфа-фетопротеин, ангиопозтин 2, ангиопозтин 3, сибиреязвенный токсин, AOC3 (VAP-1), B7-H3, токсин *Bacillus anthracis*, BAFF, бета-амилоид, клетки В-лимфомы, антиген C242, C5, CA-125, IL31 собаки (*Canis lupus familiaris*), карбоангидраза 9 (CA-IX), сердечный миозин, CCL11 (эотаксин-1), CCR4, CCR5, CD11, CD18, CD125, CD140a, CD147 (базигин), CD15, CD152, CD154 (CD40L), CD19, CD2, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23 (рецептор IgE), CD25 (α-цепь рецептора IL-2), CD27, CD274, CD28, CD3, CD3-эпсилон, CD30, CD33, CD37, CD38, CD4, CD40, лиганд CD40, CD41, CD44 v6, CD5, CD51, CD52, CD56, CD6, CD70, CD74, CD79B, CD80, CEA, родственный CEA антиген, CFD, ch4D5, CLDN18.2, *Clostridium difficile*, фактор слипания A, CSF1R, CSF2, CTLA-4, рецептор-4 хемокинов типа C-X-C, цитомегаловирус, гликопротеин В цитомегаловируса, дабигатран, DLL4, DPP4, DR5, шигатоксин *E. coli* 1 типа, шигатоксин *E. coli* 2 типа, EGFL7, EGFR, эндотоксин, EpCAM, эписиалин, ERBB3, *Escherichia coli*, F-белок респираторно-синцитиального вируса, FAP, бета-цепь фибрина II, дополнительный домен-В фибронектина, фолатгидролаза, рецептор фолата 1, альфа-рецептор фолата, рецептор Frizzled, ганглиозид GD2, GD2, ганглиозид GD3, глипикан 3, α-цепь рецептора GMCSF, GPNMB, фактор роста и дифференцировки 8, GUCY2C, гемагглютинин, поверхностный антиген гепатита В, вирус гепатита В, HER1, HER2/neu, HER3, HGF, HNGFR, гистоновый комплекс, HIV-1, HLA-DR, HNGF, Hsp90, киназа рецептора фактора роста гепатоцитов (scatter factor) человека, TNF человека, бета-амилоид человека, ICAM-1 (CD54), IFN-α, IFN-γ, IgE, Fc-область IgE, рецептор IGF-1, IGF-1, IGHE, IL 17A, IL 17F, IL 20, IL-12, IL-13, IL-17, IL-1β, IL-22, IL-23, IL-31RA, IL-4, IL-5, IL-6, рецептор IL-6, IL-9, IGF2, гемагглютинин вируса гриппа А, рецептор инсулиноподобного фактора роста I, интегрин α4β7, α4-интегрин, интегрин α5β1, интегрин α7β7, интегрин αIIbβ3, интегрин αvβ3, рецептор α/β-интерферона, индуцированный γ-интерфероном белок, ITGA2, ITGB2 (CD18), KIR2D, антиген Lewis-Y, LFA-1 (CD11a), LINGO-1, липотейхоевая кислота, LOXL2, L-селектин (CD62L), LTA, MCP-1, мезотелин, MIF, MS4A1, MSLN, MUC1, CanAg муцина, связанный с миелином гликопротеин, миостатин, NCA-90 (антиген гранулоцитов), регулируемая апоптозом невральная протеиназа 1, NGF, N-гликолилнейраминавая кислота, NOGO-A, рецептор Notch, NRP1, *Oryctolagus cuniculus*, OX-40, oxLDL, PCSK9, PD-1, PDCD1, PDGF-Rα, котранспортер фосфата-натрия, фосфатидилсерин, бета-рецептор тромбоцитарного фактора роста, клетки карциномы простаты, *Pseudomonas aeruginosa*, гликопротеин вируса бешенства, RANKL, респираторно-синцитиальный вирус, RHD, резус-фактор, RON, RTN4, склеростин, SDC1, селектин P, SLAMF7, SOST, сфингозин-1-фосфат, *Staphylococcus aureus*, STEAP1, TAG-72, Т-клеточный рецептор, TEM1, тенасцин С, TFPI, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β, TNF-α, TRAIL-R1, TRAIL-R2, опухолевый антиген STAA16.88, опухолеспецифичный гликозилированный MUC1, связанный с опухолями передатчик кальциевых сигналов 2, рецептор TWEAK, TYRP1 (гликопротеин 75), VEGFA, VEGFR1, VEGFR2, виментин и VWF.

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает Fc-область антитела, выбранного из группы, в которую входят: 20-(74)-(74) (милатузумаб, велтузумаб), 20-2b-2b, 3F8, 74-(20)-(20) (милатузумаб, велтузумаб), 8H9, A33, AB-16B5, абаговомаб, абциксимаб, абитузумаб, ABP 494 (биоаналог цетуксимаба), абрилумаб, АВТ-700, АВТ-806, актимаб-А (Ac-225 актиний-линтузумаб), актоксумаб, адалимумаб, ADC-1013, ADCT-301, ADCT-402, адекатумумаб, адуканумаб, афелимомаб, AFM13, афутузумаб, AGEN1884, AGS15E, AGS16C3F, AGS67E, алацизумаб-пегол, ALD518, алемтузумаб, алирокумаб, алтумомаб пентетат, аматуксимаб, AMG 228, AMG 820, анатумомаб мафенатокс, анетумаб рав-

тансин, анифролумаб, анрукинзумаб, APN301, APN311, аполизумаб, APX003/SIM-BD0801 (севацизумаб), APX005M, арцитумомаб, ARX788, аскринвакумаб, аселизумаб, ASG-15ME, атезолизумаб, атинумаб, ATL101, алтизумаб (также известен как тоцилизумаб), аторолимумаб, авелумаб, B-701, бапинеузумаб, базиликсимаб, бавитуксимаб, BAY1129980, BAY1187982, бектумомаб, бегеломаб, белимумаб, бенрализумаб, бертилимумаб, бесилесомаб, беталутин (¹⁷⁷Lu-тетраксетан-тегуломаб), бевацизумаб, BEVZ92 (биоаналог бевацизумаба), безлотоксумаб, BGB-A317, BИQ880, BИ 836880, BИ-505, бициромаб, бимагрумаб, бимекизумаб, биватузумаб мертансин, BИW-8962, блинатумомаб, блосозумаб, BMS-936559, BMS-986012, BMS-986016, BMS-986148, BMS-986178, BNC101, бокоцизумаб, брентуксимаб ведотин, BrevaRex, бриакинумаб, бродалумаб, бролуцизумаб, бронтиктузумаб, C2-2b-2b, канакинумаб, кантузумаб мертансин, кантузумаб равтанзин, каплацизумаб, капромаб пендетид, карлумаб, катумаксосомаб, иммуноконъюгат CBR96-доксорубицин, CBТ124 (бевацизумаб), CC-90002, CDX-014, CDX-1401, целелизумаб, цертолизумаб-пегол, цетуксимаб, CGEN-15001T, CGEN-15022, CGEN-15029, CGEN-15049, CGEN-15052, CGEN-15092, Ch.14.18, цитатузумаб богатокс, циксутумумаб, клазакизумаб, кленоликсимаб, кливатузумаб тетраксетан, CM-24, кодритузумаб, колтуксимаб равтансин, конатумумаб, концизумаб, Cotara (I-131 йод-дерлотуксимаб-биотин), cR6261, кренезумаб, DA-3111 (биоаналог трастузумаба), дацетузумаб, даклизумаб, далотузумаб, дапиролизумаб-пегол, даратумумаб, даратумумаб Enhance (даратумумаб), дарлейкин, дектрекумаб, демцизумаб, денингузумаб мафодотин, деносумаб, депатуксизумаб, депатуксизумаб мафодотин, дерлотуксимаб-биотин, детумомаб, DI-B4, динутуксимаб, диридавумаб, DKN-01, DMOT4039A, дорлимомаб аритокс, дрозитумаб, DS-1123, DS-8895, дулиготумаб, дупилумаб, дурвалумаб, дусигитумаб, экроексимаб, экулизумаб, эдобакомаб, эдреколомаб, эфализумаб, эфунгумаб, эдделумаб, элгемтумаб, элотузумаб, элсилимомаб, эмактузумаб, эмибетузумаб, энаватузумаб, энфортумаб ведотин, энлимомаб-пегол, эноблитузумаб, энокизумаб, энотикумаб, энситуксимаб, эпитумомаб цитуксетан, эпратузумаб, эрлизумаб, эртумаксосомаб, этарацизумаб, этролизумаб, эвинакумаб, эволокумаб, эксбивирумаб, фанолесомаб, фаралимомаб, фарлетузумаб, фасинумаб, FBTA05, фелвизумаб, фезакинумаб, FF-21101, конъюгат антитело-препарат FGFR2, Fibromun, фиклатузумаб, фигитумумаб, фиривумаб, фланвотумаб, флетикумаб, фонтолизумаб, форалумаб, форавирумаб, FPA144, фресолимумаб, FS102, фулранумаб, фугуксимаб, галиксимаб, ганитумаб, гангенерумаб, гавилимомаб, гемтузумаб озогамидин, герилимумаб, гевокизумаб, гирентуксимаб, глембатумумаб ведотин, GNR-006, GNR-011, голимумаб, гомиликсимаб, GSK2849330, GSK2857916, GSK3174998, GSK3359609, гуселкумаб, mAb Hu14.18K322A, hu3S193, Hu8F4, HuL2G7, HuMab-5B1, ибализумаб, ибритумомаб тиуксетан, икрукумаб, идаруцизумаб, IGN002, IGN523, иговомаб, IMAВ362, IMAВ362 (клаудиксимаб), ималумаб, IMC-CS4, IMC-D11, имциромаб, имгатузумаб, IMGN529, IMMU-102 (Y-90 иттрий-этратузумаб тетраксетан), IMMU-114, антагонистическое антитело ImmuTune IMP701, INCAGN1876, инклакумаб, INCSHR1210, индатуксимаб равтансин, индусатумаб ведотин, инфликсимаб, инолимомаб, инотузумаб озогамидин, интетумумаб, Iprafitcept, IPH4102, ипилимумаб, иратумумаб, изатуксимаб, истиратумаб, итолизумаб, иксекизумаб, JNJ-56022473, JNJ-61610588, келиксимаб, KTN3379, L191L2/L19TNF, лабетузумаб, лабетузумаб говитекан, LAG525, ламбролизумаб, лампализумаб, L-DOS47, лебриклизумаб, лемалесомаб, лензилумаб, лерделимумаб, лейкотуксимаб, лексатумумаб, либивирумаб, лифастузумаб ведотин, лигелизумаб, лилотомаб сатетраксетан, линтузумаб, лирилумаб, LKZ145, лоделцизумаб, локиветмаб, лорвотузумаб мертансин, лукадумумаб, лулизумаб-пегол, люмиликсимаб, люмретузумаб, LY3164530, мапатумумаб, маргетуксимаб, маслимомаб, мартузумаб, маврилимумаб, MB311, MCS-110, MEDI0562, MEDI-0639, MEDI0680, MEDI-3617, MEDI-551 (инебилизумаб), MEDI-565, MEDI6469, меполизумаб, метелимумаб, MGB453, MGD006/S80880, MGD007, MGD009, MGD011, милатузумаб, милатузумаб-SN-38, минретумомаб, мирветуксимаб соравтанзин, митумомаб, МК-4166, MM-111, MM-151, MM-302, могамулизумаб, MOR202, MOR208, MORAb-066, моролимумаб, мотавизумаб, моксетумомаб пасудотокс, муромонаб-CD3, наколомаб тафенатокс, намилумаб, наптумомаб эстафенатокс, нарнатумаб, натализумаб, небакумаб, нецитумумаб, немолизумаб, нерелимомаб, несвакумаб, нимотузумаб, ниволумаб, нофетумомаб мерпентан, NOV-10, обилтоксаксимаб, обинутузумаб, окаратузумаб, окрелизумаб, одулимомаб, офатумумаб, оларатумаб, олокизумаб, омализумаб, OMP-131R10, OMP-305B83, онартузумаб, онтуксизумаб, опицинумаб, опортузумаб монатокс, ореговомаб, ортикумаб, отеликсизумаб, отлертузумаб, OX002/MEN1309, окселумаб, озанезумаб, озорализумаб, пагибаксимаб, палилвизумаб, панитумумаб, панкомаб, PankoMab-GEX, панобакумаб, парсатузумаб, пасколизумаб, пасотуксизумаб, патеклизумаб, патритумаб, PAT-SC1, PAT-SM6, пембролизумаб, пемтумомаб, перакизумаб, пертузумаб, пекселизумаб, PF-05082566 (утомилумаб), PF-06647263, PF-06671008, PF-06801591, пидилизумаб, пинатузумаб ведотин, пинтумомаб, плакулумаб, полатузумаб ведотин, понезумаб, приликсимаб, притоксаксимаб, притумумаб, PRO 140, Proxinium, PSMA ADC, квиллизумаб, ракотумомаб, радретумаб, рафивирумаб, ралпанцизумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, рефанезумаб, регавирумаб, REGN1400, REGN2810/SAR439684, реслизумаб, RFM-203, RG7356, RG7386, RG7802, RG7813, RG7841, RG7876, RG7888, RG7986, рилотумумаб, ринукумаб, ритуксимаб, RM-1929, RO7009789, робатумумаб, роледумаб, ромозоумаб, ронтализумаб, ровелизумаб, руплизумаб, сацитузумаб говитекан, самализумаб, SAR 408701, SAR566658, сарилумаб, SAT 012, сатумомаб пендетид, SCT200, SCT400, SEA-CD40, секукинумаб, серибантумаб, сетоксаксимаб, севирумаб, SGN-CD19A, SGN-CD19B, SGN-CD33A, SGN-CD70A, SGN-LIV1A, сибротузумаб, сифалимумаб, силтукси-

маб, симтузумаб, сиплизумаб, сирукумаб, софитузумаб ведотин, соланезумаб, солитомаб, сонепцизумаб, сонтузумаб, стамулумаб, сулесомаб, сувизумаб, SYD985, SYM004 (футуксимаб и модотуксимаб), Sym015, TAB08, табалумаб, такатузумаб тетраксетан, тадоцизумаб, тализумаб, танезумаб, танибрирумаб, таплитумомаб паптокс, тарекстумаб, ТВ-403, тефибазумаб, Teleukin, теллимомаб аритокс, тенатумомаб, тенеликсимаб, теплизумаб, тепротумумаб, тесидолумаб, тетуломаб, TG-1303, TGN1412, конъюгат торий-227-эпратузумаб, тицилимумаб, тигатузумаб, тилдракизумаб, тисотумаб ведотин, TNX-650, тоцилизумаб, торализумаб, тосатоксумаб, тоситумомаб, товетумаб, тралокинумаб, трастузумаб, трастузумаб эмтансин, TRBS07, TRC105, трегализумаб, тремелимумаб, тревогрумаб, TRPH 011, TRX518, TSR-042, TTI-200.7, тукотузумаб целмолейкин, тувирумаб, U3-1565, U3-1784, ублитуксимаб, улокуплумаб, урелумаб, уртоксазумаб, устекинумаб, вадастуксимаб Talirine, вандортузумаб ведотин, вантуктумаб, вануцизумаб, вапаликсимаб, варлилумаб, вателизумаб, VB6-845, ведолизумаб, велтузумаб, вепалимомаб, весенкумаб, висилизумаб, волоциксимаб, ворсетузумаб мафодотин, вотумумаб, YYB-101, залутумумаб, занолимумаб, затуксимаб, зиралимумаб и золимомаб аритокс.

В некоторых воплощениях внеклеточная область содержит несколько взаимодействующих с антигеном доменов, каждый из которых проявляет связывание с одним и тем же или разными антигенами. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает антиген, выбранный из группы, в которую входят: биотинилированная молекула 707-AP, α -актинин-4, abl-bcr alb-b3 (b2a2), abl-bcr alb-b4 (b3a2), адипофилин, AFP, AIM-2, аннексин II, ART-4, BAGE, β -катенин, bcr-abl, bcr-abl p190 (e1a2), bcr-abl p210 (b2a2), bcr-abl p210 (b3a2), BING-4, CAG-3, CAIX, CAMEL, каспаза-8, CD171, CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44v7/8, CDC27, CDK-4, CEA, CLCA2, Cyp-B, DAM-10, DAM-6, DEK-CAN, EGFRvIII, EGP-2, EGP-40, ELF2, Ep-CAM, EphA2, EphA3, erb-B2, erb-B3, erb-B4, ES-ESO-1a, ETV6/AML, FBP, фетальный ацетилхолиновый рецептор, FGF-5, FN, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7B, GAGE-8, GD2, GD3, GnT-V, Gp100, gp75, Her-2, HLA-A* 0201-R170I, HMW-MAA, HSP70-2M, HST-2 (FGF6), HST-2/neu, hTERT, iCE, IL-11R α , IL-13R α 2, KDR, KIAA0205, K-RAS, молекула клеточной адгезии L1, LAGE-1, LDLR/FUT, Lewis Y, MAGE-1, MAGE-10, MAGE-12, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-6, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-B1, MAGE-B2, "яблочный" фермент, маммаглобин-A, MART-1/Melan-A, MART-2, MC1R, MCSF, мезотелин, MUC1, MUC16, MUC2, MUM-1, MUM-2, MUM-3, миозин, NA88-A, Neo-PAP, NKG2D, NPM/ALK, N-RAS, NY-ESO-1, OA1, OGT, онкофетальный антиген (h5T4), OS-9, полипептид P, P15, P53, PRAME, PSA, PSCA, PSMA, PTPRK, RAGE, ROR1, RU1, RU2, SART-1, SART-2, SART-3, SOX10, SSX-2, сурвивин, сурвивин-2B, SYT/SSX, TAG-72, TEL/AML1, TGF α RII, TGF β RII, TP1, TRAG-3, TRG, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TRP-2-6b, тирозиназа, VEGF-R2, WT1, α -фолатный рецептор и легкая к-цепь.

В некоторых воплощениях сигнальный домен иммунной клетки рецепторного полипептида включает первичный сигнальный домен, содержащий активационный мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITAM). В некоторых воплощениях сигнальный домен иммунной клетки рецепторного полипептида включает первичный сигнальный домен, содержащий ингибирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITIM). В некоторых воплощениях сигнальный домен иммунной клетки включает первичный сигнальный домен белка, выбранного из группы, в которую входят: рецептор Fc γ (Fc γ R), рецептор Fc ϵ (Fc ϵ R), рецептор Fc α (Fc α R), неонатальный Fc-рецептор (FcRn), CD3, CD3 ζ , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD4, CD5, CD8, CD21, CD22, CD28, CD32, CD40L (CD154), CD45, CD66d, CD79a, CD79b, CD80, CD86, CD278 (также известен как ICOS), CD247 ζ , CD247 η , DAP10, DAP12, FYN, LAT, Lck, MAPK, комплекс MHC, NFAT, NF- κ B, PLC- γ , iC3b, C3dg, C3d и Zap70. В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3 ζ . В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит активационный мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITAM) из CD3 ζ . В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит сигнальный домен Fc γ R. В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит сигнальный домен Fc γ R, выбранный из Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA (CD32), Fc γ RIIB (CD32), Fc γ RIIA (CD16a) и Fc γ RIIB (CD16b). В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит сигнальный домен Fc ϵ R. В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит сигнальный домен Fc ϵ R, выбранный из Fc ϵ RI и Fc ϵ RII (CD23). В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит сигнальный домен Fc α R. В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит сигнальный домен Fc α R, выбранный из Fc α RI (CD89) и Fc α / μ R.

В некоторых воплощениях сигнальный домен иммунной клетки включает костимулирующий домен. В некоторых воплощениях сигнальный домен иммунной клетки включает несколько костимулирующих доменов. В некоторых воплощениях костимулирующий домен включает сигнальный домен молекулы MHC класса I, белка рецептора TNF, иммуноглобулиноподобного белка, рецептора цитокинов, интегрина, сигнальной молекулы активации лимфоцитов (белка SLAM), активирующего рецептора NK-клеток или рецептора типа Toll. В некоторых воплощениях костимулирующий домен включает сигнальный домен молекулы, выбранной из группы, в которую входят 2B4/CD244/SLAMF4, 4-1BB/TNFSF9/CD137, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BAFF R/TNFRSF13C, BAFF/BLyS/TNFSF13B, BLAME/SLAMF8, BTLA/CD272, CD100 (SEMA4D), CD103, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD150, CD160 (BY55), CD18, CD19, CD2, CD200, CD229/SLAMF3, ли-

ганд CD27/TNFSF7, CD27/TNFRSF7, CD28, CD29, CD2F-10/SLAMF9, лиганд CD30/TNFSF8, CD30/TNFRSF8, CD300a/LMIR1, CD4, лиганд CD40/TNFSF5, CD40/TNFRSF5, CD48/SLAMF2, CD49a, CD49D, CD49f, CD53, CD58/LFA-3, CD69, CD7, CD8 α , CD8 β , CD82/Kai-1, CD84/SLAMF5, CD90/Thy1, CD96, CDS, CEACAM1, CRACC/SLAMF7, CRTAM, CTLA-4, DAP12, дектин-1/CLEC7A, DNAM1 (CD226), DPIV/CD26, DR3/TNFRSF25, EphB6, GADS, Gi24/VISTA/B7-H5, лиганд GTR/TNFSF18, GTR/TNFRSF18, HLA класса I, HLA-DR, HVEM/TNFRSF14, IA4, ICAM-1, ICOS/CD278, Ikaros, IL2R β , IL2R γ , IL7R α , α 4-интегрин/CD49d, интегрин α 4 β 1, интегрин α 4 β 7/LPAM-1, IPO-3, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB1, ITGB2, ITGB7, KIRDS2, LAG-3, LAT, LIGHT/TNFSF14, LTBR, Ly108, Ly9 (CD229), связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), α -лимфотоксин/TNF- β , NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), NTB-A/SLAMF6, лиганд OX40/TNFSF4, OX40/TNFRSF4, PAG/Cbp, PD-1, PDCD6, PD-L2/B7-DC, PSGL1, RELT/TNFRSF19L, SELPLG (CD162), SLAM (SLAMF1), SLAM/CD150, SLAMF4 (CD244), SLAMF6 (NTB-A), SLAMF7, SLP-76, TACI/TNFRSF13B, TCL1A, TCL1B, TIM-1/KIM-1/HAVER, TIM-4, TL1A/TNFSF15, TNF RII/TNFRSF1B, TNF- α , TRANCE/RANKL, TSLP, TSLPR, VLA1 и VLA-6. В некоторых воплощениях костимулирующий домен действует, регулируя пролиферативный сигнал и/или сигнал выживания в иммунных клетках.

В некоторых воплощениях рецептор содержит по меньшей мере один нацеливающий (targeting) пептид, который направляет транспортировку рецепторного полипептида в определенную область клетки. В некоторых воплощениях нацеливающий пептид направляет транспортировку рецепторного полипептида в ядро, митохондрии, эндоплазматический ретикулум (ER), хлоропласты, пероксисомы или плазматическую мембрану. В некоторых воплощениях нацеливающий пептид содержит сигнал ядерного экспорта (NES). В некоторых воплощениях нацеливающий пептид включает нацеливающий пептид для плазматической мембраны.

В некоторых воплощениях модификация рецептора включает химическую модификацию. В некоторых воплощениях химическая модификация включает фосфорилирование.

В некоторых воплощениях участок рецепторного связывания у химерного адаптерного полипептида содержит связывающий домен молекулы, выбранной из группы, в которую входят ABL1, ABL2, APBA1, APBA2, APBA3, BCAR3, BLK, BLNK, BMX, BTK, CHN2, CISH, CRK, CRKL, CSK, DAPP1, DOK1, DOK2, DOK3, DOK4, DOK5, DOK6, DOK7, EAT-2, EPS8, EPS8L1, EPS8L2, EPS8L3, FER, FES, FGR, FRK, FRS2, FRS3, FYN, GADS, GRAP, GRAP2, GRB10, GRB14, GRB2, GRB7, HCK, HSH2D, INPP5D, INPPL1, IRS1, IRS2, IRS3, IRS4, ITK, JAK2, LAT, LCK, LCP2, LYN, MATK, NCK1, NCK2, PIK3R1, PIK3R2, PIK3R3, PLCG1, PLCG2, PTK6, PTPN11, PTPN6, RASA1, SAP, SH2B1, SH2B2, SH2B3, SH2D1A, SH2D1B, SH2D2A, SH2D3A, SH2D3C, SH2D4A, SH2D4B, SH2D5, SH2D6, SH3BP2, SHB, SHC1, SHC2, SHC3, SHC4, SHD, SHE, SHP1, SHP2, SLA, SLA2, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6, SOCS7, SRC, SRMS, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6, SUPT6H, SYK, TEC, TENC1, TLN1, TLN2, TNS, TNS1, TNS3, TNS4, TXK, VAV1, VAV2, VAV3, YES1, ZAP70, X11a, их производные, варианты и фрагменты.

В некоторых воплощениях исполнительный элемент включает CRISPR-ассоциированный (Cas) полипептид, нуклеазу с цинковым пальцем (ZFN), связанные с "цинковым пальцем" полипептиды регуляции генов, эффекторную нуклеазу типа активатора транскрипции (TALEN), связанные с эффекторной нуклеазой типа активатора транскрипции полипептиды регуляции генов, мегануклеазу, природные главные факторы транскрипции, эпигенетические модифицирующие ферменты, рекомбиназу, флиппазу, транспозазу, РНК-связывающие белки (RBP), белок Argonaute, их производные, варианты или фрагменты. В некоторых воплощениях исполнительный элемент включает Cas-белок, а система дополнительно содержит направляющую РНК (гидРНК), которая образует комплекс с Cas-белком. В некоторых воплощениях исполнительный элемент включает RBP в комплексе с гидРНК, который способен образовывать комплекс с Cas-белком. В некоторых воплощениях гидРНК включает нацеливающий сегмент, который по последовательности по меньшей мере на 80% идентичен с полинуклеотидом-мишенью. В некоторых воплощениях Cas-белок практически не обладает активностью расщепления ДНК.

В некоторых воплощениях исполнительный элемент включает по меньшей мере один нацеливающий пептид, который направляет исполнительный элемент в определенный район клетки. В некоторых воплощениях нацеливающий пептид включает сигнал ядерной локализации (NLS).

В некоторых воплощениях модификация рецептора включает модификацию по нескольким сайтам модификации, причем каждый сайт модификации эффективно связывает химерный адаптерный полипептид и/или второй адаптерный полипептид.

В некоторых воплощениях сайт распознавания расщепления содержит полипептидную последовательность, а расщепляющий элемент обладает протеазной активностью.

В некоторых воплощениях исполнительный элемент после высвобождения из GMP связывается с полинуклеотидом-мишенью и регулирует экспрессию гена с полинуклеотида-мишени путем создания физических преград полинуклеотиду-мишени или привлечения дополнительных факторов для эффективного подавления или усиления экспрессии гена с полинуклеотида-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит активатор транскрипции для эффективного повышения экспрес-

сии гена с полинуклеотида-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит репрессор транскрипции для эффективного снижения экспрессии гена с полинуклеотида-мишени.

В некоторых воплощениях полинуклеотид-мишень содержит геномную ДНК. В некоторых воплощениях полинуклеотид-мишень содержит РНК. В некоторых воплощениях полинуклеотид-мишень содержит эндогенный ген или продукт эндогенного гена. В некоторых воплощениях эндогенный ген или продукт эндогенного гена кодирует цитокин. В некоторых воплощениях цитокин выбран из группы, в которую входят: 4-1BBL, активин β A, активин β B, активин β C, активин β E, артемин (ARTN), BAFF/BLyS/TNFSF138, BMP10, BMP15, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMPb, костный морфогенетический белок 1 (BMP1), CCL1/TCA3, CCL11, CCL12/MCP-5, CCL13/MCP-4, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17/TARC, CCL18, CCL19, CCL2/MCP-1, CCL20, CCL21, CCL22/MDC, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL3L3, CCL4, CCL4L1/LAG-1, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, CD153/CD30L/TNFSF8, CD40L/CD154/TNFSF5, CD40LG, CD70, CD70/CD27L/TNFSF7, CLCF1, c-MPL/CD110/TPOR, CNTF, CX3CL1, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17, CXCL2/MIP-2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7/Ppbb, CXCL9, EDA-A1, FAM19A1, FAM19A2, FAM19A3, FAM19A4, FAM19A5, лиганд Fas/FASLG/CD95L/CD178, GDF10, GDF11, GDF15, GDF2, GDF3, GDF4, GDF5, GDF6, GDF7, GDF8, GDF9, нейротрофический фактор из глиальных клеток (GDNF), фактор роста и дифференцировки 1 (GDF1), IFNA1, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA2, IFNA4, IFNA5/IFNaG, IFNA7, IFNA8, IFNB1, IFNE, IFNG, IFNZ, IFN ω /IFNW1, IL11, IL18, IL18BP, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F3/IL1RA, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL1RL2, IL31, IL33, IL6, IL8/CXCL8, ингибин-A, ингибин-B, лептин, LIF, LTA/TNFB/TNFSF1, LTB/TNFC, нейртулин (NRTN), OSM, OX-40L/TNFSF4/CD252, персефин (PSPN), RANKL/OPGL/TNFSF11 (CD254), TL1A/TNFSF15, TNFA, TNF-альфа/TNFA, TNFSF10/TRAIL/APO-2L (CD253), TNFSF12, TNFSF13, TNFSF14/LIGHT/CD258, XCL1 и XCL2. В некоторых воплощениях эндогенный ген или продукт эндогенного гена кодирует иммунорегуляторный белок. В некоторых воплощениях иммунорегуляторный белок выбран из группы, в которую входят: A2AR, B7.1, B7-H3/CD276, B7-H4/B7S1/B7x/Vtcl1, B7-H6, BTLA/CD272, CCR4, CD122, 4-1BB/CD137, CD27, CD28, CD40, CD47, CD70, CISH, CTLA-4/CD152, DR3, GITR, ICOS/CD278, IDO, KIR, LAG-3, OX40/CD134, PD-1/CD279, PD2, PD-L1, PD-L2, TIM-3 и VISTA/Dies1/Gi24/PD-1H (C10orf54). В некоторых воплощениях полинуклеотид-мишень содержит гетерологичный ген или продукт гетерологичного гена. В некоторых воплощениях гетерологичный ген или продукт гетерологичного гена кодирует дополнительный химерный полипептид трансмембранного рецептора. В некоторых воплощениях дополнительный химерный полипептид трансмембранного рецептора включает: (а) внеклеточную область, содержащую дополнительный взаимодействующий с антигеном домен, который связывает дополнительный антиген; и (б) костимулирующий домен. В некоторых воплощениях дополнительный взаимодействующий с антигеном домен выбран из группы, в которую входят: биотинилированная молекула 707-AP, α -актинин-4, abl-bcr alb-b3 (b2a2), abl-bcr alb-b4 (b3a2), адипофин, AFP, AIM-2, аннексин II, ART-4, BAGE, β -катенин, bcr-abl, bcr-abl p190 (e1a2), bcr-abl p210 (b2a2), bcr-abl p210 (b3a2), BING-4, CAG-3, CAIX, CAMEL, каспаза-8, CD171, CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44v7/8, CDC27, CDK-4, CEA, CLCA2, Cyp-B, DAM-10, DAM-6, DEK-CAN, EGFRvIII, EGP-2, EGP-40, ELF2, Eph-CAM, EphA2, EphA3, erb-B2, erb-B3, erb-B4, ES-ESO-1a, ETV6/AML, FBP, фетальный ацетилхолиновый рецептор, FGF-5, FN, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7B, GAGE-8, GD2, GD3, GnT-V, Gp100, gp75, Her-2, HLA-A* 0201-R170I, HMW-MAA, HSP70-2M, HST-2 (FGF6), HST-2/neu, hTERT, iCE, IL-11R α , IL-13R α 2, KDR, KIAA0205, K-RAS, молекула клеточной адгезии L1, LAGE-1, LDLR/FUT, Lewis Y, MAGE-1, MAGE-10, MAGE-12, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-6, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-B1, MAGE-B2, яблочный фермент, маммаглобин-A, MART-1/Melan-A, MART-2, MC1R, M-CSF, мезотелин, MUC1, MUC16, MUC2, MUM-1, MUM-2, MUM-3, мизин, NA88-A, Neo-PAP, NKG2D, NPM/ALK, N-RAS, NY-ESO-1, OA1, OGT, онкофетальный антиген (h5T4), OS-9, полипептид P, P15, P53, PRAME, PSA, PSCA, PSMA, PTPRK, RAGE, ROR1, RU1, RU2, SART-1, SART-2, SART-3, SOX10, SSX-2, сурвивин, сурвивин-2B, SYT/SSX, TAG-72, TEL/AML1, TGF β RII, TGF β RII, TP1, TRAG-3, TRG, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TRP-2-6b, тирозиназа, VEGF-R2, WT1, α -фолатный рецептор и легкая к-цепь. В некоторых воплощениях костимулирующий домен включает сигнальный домен молекулы, выбранной из группы, в которую входят: 2B4/CD244/SLAMF4, 4-1BB/TNFSF9/CD137, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BAFF R/TNFRSF13C, BAFF/BLyS/TNFSF13B, BLAME/SLAMF8, BTLA/CD272, CD100 (SEMA4D), CD103, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD150, CD160 (BY55), CD18, CD19, CD2, CD200, CD229/SLAMF3, лиганд CD27/TNFSF7, CD27/TNFRSF7, CD28, CD29, CD2F-10/SLAMF9, лиганд CD30/TNFSF8, CD30/TNFRSF8, CD300a/LMIR1, CD4, лиганд CD40/TNFSF5, CD40/TNFRSF5, CD48/SLAMF2, CD49a, CD49D, CD49f, CD53, CD58/LFA-3, CD69, CD7, CD8 α , CD8 β , CD82/Kai-1, CD84/SLAMF5, CD90/Thy1, CD96, CDS, CEACAM1, CRACC/SLAMF7, CRTAM, CTLA-4, DAP12, дектин-1/CXEC7A, DNAM1 (CD226), DPPIV/CD26, DR3/TNFRSF25, EphB6, GADS, Gi24/VISTA/B7-H5, лиганд GITR/TNFSF18, GITR/TNFRSF18, HLA класса I, HLA-DR, HVEM/TNFRSF14, IA4, ICAM-1, ICOS/CD278, Ikaros, IL2R β , IL2R γ , IL7R α , α 4-интегрин/CD49d, ин-

тегрин $\alpha\beta 1$, интегрин $\alpha\beta 7$ /LPAM-1, IPO-3, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB1, ITGB2, ITGB7, KIRDS2, LAG-3, LAT, LIGHT/TNFSF14, LTBR, Ly108, Ly9 (CD229), связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), α -лимфотоксин/TNF- β , NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), NTB-A/SLAMF6, лиганд OX40/TNFSF4, OX40/TNFRSF4, PAG/Cbp, PD-1, PDCD6, PD-L2/B7-DC, PSGL1, RELT/TNFRSF19L, SELPLG (CD162), SLAM (SLAMF1), SLAM/CD150, SLAMF4 (CD244), SLAMF6 (NTB-A), SLAMF7, SLP-76, TACI/TNFRSF13B, TCL1A, TCL1B, TIM-1/KIM-1/HAVCR, TIM-4, TL1A/TNFSF15, TNF RII/TNFRSF1B, TNF- α , TRANCE/RANKL, TSLP, TSLP R, VLA1 и VLA-6.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены лимфоциты, экспрессирующие любую приведенную здесь систему. В некоторых воплощениях лимфоциты отличаются тем, что исполнительный элемент высвобождается из GMP путем отщепления по сайту распознавания расщепления при связывании рецепторного полипептида с антигеном. В некоторых воплощениях высвобожденный исполнительный элемент образует комплекс с полинуклеотидом-мишенью в лимфоцитах.

В некоторых воплощениях образование комплекса исполнительного элемента с полинуклеотидом-мишенью приводит к повышающей регуляции экспрессии гена в лимфоцитах. В некоторых воплощениях ген представляет собой гетерологичный ген. В некоторых воплощениях гетерологичный ген кодирует дополнительный химерный полипептид трансмембранного рецептора. В некоторых воплощениях дополнительный химерный полипептид трансмембранного рецептора включает: (а) внеклеточную область, содержащую дополнительный взаимодействующий с антигеном домен, который связывает дополнительный антиген; и (b) костимулирующий домен. В некоторых воплощениях ген представляет собой эндогенный ген. В некоторых воплощениях эндогенный ген кодирует цитокин. В некоторых воплощениях цитокин выбран из группы, в которую входят: 4-1BBL, активин β A, активин β B, активин β C, активин β E, артемин (ARTN), BAFF/BLyS/TNFSF138, BMP10, BMP15, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, костный морфогенетический белок 1 (BMP1), CCL1/TCA3, CCL11, CCL12/MCP-5, CCL13/MCP-4, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17/TARC, CCL18, CCL19, CCL2/MCP-1, CCL20, CCL21, CCL22/MDC, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL3L3, CCL4, CCL4L1/LAG-1, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, CD153/CD30L/TNFSF8, CD40L/CD154/TNFSF5, CD40LG, CD70, CD70/CD27L/TNFSF7, CLCF1, c-MPL/CD110/TPOR, CNTF, CX3CL1, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17, CXCL2/MIP-2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7/Ppbb, CXCL9, EDA-A1, FAM19A1, FAM19A2, FAM19A3, FAM19A4, FAM19A5, лиганд Fas/FASLG/CD95L/CD178, GDF10, GDF11, GDF15, GDF2, GDF3, GDF4, GDF5, GDF6, GDF7, GDF8, GDF9, нейротрофический фактор из глиальных клеток (GDNF), фактор роста и дифференцировки 1 (GDF1), IFNA1, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA2, IFNA4, IFNA5/IFNaG, IFNA7, IFNA8, IFNB1, IFNE, IFNG, IFNZ, IFN ω /IFNW1, IL11, IL18, IL18BP, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F3/IL1RA, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL1RL2, IL31, IL33, IL6, IL8/CXCL8, ингибин-A, ингибин-B, лептин, LIF, LTA/TNFB/TNFSF1, LTB/TNFC, нейртулин (NRTN), OSM, OX-40L/TNFSF4/CD252, персефин (PSPN), RANKL/OPGL/TNFSF11 (CD254), TL1A/TNFSF15, TNFA, TNF-альфа/TNFA, TNFSF10/TRAIL/APO-2L (CD253), TNFSF12, TNFSF13, TNFSF14/LIGHT/CD258, XCL1 и XCL2.

В некоторых воплощениях образование комплекса исполнительного элемента с полинуклеотидом-мишенью приводит к понижающей регуляции экспрессии гена в лимфоцитах. В некоторых воплощениях ген представляет собой эндогенный ген. В некоторых воплощениях эндогенный ген кодирует иммунорегуляторный белок. В некоторых воплощениях иммунорегуляторный белок выбран из группы, в которую входят: A2AR, B7.1, B7-H3/CD276, B7-H4/B7S1/B7x/Vtcln1, B7-H6, BTLA/CD272, CCR4, CD122, 4-1BB/CD137, CD27, CD28, CD40, CD47, CD70, CISH, CTLA-4/CD152, DR3, GITR, ICOS/CD278, IDO, KIR, LAG-3, OX40/CD134, PD-1/CD279, PD2, PD-L1, PD-L2, TIM-3 и VISTA/Dies1/Gi24/PD-1H (C10orf54).

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрена популяция лимфоцитов, экспрессирующих любую приведенную здесь систему. В некоторых воплощениях популяция лимфоцитов отличается тем, что исполнительный элемент высвобождается из GMP путем отщепления по сайту распознавания расщепления при связывании рецепторного полипептида с антигеном.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ индуцирования гибели клеток мишени. Способ включает воздействие на клетки мишени лимфоцитов, экспрессирующих любую приведенную здесь систему. В некоторых воплощениях при воздействии лимфоцитов на клетки мишени рецепторный полипептид, экспрессируемый лимфоцитами, связывает антиген, содержащий антиген клеточной поверхности клеток мишени или антиген, секретируемый клетками мишени, причем связывание рецепторного полипептида с антигеном активирует цитотоксичность лимфоцитов, тем самым вызывая гибель клеток мишени. В некоторых воплощениях клетки мишени являются раковыми клетками. В некоторых воплощениях связывание рецепторного полипептида с антигеном активирует цитотоксичность лимфоцитов при высвобождении исполнительного элемента из GMP.

В некоторых воплощениях исполнительный элемент регулирует экспрессию с полинуклеотида-мишени путем создания физических преград полинуклеотиду-мишени или привлечения дополнительных факторов для эффективного подавления или усиления экспрессии гена с полинуклеотида-мишени. В не-

которых воплощениях исполнительный элемент содержит активатор транскрипции для эффективного повышения экспрессии гена с полинуклеотида-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит репрессор транскрипции для эффективного снижения экспрессии гена с полинуклеотида-мишени. В некоторых воплощениях полинуклеотид-мишень содержит геномную ДНК. В некоторых воплощениях полинуклеотид-мишень содержит РНК.

В некоторых воплощениях модификация рецептора включает фосфорилирование. В некоторых воплощениях модификация рецептора включает модификацию по нескольким сайтам модификации, причем каждый сайт модификации эффективно связывает химерный адаптерный полипептид.

В некоторых воплощениях исполнительный элемент включает CRISPR-ассоциированный полипептид (Cas), нуклеазу с "цинковым пальцем" (ZFN), связанные с "цинковым пальцем" полипептиды регуляции генов, эффекторную нуклеазу типа активатора транскрипции (TALEN), связанные с эффекторной нуклеазой типа активатора транскрипции полипептиды регуляции генов, мегануклеазу, природные главные факторы транскрипции, эпигенетические модифицирующие ферменты, рекомбиназу, флиппазу, транспозазу, РНК-связывающие белки (RBP), белок Argonaute, их производные, варианты или фрагменты. В некоторых воплощениях исполнительный элемент включает Cas-белок, который образует комплекс с направляющей РНК (гидРНК). В некоторых воплощениях исполнительный элемент включает RBP в комплексе с направляющей РНК (гидРНК), который способен образовывать комплекс с Cas-белком. В некоторых воплощениях Cas-белок практически не обладает активностью расщепления ДНК.

В некоторых воплощениях сайт распознавания расщепления содержит полипептидную последовательность, а расщепляющий элемент обладает протеазной активностью.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен химерный полипептид трансмембранного рецептора. Химерный полипептид трансмембранного рецептора включает: (а) внеклеточную область, содержащую взаимодействующий с антигеном домен, который связывает антиген, и (b) внутриклеточную область, содержащую сигнальный домен иммунной клетки; а также ген-модулирующий полипептид (GMP), соединенный с сигнальным доменом иммунной клетки, причем GMP содержит исполнительный элемент, соединенный с доменом отщепления пептида; причем при связывании антигена со внеклеточной областью исполнительный элемент высвобождается из GMP путем отщепления на домене отщепления пептида.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен химерный полипептид трансмембранного рецептора. Химерный полипептид трансмембранного рецептора включает (а) внеклеточную область, содержащую взаимодействующий с антигеном домен, который связывает антиген, и (b) внутриклеточную область, содержащую сигнальный домен иммунной клетки; и исполнительный элемент, соединенный с сигнальным доменом иммунной клетки через домен отщепления пептида; причем при связывании антигена со внеклеточной областью исполнительный элемент высвобождается из рецептора путем отщепления на домене отщепления пептида.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ условной регуляции лимфоцитов. Способ включает контактирование лимфоцитов, экспрессирующих любую приведенную здесь систему, с антигеном, который связывается со взаимодействующим с антигеном доменом химерного полипептида трансмембранного рецептора, причем контактирование вызывает активацию или дезактивацию активности иммунных клеток, при этом происходит условная регуляция лимфоцитов. В некоторых воплощениях активность иммунных клеток выбрана из группы, состоящей из клональной экспансии лимфоцитов; высвобождения цитокинов лимфоцитами; цитотоксичности лимфоцитов; пролиферации лимфоцитов; дифференцировки, дедифференцировки или трансдифференцировки лимфоцитов; перемещения и/или транспортировки лимфоцитов; истощения и/или реактивации лимфоцитов; и высвобождения других межклеточных молекул, метаболитов, химических соединений или их комбинаций лимфоцитами. В некоторых воплощениях при связывании антигена со взаимодействующим с антигеном доменом рецепторного полипептида из GMP высвобождается исполнительный элемент для осуществления активации или дезактивации.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен химерный адаптерный полипептид. Химерный адаптерный полипептид включает (а) участок рецепторного связывания, который связывается с рецептором, подвергшимся модификации при связывании с антигеном, причем данный рецептор содержит сигнальный домен иммунной клетки; и (b) ген-модулирующий полипептид (GMP), соединенный с участком рецепторного связывания; причем GMP содержит исполнительный элемент, соединенный с сайтом распознавания расщепления; причем при связывании участка рецепторного связывания с рецептором, подвергшимся модификации, исполнительный элемент высвобождается из GMP путем отщепления на сайте распознавания расщепления. В некоторых воплощениях участок рецепторного связывания содержит домен связывания из молекулы, выбранной из группы, состоящей из ABL1, ABL2, APBA1, APBA2, APBA3, BCAR3, BLK, BLNK, BMX, BTK, CHN2, CISH, CRK, CRKL, CSK, DAPP1, DOK1, DOK2, DOK3, DOK4, DOK5, DOK6, DOK7, EAT-2, EPS8, EPS8L1, EPS8L2, EPS8L3, FER, FES, FGR, FRK, FRS2, FRS3, FYN, GADS, GRAP, GRAP2, GRB10, GRB14, GRB2, GRB7, HCK, HSH2D, INPP5D, INPPL1, IRS1, IRS2, IRS3, IRS4, ITK, JAK2, LAT, LCK, LCP2, LYN, MATK, NCK1, NCK2, PIK3R1, PIK3R2, PIK3R3, PLCG1, PLC2, SH2D3A, SH2D3C, SH2D4A, SH2D4B, SH2D5, SH2D6, SH3BP2, SHB,

SHC1, SHC2, SHC3, SHC4, SHD, SH2D3A, SH2D1B, SH2D2A, SH2D3A, SH2D3A, SH2D3A, SH2D3C, SH2D4A, SH2D4B, SH2D5, SH2D6, SH3BP2, SHC3, SHC4, SHE, SHP1, SHP2, SLA, SLA2, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6, SOCS7, SRC, SRMS, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6, SUPT6H, SYK, TEC, TENC1, TLN1, TLN2, TNS, TNS1, TNS3, TNS4, TXK, VAV1, VAV2, VAV3, YES1, ZAP70, X11a, их производных, вариантов и фрагментов.

В некоторых воплощениях химерный адаптерный полипептид включает по меньшей мере один нацеливающий пептид, который направляет транспорт химерного адаптерного полипептида в определенный район клетки. В некоторых воплощениях нацеливающий пептид направляет транспорт химерного адаптерного полипептида в ядро, цитоплазму, митохондрии, эндоплазматический ретикулум (ER), хлоропласты, апопласты, пероксисомы или плазматическую мембрану.

В некоторых воплощениях нацеливающий пептид содержит сигнал ядерного экспорта (NES). В некоторых воплощениях NES соединяется с N-концом химерного адаптерного полипептида. В некоторых воплощениях нацеливающий пептид включает нацеливающий пептид для плазматической мембраны.

В некоторых воплощениях нацеливающий пептид соединяется с исполнительным элементом. В некоторых воплощениях нацеливающий пептид содержит сигнал ядерной локализации (NLS). В некоторых воплощениях нацеливающий пептид, содержащий NLS, соединяется с N-концом или C-концом исполнительного элемента. В некоторых воплощениях содержащий NLS нацеливающий пептид, соединенный с исполнительным элементом, направляет транспорт исполнительного элемента в ядро клетки после высвобождения исполнительного элемента из GMP при отщеплении по сайту распознавания расщепления.

В некоторых воплощениях исполнительный элемент включает CRISPR-ассоциированный (Cas) полипептид, нуклеазу с "цинковым пальцем" (ZFN), связанные с "цинковым пальцем" полипептиды регуляции генов, эффекторную нуклеазу типа активатора транскрипции (TALEN), связанные с эффекторной нуклеазой типа активатора транскрипции полипептиды регуляции генов, мегануклеазу, природные главные факторы транскрипции, эпигенетические модифицирующие ферменты, рекомбиназу, флиппазу, транспозазу, РНК-связывающие белки (RBP), белок Argonaute, их производные, варианты или фрагменты. В некоторых воплощениях исполнительный элемент включает Cas-белок, который образует комплекс с направляющей РНК (гидРНК). В некоторых воплощениях исполнительный элемент включает RBP, необязательно в комплексе с направляющей РНК, который способен образовывать комплекс с Cas-белком. В некоторых воплощениях Cas-белок практически не обладает активностью расщепления ДНК.

В некоторых воплощениях исполнительный элемент регулирует экспрессию гена путем создания физических преград полинуклеотиду-мишени или привлечения дополнительных факторов для эффективного подавления или усиления экспрессии с полинуклеотида-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит активатор транскрипции для эффективного повышения экспрессии с полинуклеотида-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит репрессор транскрипции для эффективного снижения экспрессии с полинуклеотида-мишени.

В некоторых воплощениях сайт распознавания расщепления фланкирован элементом рецепторного связывания и исполнительным элементом. В некоторых воплощениях сайт распознавания расщепления содержит последовательность распознавания расщепления, которая распознается протеазой. В некоторых воплощениях сайт распознавания расщепления содержит несколько последовательностей распознавания расщепления, причем каждая последовательность распознавания расщепления распознается одной и той же или разными протеазами. В некоторых воплощениях последовательность распознавания расщепления распознается протеазой, выбранной из группы, в которую входят ахромопептидаза, аминоксипептидаза, анкрод, ангиотензин-превращающий фермент, бромелаин, кальпаин, кальпаин I, кальпаин II, карбоксипептидаза А, карбоксипептидаза В, карбоксипептидаза G, карбоксипептидаза Р, карбоксипептидаза W, карбоксипептидаза Y, каспаза 1, каспаза 2, каспаза 3, каспаза 4, каспаза 5, каспаза 6, каспаза 7, каспаза 8, каспаза 9, каспаза 10, каспаза 11, каспаза 12, каспаза 13, катепсин В, катепсин С, катепсин D, катепсин Е, катепсин G, катепсин Н, катепсин L, химопапаин, химаза, химотрипсин, кластрипаин, коллагеназа, комплемент C1g, комплемент C1s, фактор D комплемента, фактор I комплемента, кукумизин, дипептидилпептидаза IV, эластаза (лейкоцитарная), эластаза (панкреатическая), эндопротеиназа Arg-C, эндопротеиназа Asp-N, эндопротеиназа Glu-C, эндопротеиназа Lys-C, энтерокиназа, фактор Ха, фицин, фурин, гранзим А, гранзим В, протеаза ВИЧ, IG-аза, тканевой калликреин, лейцин-аминопептидаза (общая), лейцин-аминопептидаза (цитозольная), лейцин-аминопептидаза (микросомальная), матриксная металлопротеаза, метионин-аминопептидаза, нейтраза, папаин, пепсин, плазмин, пролидаза, проназа Е, простатоспецифичный антиген, алкалофильная протеаза из *Streptomyces griseus*, протеаза *Aspergillus*, протеаза из *Aspergillus saitoi*, протеаза из *Aspergillus sojae*, протеаза *B. licheniformis* (щелочная или алкалаза), протеаза из *Bacillus polymyxa*, протеаза из *Bacillus sp.*, протеаза из *Rhizopus sp.*, протеаза S, протеасомы, протеиназа из *Aspergillus oryzae*, протеиназа 3, протеиназа А, протеиназа К, белок С, пироглутамат-аминопептидаза, ренин, реннин, стрептокиназа, субтилизин, термолизин, тромбин, активатор тканевого плазминогена, трипсин, триптаза и урокиназа.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен химерный полипептид трансмембранного рецептора. Химерный полипептид трансмембранного рецептора включает (а) внеклеточную область, содержащую взаимодействующий с антигеном домен, который связывает антиген, и (b) внутриклеточ-

ную область, содержащую сигнальный домен иммунной клетки; и ген-модулирующий полипептид (GMP), соединенный с сигнальным доменом иммунной клетки, причем GMP содержит исполнительный элемент, соединенный с сайтом распознавания расщепления; причем при связывании антигена со внеклеточной областью исполнительный элемент высвобождается из GMP путем отщепления по сайту распознавания расщепления.

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает мембраносвязанный антиген. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает антиген, который не связан с мембраной. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает антитело. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает, по меньшей мере, Fc-область, Fv-область, тяжелую цепь или легкую цепь антитела. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает Fc-область антитела.

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен содержит, по меньшей мере, Fab, одноцепочечный Fv (scFv), внеклеточный домен рецептора или Fc-связывающий домен. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен содержит Fc-связывающий домен, содержащий Fc-рецептор или какой-либо его фрагмент. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен содержит Fc-связывающий домен, включающий FcγRI (CD64), FcγRIa, FcγRIb, FcγRIc, FcγRIIA (CD32), FcγRIIA (CD32, H131), FcγRIIA (CD32, R131), FcγRIIB (CD32), FcγRIIB-1, FcγRIIB-2, FcγRIIA (CD16a, V158), FcγRIIA (CD16a, F158), FcγRIIB (CD16b, FcγRIIB-NA1), FcγRIIB (CD16b, FcγRIIB-NA2), FcεRI, FcεRII (CD23), FcαRI (CD89), Fcα/μR, FcRn, его производное, вариант или фрагмент. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает антиген, включающий антитело, которое в свою очередь связывает антиген, выбранный из группы, в которую входят: β-амилоид 1-40, 4-1BB, 5AC, 5T4, киназа-1 типа рецептора активина, ACVR2B, антиген аденокарциномы, AGS-22M6, альфа-фетопротеин, ангиопозтин 2, ангиопозтин 3, сибиреязвенный токсин, AOC3 (VAP-1), B7-H3, токсин *Bacillus anthracis*, BAFF, бета-амилоид, клетки В-лимфомы, антиген C242, C5, CA-125, IL31 собаки (*Canis lupus familiaris*), карбоангидраза 9 (CA-IX), сердечный миозин, CCL11 (эотаксин-1), CCR4, CCR5, CD11, CD18, CD125, CD140a, CD147 (базигин), CD15, CD152, CD154 (CD40L), CD19, CD2, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23 (рецептор IgE), CD25 (α-цепь рецептора IL-2), CD27, CD274, CD28, CD3, CD3-эпсилон, CD30, CD33, CD37, CD38, CD4, CD40, лиганд CD40, CD41, CD44 v6, CD5, CD51, CD52, CD56, CD6, CD70, CD74, CD79B, CD80, CEA, родственный CEA антиген, CFD, ch4D5, CLDN18.2, *Clostridium difficile*, фактор слипания A, CSF1R, CSF2, CTLA-4, рецептор-4 хемокинов типа C-X-C, цитомегаловирус, гликопротеин В цитомегаловируса, дабигатран, DLL4, DPP4, DR5, шигатоксин *E. coli* 1 типа, шигатоксин *E. coli* 2 типа, EGFL7, EGFR, эндотоксин, EpCAM, эписиалин, ERBB3, *Escherichia coli*, F-белок респираторно-синцитиального вируса, FAP, бета-цепь фибрина II, дополнительный домен-В фибронектина, фолатгидролаза, рецептор фолата 1, альфа-рецептор фолата, рецептор Frizzled, ганглиозид GD2, GD2, ганглиозид GD3, глипикан 3, α-цепь рецептора GMCSF, GPNMB, фактор роста и дифференцировки 8, GUCY2C, гемагглютинин, поверхностный антиген гепатита В, вирус гепатита В, FIERI, HER2/neu, HER3, HGF, HNGFR, гистоновый комплекс, HIV-1, ULA-DR, HNGF, Hsp90, киназа рецептора фактора роста гепатоцитов (scatter factor) человека, TNF человека, бета-амилоид человека, ICAM-1 (CD54), IFN-α, IFN-γ, IgE, Fc-область IgE, рецептор IGF-1, IGF-1, IGHE, IL 17A, IL 17F, IL 20, IL-12, IL-13, IL-17, IL-1β, IL-22, IL-23, IL-31RA, IL-4, IL-5, IL-6, рецептор IL-6, IL-9, IGF2, гемагглютинин вируса гриппа А, рецептор инсулиноподобного фактора роста I, интегрин α4β7, α4-интегрин, интегрин α5β1, интегрин α7β7, интегрин αIIbβ3, интегрин αvβ3, рецептор α/β-интерферона, индуцируемый γ-интерфероном белок, ITGA2, ITGB2 (CD18), KIR2D, антиген Lewis-Y, LFA-1 (CD11a), LINGO-1, липотейхоевая кислота, LOXL2, L-селектин (CD62L), LTA, MCP-1, мезотелин, MIF, MS4A1, MSLN, MUC1, CanAg муцина, связанный с миелином гликопротеин, миостатин, NCA-90 (антиген гранулоцитов), регулируемая апоптозом невральной протеиназа 1, NGF, N-гликолилнейраминавая кислота, NOGO-A, рецептор Notch, NRP1, *Oryctolagus cuniculus*, OX-40, oxLDL, PCSK9, PD-1, PDCD1, PDGF-Rα, котранспортер фосфата-натрия, фосфатидилсерин, бета-рецептор тромбоцитарного фактора роста, клетки карциномы простаты, *Pseudomonas aeruginosa*, гликопротеин вируса бешенства, RANKL, респираторно-синцитиальный вирус, RHD, резус-фактор, RON, RTN4, склеростин, SDC1, селектин P, SLAMF7, SOST, сфингозин-1-фосфат, *Staphylococcus aureus*, STEAP1, TAG-72, T-клеточный рецептор, TEM1, тенасцин С, TFPI, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β, TNF-α, TRAIL-R1, TRAIL-R2, опухолевый антиген STAA16.88, опухолеспецифичный гликозилированный MUC1, связанный с опухолями передатчик кальциевых сигналов 2, рецептор TWEAK, TYRP1 (гликопротеин 75), VEGFA, VEGFR1, VEGFR2, виментин и VWF.

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает Fc-область антитела, выбранного из группы, в которую входят: 20-(74)-(74) (милагузумаб, велтузумаб), 20-2b-2b, 3F8, 74-(20)-(20) (милагузумаб, велтузумаб), 8H9, A33, AB-16B5, абаговомаб, абциксимаб, абитузумаб, ABP 494 (биоаналог цетуксимаба), абрилумаб, АВТ-700, АВТ-806, актимаб-А (Ac-225 актиний-линтузумаб), актоксумаб, адалимумаб, ADC-1013, ADCT-301, ADCT-402, адекватумаб, адуканумаб, афелимомаб, AFM13, афутузумаб, AGEN1884, AGS15E, AGS16C3F, AGS67E, алацизумаб-пегол, ALD518, алемтузумаб, алирокумаб, алтумомаб пентетат, аматуксимаб, AMG 228, AMG 820, анатумомаб мафенатокс, ане-

тумаб равтансин, анифролумаб, анрукинзумаб, APN301, APN311, аполизумаб, APX003/SIM-BD0801 (севацизумаб), APX005M, арцитумомаб, ARX788, аскринвакумаб, аселизумаб, ASG-15ME, атезолизумаб, атинумаб, ATL101, алтизумаб (также известен как тоцилизумаб), аторолимумаб, авелумаб, B-701, бапинеузумаб, базиликсимаб, бавитуксимаб, BAY1129980, BAY1187982, бектумомаб, бегеломаб, белимумаб, бенрализумаб, бертилимумаб, бесилесомаб, беталутин (¹⁷⁷Lu-тетраксетан-тетуломаб), бевацизумаб, BEVZ92 (биоаналог бевацизумаба), безлтоксумаб, BGB-A317, BИQ880, BИ 836880, BИ-505, бициромаб, бимагрумаб, бимекизумаб, биватузумаб мертансин, BИW-8962, блинатумомаб, блосозумаб, BMS-936559, BMS-986012, BMS-986016, BMS-986148, BMS-986178, BNC101, бокоцизумаб, брентуксимаб ведотин, BrevaRex, бриакинумаб, бродалумаб, бролуцизумаб, бронтиктузумаб, C2-2b-2b, канакинумаб, кантузумаб мертансин, кантузумаб равтанзин, каплацизумаб, капромаб пендетид, карлумаб, катумаксомаб, иммуноконъюгат CBR96-доксорубин, CBT124 (бевацизумаб), CC-90002, CDX-014, CDX-1401, целелизумаб, цертолизумаб-пегол, цетуксимаб, CGEN-15001T, CGEN-15022, CGEN-15029, CGEN-15049, CGEN-15052, CGEN-15092, Ch.14.18, цитатузумаб богатокс, циксутумумаб, клазакизумаб, кленоликсимаб, кливатузумаб тетраксетан, CM-24, кодритузумаб, колтуксимаб равтансин, конатумумаб, концизумаб, Cotaга (I-131 йод-дерлотуксимаб-биотин), cR6261, кренезумаб, DA-3111 (биоаналог трастуумаба), дацетузумаб, даклизумаб, далотузумаб, дапиролизумаб-пегол, даратумумаб, даратумумаб Enhance (даратумумаб), дарлейкин, дектрекумаб, демцизумаб, денинтузумаб мафодотин, деносумаб, депатуксизумаб, депатуксизумаб мафодотин, дерлотуксимаб-биотин, детумомаб, DI-B4, динутуксимаб, диридавумаб, DKN-01, DMOT4039A, дорлимомаб аритокс, дрозитумаб, DS-1123, DS-8895, дулиготумаб, дупилумаб, дурвалумаб, дусигитумаб, экроексимаб, экулизумаб, эдобакомаб, эдреколомаб, эфализумаб, эфунгумаб, эдделумаб, элгемтумаб, элотузумаб, элсилимомаб, эмактузумаб, эмибетузумаб, энаватузумаб, энфортумаб ведотин, энлимомаб-пегол, эноблитузумаб, энокизумаб, энотикумаб, энситуксимаб, эпитумомаб цитуксетан, эпратузумаб, эрлизумаб, эртумаксомаб, этарацизумаб, этролизумаб, эвинакумаб, эволокумаб, экбивирумаб, фанолесомаб, фаралимомаб, фарлетузумаб, фасинумаб, FBTA05, фелвизумаб, фезакинумаб, FF-21101, конъюгат антители-препарат FGFR2, Fibromun, фиклатузумаб, фигитумумаб, фиривумаб, фланвотумаб, флетикумаб, фонтолизумаб, форалумаб, форавирумаб, FPA144, фресолимумаб, FS102, фулранумаб, фугуксимаб, галиксимаб, ганитумаб, гангенерумаб, гавилимомаб, гемтузумаб озогамидин, герилимумаб, гевокизумаб, гирентуксимаб, глембатумумаб ведотин, GNR-006, GNR-011, голимумаб, гомиликсимаб, GSK2849330, GSK2857916, GSK3174998, GSK3359609, гуселкумаб, mAb Hu14.18K322A, hu3S193, Hu8F4, HuL2G7, HuMab-5B1, ибализумаб, ибритумомаб тиуксетан, икрукумаб, идаруцизумаб, IGN002, IGN523, иговомаб, IMAV362, IMAV362 (клаудиксимаб), ималумаб, IMC-CS4, IMC-D11, имциромаб, имгатузумаб, IMG529, IMM-102 (Y-90 иттрий-этратузумаб тетраксетан), IMM-114, антагонистическое антитело ImmuTune IMP701, INCAGN1876, инклакумаб, INCSHR1210, индатуксимаб равтансин, индусатумаб ведотин, инфликсимаб, инолимомаб, инотузумаб озогамидин, интетумумаб, Itrafi-sept, IPH4102, ипилимумаб, иратумумаб, исатуксимаб, истиратумаб, итолизумаб, иксекизумаб, JNJ-56022473, JNJ-61610588, келиксимаб, KTN3379, L191L2/L19TNF, лабетузумаб, лабетузумаб говитекан, LAG525, ламбролизумаб, лампализумаб, L-DOS47, либрикизумаб, лемалесомаб, лензилумаб, лерделимумаб, лейкотуксимаб, лексатумумаб, либивирумаб, лифастузумаб ведотин, лигелизумаб, лилотомаб сатетраксетан, линтузумаб, лирилумаб, LKZ145, лоделцизумаб, локиветмаб, лорвотузумаб мертансин, лука-тумумаб, лулизумаб-пегол, люмиликсимаб, люмретузумаб, LY3164530, мапатумумаб, маргетуксимаб, маслимомаб, мартузумаб, маврилимумаб, MB311, MCS-110, MEDI0562, MEDI-0639, MEDI0680, MEDI-3617, MEDI-551 (инебилизумаб), MEDI-565, MEDI6469, меполизумаб, метелимумаб, MGB453, MGD006/S80880, MGD007, MGD009, MGD011, милатузумаб, милатузумаб-SN-38, минретумомаб, мирветуксимаб соравтанзин, митумомаб, МК-4166, MM-111, MM-151, MM-302, могамулизумаб, MOR202, MOR208, MORAb-066, моролимумаб, мотавизумаб, моксетумомаб пасудотокс, муромонаб-CD3, наколомаб тафенатокс, намилумаб, наптумомаб эстафенатокс, нарнатумаб, натализумаб, небакумаб, нецитумумаб, немолизумаб, нерелимомаб, несвакумаб, нимотузумаб, ниволумаб, нофетумомаб мерпентан, NOV-10, обилтоксаксимаб, обинутузумаб, окаратузумаб, окрелизумаб, одулимомаб, офатумумаб, оларатумаб, олокизумаб, омализумаб, OMP-131R10, OMP-305B83, онартузумаб, онтуксизумаб, опицинумаб, опортузумаб монатокс, ореговомаб, ортикумаб, отеликсизумаб, отлртузумаб, OX002/MEN1309, окселумаб, озанезумаб, озорализумаб, пагибаксимаб, паливизумаб, панитумумаб, панкомаб, PankoMab-GEX, панобакумаб, парсатузумаб, пасколизумаб, пасотуксизумаб, патеклизумаб, патритумаб, PAT-SC1, PAT-SM6, пембролизумаб, пемтумомаб, перакизумаб, пертузумаб, пекселизумаб, PF-05082566 (утомилумаб), PF-06647263, PF-06671008, PF-06801591, пидилизумаб, пинатузумаб ведотин, пинтумомаб, плакулумаб, полатузумаб ведотин, понезумаб, приликсимаб, притоксаксимаб, притумумаб, PRO 140, Proxinium, PSMA ADC, квиллизумаб, ракотумомаб, радретумаб, рафивирумаб, ралпанцизумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, рефанезумаб, регавирумаб, REGN1400, REGN2810/SAR439684, реслизумаб, RFM-203, RG7356, RG7386, RG7802, RG7813, RG7841, RG7876, RG7888, RG7986, рилотумумаб, ринукумаб, ритуксимаб, RM-1929, RO7009789, робатумумаб, роледумаб, ромозумаб, ронтализумаб, ровелизумаб, руплизумаб, сацитузумаб говитекан, самализумаб, SAR 408701, SAR566658, сарилумаб, SAT 012, сатумомаб пендетид, SCT200, SCT400, SEA-CD40, секукинумаб, серибантумаб, сетоксаксимаб, севирумаб, SGN-CD19A, SGN-CD19B, SGN-CD33A, SGN-CD70A, SGN-LIV1A, сибротузумаб, сифалимумаб, силтукси-

маб, симтузумаб, сиплизумаб, сирукумаб, софитузумаб ведотин, соланезумаб, солитомаб, сонепцизумаб, сонтузумаб, стамулумаб, сулесомаб, сувизумаб, SYD985, SYM004 (футуксимаб и модотуксимаб), Sym015, TAB08, табалумаб, такатузумаб тетракетан, тадоцизумаб, тализумаб, танезумаб, танибирумаб, таплитумомаб паптокс, тарекстумаб, ТВ-403, тефибазумаб, Teleukin, теллимомаб аритокс, тенатумомаб, тенеликсимаб, теплизумаб, тепротумумаб, тесидолумаб, тетуломаб, TG-1303, TGN1412, конъюгат торий-227-эпратузумаб, тицилимумаб, тигатузумаб, тилдракизумаб, тисотумаб ведотин, TNX-650, тоцилизумаб, торализумаб, тосатоксумаб, тоситумомаб, товетумаб, тралокинумаб, трастузумаб, трастузумаб эмтансин, TRBS07, TRC105, трегализумаб, тремелимумаб, тревогрумаб, TRPH 011, TRX518, TSR-042, TTI-200.7, тукотузумаб целмолейкин, тувирумаб, U3-1565, U3-1784, ублитуксимаб, улокуплумаб, урелумаб, уртоксазумаб, устекинумаб, вадастуксимаб Talirine, вандортузумаб ведотин, вантуктумаб, вануцизумаб, вапаликсимаб, варлилумаб, вателизумаб, VB6-845, ведолизумаб, велтузумаб, вепалимомаб, весенкумаб, висилизумаб, волоциксимаб, ворсетузумаб мафодотин, вотумумаб, YYB-101, залутумумаб, занолимумаб, затуксимаб, зиралимумаб и золимомаб аритокс.

В некоторых воплощениях внеклеточная область содержит несколько взаимодействующих с антигеном доменов, каждый из которых проявляет связывание с одним и тем же или разными антигенами.

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает антиген, выбранный из группы, в которую входят: биотинилированная молекула 707-AP, а-актинин-4, abl-bcr alb-b3 (b2a2), abl-bcr alb-b4 (b3a2), адипофилин, AFP, AIM-2, аннексии II, ART-4, BAGE, β -катенин, bcr-abl, bcr-abl p190 (e1a2), bcr-abl p210 (b2a2), bcr-abl p210 (b3a2), BING-4, CAG-3, CAIX, CAMEL, каспаза-8, CD171, CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44v7/8, CDC27, CDK-4, CEA, CLCA2, Cyp-B, DAM-10, DAM-6, DEK-CAN, EGFRvIII, EGP-2, EGP-40, ELF2, Ep-CAM, EphA2, EphA3, erb-B2, erb-B3, erb-B4, ES-ESO-1a, ETV6/AML, FBP, фетальный ацетилхолиновый рецептор, FGF-5, FN, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7B, GAGE-8, GD2, GD3, GnT-V, Gp100, gp75, Her-2, HLA-A*0201-R170I, HMW-MAA, HSP70-2M, HST-2 (FGF6), HST-2/neu, hTERT, iCE, IL-11R α , IL-13R α 2, KDR, KIAA0205, K-RAS, молекула клеточной адгезии L1, LAGE-1, LDLR/FUT, Lewis Y, MAGE-1, MAGE-10, MAGE-12, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-6, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-B1, MAGE-B2, "яблочный" фермент, маммаглобин-A, MART-1/Melan-A, MART-2, MC1R, M-CSF, мезотелин, MUC1, MUC16, MUC2, MUM-1, MUM-2, MUM-3, миозин, NA88-A, Neo-PAP, NKG2D, NPM/ALK, N-RAS, NY-ESO-1, OA1, OGT, онкофетальный антиген (h5T4), OS-9, полипептид P, P15, P53, PRAME, PSA, PSCA, PSMA, PTPRK, RAGE, ROR1, RU1, RU2, SART-1, SART-2, SART-3, SOX10, SSX-2, сурвивин, сурвивин-2B, SYT/SSX, TAG-72, TEL/AML1, TGF α RII, TGF β RII, TP1, TRAG-3, TRG, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TRP-2-6b, тирозиназа, VEGF-R2, WT1, α -фолатный рецептор и легкая к-цепь. В некоторых воплощениях сигнальный домен иммунной клетки включает первичный сигнальный домен, содержащий активационный мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITAM). В некоторых воплощениях сигнальный домен иммунной клетки включает первичный сигнальный домен, содержащий ингибирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITIM). В некоторых воплощениях сигнальный домен иммунной клетки включает первичный сигнальный домен белка, выбранного из числа рецептора Fc γ (Fc γ R), рецептора Fc ϵ (Fc ϵ R), рецептора Fc α (Fc α R), неонатального Fc-рецептора (FcRn), CD3, CD3 ζ , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD4, CD5, CD8, CD21, CD22, CD28, CD32, CD40L (CD154), CD45, CD66d, CD79a, CD79b, CD80, CD86, CD278 (также известен как ICOS), CD247 ζ , CD247 η , DAP10, DAP12, FYN, LAT, Lck, MAPK, комплекса MHC, NFAT, NF- κ B, PLC- γ , iC3b, C3dg, C3d и Zap70. В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен включает сигнальный домен CD3 ζ . В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит активационный мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITAM) из CD3 ζ . В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит сигнальный домен Fc γ R. В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит сигнальный домен Fc γ R, выбранный из Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA (CD32), Fc γ RIIB (CD32), Fc γ RIIA (CD16a) и Fc γ RIIB (CD16b). В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит сигнальный домен Fc ϵ R. В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит сигнальный домен Fc ϵ R, выбранный из Fc ϵ RI и Fc ϵ RII (CD23). В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит сигнальный домен Fc α R. В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит сигнальный домен Fc α R, выбранный из Fc α RI (CD89) и Fc α / μ R.

В некоторых воплощениях сигнальный домен иммунной клетки включает костимулирующий домен. В некоторых воплощениях сигнальный домен иммунной клетки включает несколько костимулирующих доменов. В некоторых воплощениях костимулирующий домен содержит сигнальный домен молекулы MHC класса I, белка рецептора TNF, иммуноглобулиноподобного белка, рецептора цитокинов, интегрина, сигнальной молекулы активации лимфоцитов (белка SLAM), активирующего рецептора NK-клеток или рецептора типа Toll. В некоторых воплощениях костимулирующий домен содержит сигнальный домен молекулы, выбранной из группы, в которую входят 2B4/CD244/SLAMF4, 4-1BB/TNFSF9/CD137, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BAFF R/TNFRSF13C, BAFF/BLyS/TNFSF13B, BLAME/SLAMF8, BTLA/CD272, CD100 (SEMA4D), CD103, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD150, CD160 (BY55), CD18, CD19, CD2, CD200, CD229/SLAMF3, ли-

ганд CD27/TNFSF7, CD27/TNFRSF7, CD28, CD29, CD2F-10/SLAMF9, лиганд CD30/TNFSF8, CD30/TNFRSF8, CD300a/LMIR1, CD4, лиганд CD40/TNFSF5, CD40/TNFRSF5, CD48/SLAMF2, CD49a, CD49D, CD49f, CD53, CD58/LFA-3, CD69, CD7, CD8 α , CD8 β , CD82/Kai-1, CD84/SLAMF5, CD90/Thy1, CD96, CDS, CEACAM1, CRACC/SLAMF7, CRTAM, CTLA-4, DAP12, дектин-1/CLEC7A, DNAM1 (CD226), DPIV/CD26, DR3/TNFRSF25, EphB6, GADS, Gi24/VISTA/B7-H5, лиганд GTR/TNFSF18, GTR/TNFRSF18, HLA класса I, HLA-DR, HVEM/TNFRSF14, IA4, ICAM-1, ICOS/CD278, Ikaros, IL2R β , IL2R γ , IL7R α , α 4-интегрин/CD49d, интегрин α 4 β 1, интегрин α 4 β 7/LPAM-1, IPO-3, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB1, ITGB2, ITGB7, KIRDS2, LAG-3, LAT, LIGHT/TNFSF14, LTBR, Ly108, Ly9 (CD229), связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), α -лимфотоксин/TNF- β , NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), NTB-A/SLAMF6, лиганд OX40/TNFSF4, OX40/TNFRSF4, PAG/Cbp, PD-1, PDCD6, PD-L2/B7-DC, PSGL1, RELT/TNFRSF19L, SELPLG (CD162), SLAM (SLAMF1), SLAM/CD150, SLAMF4 (CD244), SLAMF6 (NTB-A), SLAMF7, SLP-76, TACI/TNFRSF13B, TCL1A, TCL1B, TIM-1/KIM-1/HAVER, TIM-4, TL1A/TNFSF15, TNF RII/TNFRSF1B, TNF- α , TRANCE/RANKL, TSLP, TSLP R, VLA1 и VLA-6. В некоторых воплощениях костимулирующий домен регулирует пролиферативный сигнал и/или сигнал выживания иммунной клетки.

В некоторых воплощениях исполнительный элемент включает CRISPR-ассоциированный (Cas) полипептид, нуклеазу с "цинковым пальцем" (ZFN), связанный с "цинковым пальцем" полипептид регуляции генов, эффекторную нуклеазу типа активатора транскрипции (TALEN), связанный с эффекторной нуклеазой типа активатора транскрипции полипептид регуляции генов, мегануклеазу, природный главный фактор транскрипции, эпигенетический модифицирующий фермент, рекомбиназу, флипазу, транспозазу, РНК-связывающий белок (RBP), белок Argonaute, их производные, варианты или фрагменты. В некоторых воплощениях исполнительный элемент включает Cas-белок, который образует комплекс с направляющей РНК (гидРНК). В некоторых воплощениях исполнительный элемент включает RBP, обязательно в комплексе с гидРНК, который способен образовывать комплекс с Cas-белком. В некоторых воплощениях Cas-белок практически не обладает активностью расщепления ДНК.

В некоторых воплощениях исполнительный элемент регулирует экспрессию гена путем создания физических преград полинуклеотиду-мишени или привлечения дополнительных факторов для эффективного подавления или усиления экспрессии гена с нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит активатор транскрипции для эффективного повышения экспрессии с полинуклеотида-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит репрессор транскрипции для эффективного снижения экспрессии с полинуклеотида-мишени.

В некоторых воплощениях сайт распознавания расщепления фланкирован сигнальным доменом иммунной клетки и исполнительным элементом. В некоторых воплощениях сайт распознавания расщепления содержит последовательность распознавания расщепления, которая распознается протеазой. В некоторых воплощениях сайт распознавания расщепления содержит несколько последовательностей распознавания расщепления, причем каждая последовательность распознавания расщепления распознается одной и той же или разными протеазами. В некоторых воплощениях последовательность распознавания расщепления распознается протеазой, выбранной из группы, в которую входят: ахромопептидаза, аминоксипептидаза, анкрод, ангиотензин-превращающий фермент, бромелаин, кальпаин, кальпаин I, кальпаин II, карбоксипептидаза А, карбоксипептидаза В, карбоксипептидаза G, карбоксипептидаза P, карбоксипептидаза W, карбоксипептидаза Y, каспаза 1, каспаза 2, каспаза 3, каспаза 4, каспаза 5, каспаза 6, каспаза 7, каспаза 8, каспаза 9, каспаза 10, каспаза 11, каспаза 12, каспаза 13, катепсин В, катепсин С, катепсин D, катепсин Е, катепсин G, катепсин Н, катепсин L, химопапаин, химаза, химотрипсин, кластрипаин, коллагеназа, комплемент C1g, комплемент C1s, фактор D комплемента, фактор I комплемента, кукумин, дипептидилпептидаза IV, эластаза (лейкоцитарная), эластаза (панкреатическая), эндопротеиназа Arg-C, эндопротеиназа Asp-N, эндопротеиназа Glu-C, эндопротеиназа Lys-C, энтерокиназа, фактор Ха, фицин, фурин, гранзим А, гранзим В, протеаза ВИЧ, IG-аза, тканевой калликреин, лейцин-аминопептидаза (общая), лейцин-аминопептидаза (цитозольная), лейцин-аминопептидаза (микросомальная), матриксная металлопротеаза, метионин-аминопептидаза, нейтраза, папаин, пепсин, плазмин, пролидаза, проназа Е, простатоспецифичный антиген, алкалофильная протеаза из *Streptomyces griseus*, протеаза *Aspergillus*, протеаза из *Aspergillus saitoi*, протеаза из *Aspergillus sojae*, протеаза *B. licheniformis* (щелочная или алкалаза), протеаза из *Bacillus polymyxa*, протеаза из *Bacillus sp.*, протеаза из *Rhizopus sp.*, протеаза S, протеасомы, протеиназа из *Aspergillus oryzae*, протеиназа 3, протеиназа А, протеиназа К, белок С, пироглутамат-аминопептидаза, ренин, реннин, стрептокиназа, субтилизин, термолизин, тромбин, активатор тканевого плазминогена, трипсин, триптаза и урокиназа. В некоторых воплощениях химерный полипептид трансмембранного рецептора дополнительно включает по меньшей мере один нацеливающий пептид, который направляет транспорт рецептора в определенный район клетки. В некоторых воплощениях нацеливающий пептид направляет транспорт рецептора в ядро, митохондрии, эндоплазматический ретикулум (ER), хлоропласты, пероксисомы или плазматическую мембрану. В некоторых воплощениях нацеливающий пептид содержит сигнал ядерного экспорта (NES). В некоторых воплощениях нацеливающий пептид включает нацеливающий пептид для плазматической мембраны.

В некоторых воплощениях нацеливающий пептид соединяется с исполнительным элементом. В некоторых воплощениях нацеливающий пептид содержит сигнал ядерной локализации (NLS). В некоторых воплощениях нацеливающий пептид, содержащий NLS, соединяется с N-концом или C-концом исполнительного элемента. В некоторых воплощениях содержащий NLS нацеливающий пептид, соединенный с исполнительным элементом, направляет транспорт исполнительного элемента в ядро клетки после высвобождения исполнительного элемента из GMP при отщеплении по сайту распознавания расщепления.

Включение путем ссылки

Все публикации, патенты и патентные заявки, приведенные в этом описании, включены сюда путем ссылки в такой же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка была конкретно и индивидуально указана как включенная путем ссылки.

Краткое описание фигур

Новаторские особенности изобретения изложены, в частности, в прилагаемой формуле изобретения. Для лучшего понимания признаков и преимуществ настоящего изобретения следует обратиться к нижеследующему подробному описанию, в котором изложены иллюстративные воплощения, в которых применяются принципы изобретения, и к прилагаемым чертежам.

На фиг. 1 представлен типичный химерный полипептид трансмембранного рецептора, содержащий взаимодействующий с антигеном домен, сигнальный домен иммунной клетки и ген-модулирующий полипептид (GMP).

На фиг. 2 представлен типичный химерный полипептид трансмембранного рецептора, содержащий по меньшей мере один костимулирующий домен.

На фиг. 3А представлен типичный химерный полипептид трансмембранного рецептора, включающий исполнительный элемент, содержащий РНК-связывающий белок, необязательно в комплексе с направляющей нуклеиновой кислотой (например, sgРНК).

На фиг. 3В представлена типичная система, включающая химерный полипептид трансмембранного рецептора, содержащий взаимодействующий с антигеном домен, сигнальный домен иммунной клетки и ген-модулирующий полипептид (GMP), а также химерный адаптерный полипептид, содержащий элемент расщепления.

На фиг. 4А-Д схематически представлено высвобождение исполнительного элемента из GMP в системе, включающей рецептор, который подвергается фосфорилированию. На фиг. 4Е-Н схематически представлено высвобождение исполнительного элемента из GMP в системе, включающей рецептор, который подвергается конформационному изменению.

На фиг. 5 представлен типичный химерный полипептид трансмембранного рецептора, включающий по меньшей мере одну нацеливающую последовательность.

На фиг. 6А представлен типичный химерный адаптерный полипептид, включающий компонент рецепторного связывания и ген-модулирующий полипептид (GMP).

На фиг. 6В представлен типичный химерный адаптерный полипептид, включающий исполнительный элемент, содержащий РНК-связывающий белок, необязательно в комплексе с направляющей нуклеиновой кислотой (например, sgРНК).

На фиг. 7 представлена типичная система, включающая химерный адаптерный полипептид, содержащий компонент рецепторного связывания и ген-модулирующий полипептид (GMP), а также химерный полипептид трансмембранного рецептора, содержащий компонент расщепления.

На фиг. 8А-Д схематически представлено высвобождение исполнительного элемента из GMP в системе, включающей рецептор, который подвергается фосфорилированию. На фиг. 8Е-Н схематически представлено высвобождение исполнительного элемента из GMP в системе, включающей рецептор, который подвергается конформационному изменению.

На фиг. 9 представлена типичная система, включающая химерный адаптерный полипептид, содержащий компонент рецепторного связывания и ген-модулирующий полипептид (GMP), второй адаптерный полипептид, содержащий компонент расщепления, и химерный полипептид трансмембранного рецептора.

На фиг. 10А-Д схематически представлено высвобождение исполнительного элемента из GMP в системе, включающей по меньшей мере два адаптерных полипептида и рецептор, который подвергается фосфорилированию. На фиг. 10Е-Н схематически представлено высвобождение исполнительного элемента из GMP в системе, включающей по меньшей мере два адаптерных полипептида и рецептор в альтернативной конформации.

На фиг. 11 представлен типичный химерный полипептид трансмембранного рецептора, включающий по меньшей мере одну нацеливающую последовательность.

На фиг. 12А-Д схематически представлена система, в которой сайт распознавания расщепления содержит последовательность интеина. На фиг. 12Е-Н представлено альтернативное устройство системы, в которой сайт распознавания расщепления содержит последовательность интеина.

На фиг. 13А-Д схематически представлена система, в которой сайт распознавания расщепления содержит дисульфидную связь. На фиг. 13Е-Н представлено альтернативное устройство системы, в которой сайт распознавания расщепления содержит дисульфидную связь.

На фиг. 14 представлено применение приведенной здесь системы для репрессии IL-1 в лимфоцитах.
 На фиг. 15 представлено применение приведенной здесь системы для репрессии PD-1 в лимфоцитах.

На фиг. 16 представлено применение приведенной здесь системы для экспрессии второго химерного рецептора из экзогенной плазмиды в иммунных клетках.

На фиг. 17 представлена иллюстрация, адаптированная из фиг. 2 в Makarova K.S. et al. "An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems" *Nat Rev Microbiol* (2015) 13:722-736, в которой представлена архитектура геномных локусов для подтипов системы CRISPR-Cas.

На фиг. 18A-D схематически представлено высвобождение исполнительного элемента из GMP в системе, включающей по меньшей мере два адаптерных полипептида.

На фиг. 19 представлена иллюстрация системы, в которой GMP входит в состав первого химерного полипептида трансмембранного рецептора, а компонент расщепления входит в состав второго химерного полипептида трансмембранного рецептора.

На фиг. 20 Вестерн-блоттингом показано, что домен dCas9-KRAB отщепляется из химерных рецепторов в присутствии протеазы.

На фиг. 21 Вестерн-блоттингом показано, что домен dCas9-KRAB отщепляется из химерных рецепторов в присутствии адаптера-протеазы.

Раскрытие сущности изобретения

При практическом применении некоторых изложенных здесь способов, если не указано иначе, применяются стандартные методы иммунологии, биохимии, химии, молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии, геномики и рекомбинантной ДНК, которые входят в компетенцию специалистов в данной области. Например, см. Sambrook and Green, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th Edition (2012); серия *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds.); серия *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.), PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor, eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, and *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6th Edition (R.I. Freshney, ed. (2010)).

В настоящем описании и формуле изобретения формы единственного числа включают и значения множественного числа, если контекстом четко не указано иначе. Например, термин "химерный полипептид трансмембранного рецептора" включает в себя и множество химерных полипептидов трансмембранного рецептора.

Термин "примерно" или "приблизительно" означает, что конкретное значение при определении рядовым специалистом в данной области находится в допустимом диапазоне погрешностей, что отчасти будет зависеть от того, как измеряется или определяется это значение, то есть от ограничений системы измерения. Например, "примерно" может означать в пределах 1 или более 1 стандартного отклонения, согласно практике в данной области. С другой стороны, "примерно" может означать диапазон до 20%, до 10%, до 5% или до 1% от заданного значения. Альтернативно, особенно в отношении биологических систем или процессов, этот термин может означать порядок величины, предпочтительно в 5 раз, более предпочтительно в 2 раза от значения. Когда в заявке и формуле изобретения приводятся конкретные значения, то следует принимать, если не указано иначе, что термин "примерно" означает в допустимом диапазоне погрешностей для конкретного значения.

В настоящем изобретении "клетка" обычно относится к биологическим клеткам. Клетка может быть основной структурной, функциональной и/или биологической единицей живого организма. Клетка может происходить из любого организма, содержащего одну или несколько клеток. Некоторые неограниченные примеры включают: прокариотические клетки, эукариотические клетки, бактериальные клетки, клетки архей, клетки одноклеточных эукариотических организмов, клетки простейших, клетки растений (например, клетки сельскохозяйственных культур, плодов, овощей, зерновых, соевых бобов, кукурузы, пшеницы, семян, помидоров, риса, маниоки, сахарного тростника, тыквы, сена, картофеля, хлопка, конопли, табака, цветущих растений, хвойных деревьев, голосеменных, папоротников, плаунов, роголистников, печеночников, мхов), клетки водорослей (например, *Botryococcus braunii*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Nannochloropsis gaditana*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Sargassum patens* C. Agardh и др.), морских водорослей (например, ламинарии), клетки грибов (например, дрожжевые клетки, клетки шампиньонов), клетки животных, клетки беспозвоночных животных (например, плодовой мушки, кишечнополостных, иглокожих, нематод и др.), клетки позвоночных животных (например, рыб, амфибий, рептилий, птиц, млекопитающих), клетки млекопитающих (например, свиней, коров, коз, овец, грызунов, крыс, мышей, приматов, человека и др.) и т.д. Иногда клетки происходят не из природного организма (например, клетки могут быть получены синтетически, их иногда называют искусственными клетками).

Термин "антиген" в настоящем изобретении относится к молекулам или их фрагментам, способным связываться с селективными связывающими агентами. В качестве примера антигеном может быть лиганд, который может связываться с селективным связывающим агентом типа рецептора. В качестве другого примера, антигеном может быть антигенная молекула, которая может связываться с селективным связывающим агентом типа иммунологического белка (например, антителом). Антигеном также может называться молекула или её фрагмент, которые могут использоваться на животных для получения анти-

тел, способных связываться с этим антигеном.

Термин "антитело" в настоящем изобретении относится к белковым связывающимся молекулам с функциями типа иммуноглобулина. Термин антитело включает антитела (например, моноклональные и поликлональные антитела), а также их производные, варианты и фрагменты. Антитела включают, без ограничения, иммуноглобулины (Ig) различных классов (т.е. IgA, IgG, IgM, IgD и IgE) и подклассов (как-то IgG1, IgG2 и т.д.). К их производным, вариантам или фрагментам могут относиться функциональные производные или фрагменты, которые сохраняют специфичность связывания (например, полностью и/или частично) соответствующего антитела. Антиген связывающие фрагменты включают Fab, Fab', F(ab')₂, вариабельный фрагмент (Fv), одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), минитела, диатела и однодоменные антитела ("sdAb" или "нанотела" или "камелиды"). Термин антитело включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые были оптимизированы, спроектированы или химически конъюгированы. Примеры оптимизированных антител включают антитела, прошедшие созревание аффинности. Примеры спроектированных антител включают Fc-оптимизированные антитела (например, антитела, оптимизированные в области кристаллизуемого фрагмента) и мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела).

Термин "Fc-рецептор" или "FcR" в настоящем изобретении в общем относится к рецепторам либо их производным, вариантам или фрагментам, которые могут связываться с Fc-областью антител. В некоторых воплощениях FcR связывается с антителом типа IgG (гамма-рецептор, FcγR) и охватывает рецепторы подклассов FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), включая аллельные варианты и альтернативные сплайс-формы этих рецепторов. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA ("активирующий рецептор") и FcγRIIB ("ингибирующий рецептор"), которые имеют близкие аминокислотные последовательности, которые в основном отличаются цитоплазматическими доменами. Термин "FcR" также включает неонатальный рецептор FcRn, который отвечает за передачу материнских IgG к плоду.

Термин "нуклеотид" в настоящем изобретении в общем относится к комбинации основание-сахар-фосфат. К нуклеотидам относятся и синтетические нуклеотиды. К нуклеотидам относятся и синтетические аналоги нуклеотидов. Нуклеотиды могут быть мономерными звеньями последовательности нуклеиновой кислоты (например, дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или рибонуклеиновой кислоты (РНК)). Термин нуклеотид охватывает рибонуклеозидтрифосфаты аденозинтрифосфат (АТФ), уридинтрифосфат (УТФ), цитозинтрифосфат (ЦТФ), гуанозинтрифосфат (ГТФ) и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты типа dATP, dCTP, dITP, dUTP, dGTP, dTTP и их производные. К таким производным относятся, к примеру, [aS]dATP, 7-деза-dGTP и 7-деза-dATP, и такие производные нуклеотидов, которые придают содержащим их молекулам нуклеиновой кислоты устойчивость к нуклеазам. Термин нуклеотид в настоящем изобретении может относиться и к дидезоксирибонуклеозидтрифосфатам (ddNTPs) и их производным. Типичные примеры дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов включают, без ограничения, ddATP, ddCTP, ddGTP, ddITP и ddTTP. Нуклеотид может быть немеченым или помечен детектируемой меткой хорошо известными методами. Мечение также может проводиться с помощью квантовых точек. К детектируемым меткам относятся, к примеру, радиоактивные изотопы, флуоресцентные метки, хемилюминесцентные метки, биолюминесцентные метки и ферментные метки. К флуоресцентным меткам нуклеотидов относятся, без ограничения, флуоресцеин, 5-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM), 2',7'-диметокси-4',5'-дихлор-6-карбоксихлорофлуоресцеин (JOE), родамин, 6-карбоксихлорофлуоресцеин (R6G), N,N,N',N'-тетраметил-6-карбоксихлорофлуоресцеин (TAMRA), 6-карбоксихлорофлуоресцеин (ROX), 4-(4'-диметиламинофенилазо)бензойная кислота (DABCYL), Cascade Blue, Oregon Green, Texas Red, цианин и 5-(2'-аминоэтил)аминонафталин-1-сульфонная кислота (EDANS). Конкретные примеры флуоресцентно меченых нуклеотидов включают [R6G]dUTP, [TAMRA]dUTP, [R110]dCTP, [R6G]dCTP, [TAMRA]dCTP, [JOE]ddATP, [R6G]ddATP, [FAM]ddCTP, [R110]ddCTP, [TAMRA]ddGTP, [ROX]ddTTP, [dR6G]ddATP, [dR110]ddCTP, [dTAMRA]ddGTP и [dROX]ddTTP фирмы Perkin Elmer, Foster City, Calif.; дезоксинуклеотиды FluoroLink, FluoroLink Cy3-dCTP, FluoroLink Cy5-dCTP, FluoroLink Fluor X-dCTP, FluoroLink Cy3-dUTP и FluoroLink Cy5-dUTP фирмы Amersham, Arlington Heights, Ill.; флуоресцеин-15-dATP, флуоресцеин-12-dUTP, тетраметилродамин-6-dUTP, IR770-9-dATP, флуоресцеин-12-ddUTP, флуоресцеин-12-UTP и флуоресцеин-15-2'-dATP фирмы Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.; и меченые нуклеотиды хромосом, BODIPY-FL-14-UTP, BODIPY-FL-4-UTP, BODIPY-TMR-14-UTP, BODIPY-TMR-14-dUTP, BODIPY-TR-14-UTP, BODIPY-TR-14-dUTP, Cascade Blue-7-UTP, Cascade Blue-7-dUTP, флуоресцеин-12-UTP, флуоресцеин-12-dUTP, Oregon Green 488-5-dUTP, Rhodamine Green-5-UTP, Rhodamine Green-5-dUTP, тетраметилродамин-6-UTP, тетраметилродамин-6-dUTP, Texas Red-5-UTP, Texas Red-5-dUTP и Texas Red-12-dUTP фирмы Molecular Probes, Eugene, Oreg. Нуклеотиды также могут быть помечены или маркированы путем химической модификации. Химически модифицированными нуклеотидами являются биотин-dNTP. Некоторые неограничительные примеры биотинилированных dNTP включают биотин-dATP (например, биотин-N6-ddATP, биотин-14-dATP), биотин-dCTP (например, биотин-11-dCTP, биотин-14-dCTP) и биотин-dUTP (например, биотин-11-dUTP, биотин-16-dUTP, биотин-20-dUTP).

Термины "полинуклеотид", "олигонуклеотид" и "нуклеиновая кислота" применяются взаимозаменяемо для обозначения полимерной формы нуклеотидов любой длины, будь то дезоксирибонуклеотидов,

рибонуклеотидов или их аналогов, в одно-, двух-или многоцепочечном виде. Полинуклеотиды могут быть экзогенными или эндогенными для клетки. Полинуклеотиды могут существовать в бесклеточной среде. Полинуклеотид может представлять собой ген или его фрагмент. Полинуклеотид может представлять собой ДНК. Полинуклеотид может представлять собой РНК. Полинуклеотид может иметь любую трехмерную структуру и может выполнять любую функцию, известную или неизвестную. Полинуклеотид может включать в себя один или несколько аналогов (например, с измененным остовом, сахаром или основанием). Если они присутствуют, то модификации структуры нуклеотидов могут происходить до или после сборки полимера.

Некоторые неограничительные примеры аналогов включают 5-бромурацил, пептидонуклеиновые кислоты, ксенонуклеиновые кислоты, морфолиновые олигонуклеотиды, блокированные нуклеиновые кислоты, гликоленуклеиновые кислоты, треозонуклеиновые кислоты, дидезоксинуклеотиды, кордицепин, 7-деаза-ГТФ, флуорофоры (например, связанный с сахаром родамин или флуоресцеин), тиолсодержащие нуклеотиды, связанные с биотином нуклеотиды, флуоресцентные аналоги оснований, островки CpG, метил-7-гуанозин, метилированные нуклеотиды, инозин, тиюридин, псевдодуридин, дигидроуридин, кьюозин и вайозин. Неограничительные примеры полинуклеотидов включают кодирующие или некодирующие области гена или фрагмента гена, локусы, установленные при анализе сцепления, экзоны, интроны, матричные РНК (мРНК), транспортные РНК (тРНК), рибосомные РНК (рРНК), малые интерферирующие РНК (миРНК), короткие шпилечные РНК (кшРНК), микроРНК (микроРНК), рибозимы, κДНК рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенные ДНК с любой последовательностью, выделенные РНК с любой последовательностью, бесклеточные полинуклеотиды, включая бесклеточную ДНК (cfDNA) и бесклеточную РНК (cfRNA), зонды из нуклеиновых кислот и праймеры. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами.

Термин "ген" в настоящем изобретении относится к нуклеиновой кислоте (например, ДНК типа геномной ДНК и κДНК) и соответствующей последовательности нуклеотидов, участвующей в кодировании транскрипта РНК. Этот термин применительно к геномной ДНК включает промежуточные, некодирующие участки, а также регуляторные участки и может включать 5'- и 3'-концы. В некоторых случаях этот термин охватывает транскрибируемые последовательности, включая 5'- и 3'-нетранслируемые участки (5'-UTR и 3'-UTR), экзоны и интроны. У некоторых генов транскрибируемая область содержит "открытые рамки считывания", кодирующие полипептиды. В некоторых случаях термин "ген" включает только кодирующие последовательности (например, "открытую рамку считывания" или "кодирующую область"), необходимые для кодирования полипептида. В некоторых случаях гены не кодируют полипептиды, к примеру, гены рибосомной РНК (рРНК) и гены транспортной РНК (тРНК). В некоторых случаях термин "ген" включает не только транскрибируемые последовательности, но также и нетранскрибируемые участки, в том числе выше- и нижележащие регуляторные участки, энхансеры и промоторы. Ген может означать "эндогенный ген" или собственный ген в своем естественном положении в геноме организма. Ген может означать "экзогенный ген" или неприродный ген. Неприродный ген может означать ген, который в норме не встречается в организме хозяина, а введен в организм хозяина путем переноса гена. Неприродный ген также может означать ген, который находится не в своем естественном месте в геноме организма. Неприродный ген также может означать природную нуклеиновую кислоту или последовательность полипептида, которая включает мутации, вставки и/или делеции (например, чужеродные последовательности).

Термины "полинуклеотид-мишень" и "нуклеиновая кислота-мишень" в настоящем изобретении относятся к такой нуклеиновой кислоте или к таким полинуклеотидам, на которые нацелен исполнительный элемент настоящего изобретения. Полинуклеотидом-мишенью может быть ДНК (например, эндогенная или экзогенная). ДНК может составлять матрицу для получения транскриптов мРНК и/или различных регуляторных участков, регулирующих транскрипцию мРНК из ДНК матрицы. Полинуклеотидом-мишенью может быть часть более крупного полинуклеотида, например, хромосомы или области хромосомы. Полинуклеотидом-мишенью может быть внехромосомная последовательность (например, эписомная последовательность, последовательность миникольца, митохондриальная последовательность, хлоропластная последовательность и т.д.) или участок внехромосомной последовательности. Полинуклеотидом-мишенью может быть РНК. РНК может представлять собой, к примеру, мРНК, которая может служить матрицей, кодирующей белки. Полинуклеотид-мишень, содержащий РНК, может включать различные регуляторные участки, которые регулируют трансляцию белка из матрицы мРНК. Полинуклеотид-мишень может кодировать продукт гена (например, ДНК, кодирующая РНК-транскрипт, или РНК, кодирующая белковый продукт) или содержать регуляторную последовательность, которая регулирует экспрессию генного продукта. Термин "последовательность-мишень" в общем относится к последовательности нуклеиновой кислоты на одной цепи целевой нуклеиновой кислоты. Последовательность-мишень может представлять собой часть гена, регуляторной последовательности, геномной ДНК, бесклеточной нуклеиновой кислоты, в том числе cfDNA и/или cfRNA, κДНК слитого гена или РНК, включая мРНК, миРНК, рРНК и др. Полинуклеотид-мишень при воздействии на него исполнительного элемента может приводить к изменению экспрессии и/или активности гена. Полинуклеотид-мишень при воздейст-

вии на него исполнительного элемента может приводить к редактированию последовательности нуклеиновой кислоты. Нуклеиновая кислота-мишень может иметь нуклеотидную последовательность, которая может отличаться от какой-либо другой последовательности в образце нуклеиновой кислоты заменой единственного нуклеотида. Нуклеиновая кислота-мишень может иметь нуклеотидную последовательность, которая может отличаться от какой-либо другой последовательности в образце нуклеиновой кислоты заменой 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов. В некоторых воплощениях замена не может происходить в пределах 5, 10, 15, 20, 25, 30 или 35 нуклеотидов от 5'-конца нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых воплощениях замена не может происходить в пределах 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 нуклеотидов от 3'-конца нуклеиновой кислоты-мишени.

Термин "экспрессия" относится к одному или нескольким процессам, посредством которых полинуклеотид транскрибируется из ДНК-матрицы (как-то в мРНК или в другой РНК-транскрипт), и/или процессу, посредством которого транскрибируемая мРНК впоследствии транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Транскрипты и кодируемые полипептиды могут собирательно называться "генными продуктами". Если полинуклеотид происходит из геномной ДНК, то экспрессия может включать сплайсинг мРНК в эукариотической клетке. "Повышающая регуляция" в отношении экспрессии обычно означает повышение уровня экспрессии полинуклеотида (например, РНК типа мРНК) и/или последовательности полипептида по сравнению с уровнем экспрессии у дикого типа, а "понижающая регуляция" обычно означает снижение уровня экспрессии полинуклеотида (например, РНК типа мРНК) и/или последовательности полипептида по сравнению с его экспрессией у дикого типа.

Термины "комплементируют", "комплементирует", "комплементарный" и "комплементарность" в настоящем изобретении обычно относятся к последовательности, которая полностью комплементарна и гибридизуется с данной последовательностью. В некоторых случаях последовательность, которая гибридизуется с данной нуклеиновой кислотой, называется "комплементарной" или "обратно комплементарной" данной молекуле, если её последовательность оснований на данном участке способна комплементарно связываться с таковой у партнера по связыванию с тем, что образуются, к примеру, пары оснований А-Т, А-U, G-C и G-U. В общем, первая последовательность, которая гибридизуется со второй последовательностью, гибридизуется специфически или избирательно со второй последовательностью, так как гибридизация со второй последовательностью или набором вторых последовательностей является предпочтительной (например, термодинамически более стабильна при данном наборе условий типа строгих условий, которые обычно применяются в данной области), чем гибридизация с нецелевыми последовательностями при реакции гибридизации. Как правило, у гибридизуемых последовательностей степень комплементарности последовательностей по всей длине или по части соответствующей длины составляет от 25% до 100%, включая комплементарность последовательностей по меньшей мере на 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и 100%. Идентичность последовательностей, как-то с целью оценки степени комплементарности, можно измерить при помощи любого подходящего алгоритма выравнивания, включая, без ограничения, алгоритм Needleman-Wunsch (например, см. EMBOSS Needle aligner, доступный на www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html, обязательно с настройками по умолчанию), алгоритм BLAST (например, см. инструмент выравнивания BLAST, доступный на blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, обязательно с настройками по умолчанию) или алгоритм Smith-Waterman (например, см. EMBOSS Water aligner, доступный на www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/nucleotide.html, обязательно с настройками по умолчанию). Оптимальность выравнивания можно оценить, используя любые подходящие параметры выбранного алгоритма, включая параметры по умолчанию.

Комплементарность может быть идеальной или существенной/достаточной. Идеальная комплементарность между двумя нуклеиновыми кислотами означает, что две нуклеиновые кислоты могут образовывать дуплекс, в котором каждое основание дуплекса связано с комплементарным основанием путем спаривания Уотсона-Крика. Существенная/достаточная комплементарность что последовательность в одной нити не полностью и/или не совершенно комплементарна последовательности в противоположной нити, но происходит достаточное связывание между основаниями на двух нитях для образования стабильного гибридного комплекса при заданных условиях гибридизации (например, концентрации солей и температуре). Такие условия могут быть предсказаны с использованием последовательностей и стандартных математических расчетов для прогнозирования T_m гибридизуемых нитей или путем эмпирического определения T_m стандартными методами.

Термин "регуляция" применительно к экспрессии или активности в настоящем изобретении относится к изменению уровня экспрессии или активности. Регуляция может происходить на уровне транскрипции и/или на уровне трансляции.

Термины "пептид", "полипептид" и "белок" применяются взаимозаменяемо для обозначения полимеров по меньшей мере из двух аминокислотных остатков, соединенных пептидной связью. Этот термин не подразумевает определенную длину полимера и не означает или не подразумевает, что пептид получен рекомбинантными методами, путем химического или ферментативного синтеза или является естественным. Эти термины применимы к природным аминокислотным полимерам, а также к аминокислотным

полимерам, содержащим по меньшей мере одну модифицированную аминокислоту. В некоторых случаях полимер может перемежаться не аминокислотами. Термины включают аминокислотные цепи любой длины, включая полноразмерные белки, и белки со вторичной и/или третичной структурой (например, домены) или без неё. Термины также охватывают аминокислотные полимеры, которые подверглись модификации, к примеру, посредством образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидирования, ацелирования, фосфорилирования, окисления и любых других манипуляций типа конъюгирования с маркирующим компонентом. Термины "аминокислота" и "аминокислоты" в настоящем изобретении обычно относятся к природным и неприродным аминокислотам, включая, без ограничения, модифицированные аминокислоты и аналоги аминокислот. Модифицированные аминокислоты могут включать природные аминокислоты и неприродные аминокислоты, которые подвергались химической модификации для включения группы или химического компонента, который в природе не встречается у данной аминокислоты. Аналоги аминокислот могут относиться к производным аминокислот. Термин "аминокислота" включает и D-аминокислоты, и L-аминокислоты.

Термины "производное", "вариант" и "фрагмент" применительно к полипептидам в настоящем изобретении относятся к полипептидам, родственным полипептиду дикого типа, например, по аминокислотной последовательности, структуре (например, вторичной и/или третичной), активности (например, ферментативной активности) и/или функции. Производные, варианты и фрагменты полипептидов могут содержать одно или несколько вариаций (например, мутаций, вставок и делеций), укорочений, модификаций аминокислот либо их комбинаций по сравнению с полипептидом дикого типа.

Термин "степень (%) идентичности" в настоящем изобретении означает, какой процент аминокислотных остатков (или нуклеотидов) в последовательности кандидата идентичен аминокислотным остаткам (или нуклеотидам) эталонной последовательности после выравнивания последовательностей и, при необходимости, введения пробелов для достижения максимальной степени идентичности (т.е. пробелы можно вводить в одну или обе последовательности кандидата и эталона для оптимального выравнивания, а негомологичные последовательности можно игнорировать в целях сравнения). Выравнивание в целях определения степени идентичности может осуществляться различными способами, которые входят в компетенцию специалистов, например, с помощью общедоступных компьютерных программ типа BLAST, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Степень идентичности двух последовательностей можно рассчитать путем выравнивания исследуемой последовательности со сравнительной последовательностью с помощью BLAST, определения количества аминокислот или нуклеотидов в совмещаемой исследуемой последовательности, которые идентичны аминокислотам или нуклеотидам в таких же положениях у сравнительной последовательности, и деления количества идентичных аминокислот или нуклеотидов на количество аминокислот или нуклеотидов в сравнительной последовательности.

Термин "ген-модулирующий полипептид" или "GMP" в настоящем изобретении относится к полипептидам, содержащим, по меньшей мере, исполнительный элемент, способный регулировать экспрессию или активность гена и/или редактировать последовательность нуклеиновой кислоты. GMP может содержать дополнительные пептидные последовательности, которые не участвуют в модулировании экспрессии гена, например сайты распознавания расщепления, линкерные последовательности, нацеливающие последовательности и пр.

Термин "исполнительный элемент" в настоящем изобретении относится к элементу, который может регулировать экспрессию или активность гена и/или редактировать последовательность нуклеиновой кислоты, будь то экзогенной или эндогенной. Исполнительный элемент может регулировать экспрессию гена на уровне транскрипции и/или на уровне трансляции. Исполнительный элемент может регулировать экспрессию гена на уровне транскрипции, к примеру, путем регуляции получения мРНК из ДНК типа хромосомной ДНК или кДНК. В некоторых воплощениях исполнительный элемент рекрутирует по меньшей мере один фактор транскрипции, который связывается с определенной последовательностью ДНК, тем самым контролируя скорость транскрипции генетической информации из ДНК в мРНК. Исполнительный элемент может и сам связываться с ДНК и регулировать транскрипцию посредством физической преграждения, к примеру, предотвращая сборку белков типа РНК-полимеразы и других ассоциированных белков на ДНК-матрице. Исполнительный элемент может регулировать экспрессию гена на уровне трансляции, к примеру, путем регуляции получения белка из матрицы мРНК. В некоторых воплощениях исполнительный элемент регулирует экспрессию гена путем воздействия на стабильность транскрипта мРНК. В некоторых воплощениях исполнительный элемент регулирует экспрессию гена путем редактирования последовательности нуклеиновой кислоты (например, участка генома). В некоторых воплощениях исполнительный элемент регулирует экспрессию гена путем редактирования мРНК матрицы. Редактирование последовательности нуклеиновой кислоты в некоторых случаях может приводить к изменению базовой матрицы для экспрессии гена.

Приведенный здесь Cas-белок означает тип белка или полипептида. Cas-белок может означать нуклеазу. Cas-белок может означать эндорибонуклеазу. Cas-белок может означать любой модифицированный (например, укороченный, мутированный, удлиненный) полипептид или гомолог Cas-белка. Cas-белок может быть оптимизирован по кодонам. Cas-белок может быть оптимизированным по кодонам гомологом Cas-белка.

Cas-белок может быть энзиматически неактивным, частично активным, конститутивно активным, полностью активным, индуцибельно активным и/или более активным (например, больше, чем гомолог белка или полипептида дикого типа). Cas-белок может означать Cas9. Cas-белок может означать Crp1. Cas-белок может означать C2c2. Cas-белок (например, вариант, мутантный, энзиматически неактивный и/или условно энзиматически неактивный сайт-направленный полипептид) может связываться с нуклеиновой кислотой-мишенью. Cas-белок (например, вариант, мутантная, энзиматически неактивная и/или условно энзиматически неактивная эндорибонуклеаза) может связываться с мишенью РНК или ДНК.

Термин "сгРНК" в настоящем изобретении в общем относится к такой нуклеиновой кислоте, которая по последовательности по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% идентична и/или аналогична типичной сгРНК дикого типа (например, сгРНК из *S. pyogenes*). сгРНК обычно означает такую нуклеиновую кислоту, которая по последовательности не более чем на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% идентична и/или аналогична типичной сгРНК дикого типа (например, сгРНК из *S. pyogenes*). сгРНК может означать модифицированную форму сгРНК, которая может содержать изменения нуклеотидов типа делеции, вставки или замены, вариант, мутантную или химерную форму. сгРНК может представлять собой такую нуклеиновую кислоту, которая по последовательности по меньшей мере на 60% идентична последовательности типичной сгРНК дикого типа (например, сгРНК из *S. pyogenes*) на отрезке из по меньшей мере 6 смежных нуклеотидов. Например, последовательность сгРНК может быть по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична типичной последовательности сгРНК дикого типа (например, сгРНК из *S. pyogenes*) на отрезке из по меньшей мере 6 смежных нуклеотидов.

Термин "trасгРНК" в настоящем изобретении в общем относится к такой нуклеиновой кислоте, которая по последовательности по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% идентична и/или аналогична последовательности типичной trасгРНК дикого типа (например, trасгРНК из *S. pyogenes*). trасгРНК может означать такую нуклеиновую кислоту, которая по последовательности не более чем на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% идентична и/или аналогична последовательности типичной trасгРНК дикого типа (например, trасгРНК из *S. pyogenes*). trасгРНК может означать модифицированную форму trасгРНК, которая может содержать изменения нуклеотидов типа делеции, вставки или замены, вариант, мутантную или химерную форму. trасгРНК может означать такую нуклеиновую кислоту, которая по последовательности по меньшей мере на 60% идентична последовательности типичной trасгРНК дикого типа (например, trасгРНК из *S. pyogenes*) на отрезке из по меньшей мере 6 смежных нуклеотидов. Например, последовательность trасгРНК может быть по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична типичной последовательности trасгРНК дикого типа (например, trасгРНК из *S. pyogenes*) на отрезке из по меньшей мере 6 смежных нуклеотидов.

В настоящем изобретении "направляющая нуклеиновая кислота" может означать такую нуклеиновую кислоту, которая может гибридизироваться с другой нуклеиновой кислотой. Направляющей нуклеиновой кислотой может быть РНК. Направляющей нуклеиновой кислотой может быть ДНК. Направляющая нуклеиновая кислота может быть запрограммирована так, чтобы она сайт-специфически связывалась с последовательностью нуклеиновой кислоты. Нуклеиновая кислота-мишень или целевая нуклеиновая кислота может содержать нуклеотиды. Направляющая нуклеиновая кислота может содержать нуклеотиды. Часть нуклеиновой кислоты-мишени может быть комплементарна части направляющей нуклеиновой кислоты. Та нить двухцепочечного полинуклеотида-мишени, которая комплементарна и гибридизуется с направляющей нуклеиновой кислотой, может называться комплементарной нитью. Та нить двухцепочечного полинуклеотида-мишени, которая комплементарна комплементарной нити и поэтому не может быть комплементарна направляющей нуклеиновой кислоте, может называться некомплементарной нитью. Направляющая нуклеиновая кислота может содержать одну полинуклеотидную цепь и может называться "одинарной направляющей нуклеиновой кислотой". Направляющая нуклеиновая кислота может содержать две полинуклеотидные цепи и может называться "двойной направляющей нуклеиновой кислотой". Если не указано иное, термин "направляющая нуклеиновая кислота" может быть включительным, относящимся и к одинарным направляющим нуклеиновым кислотам, и к двойным направляющим нуклеиновым кислотам.

Направляющая нуклеиновая кислота может содержать сегмент, который может упоминаться как "сегмент, нацеливающий на нуклеиновую кислоту" или "последовательность нацеливания на нуклеиновую кислоту". Нацеливающий на нуклеиновую кислоту сегмент может содержать подсегмент, который может называться "сегментом связывания белка" или "последовательностью связывания белка" или "сегментом связывания Cas-белка".

Термин "сайт распознавания расщепления" применительно к пептидам в настоящем изобретении относится к такому сайту пептида, по которому может расщепляться химическая связь типа пептидной

связи или дисульфидной связи. Расщепление может осуществляться различными способами. Расщепление пептидных связей может осуществляться, к примеру, ферментом типа протеазы или сплайсинг-белком (например, интенином). Расщепление дисульфидной связи может осуществляться, к примеру, ферментом типа оксидоредуктазы.

Термин "нацеливающая последовательность" в настоящем изобретении относится к такой последовательности нуклеотидов и соответствующей аминокислотной последовательности, которая кодирует нацеливающий полипептид, который опосредует локализацию (или удерживание) белка в субклеточной локализации, например, плазматической мембране или мембране заданной органеллы, ядре, цитозоле, митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме (ER), аппарате Гольджи, хлоропластах, апопластах, пероксисомах или других органеллах. Например, нацеливающая последовательность может направлять белок (например, рецепторный полипептид или адаптерный полипептид) в ядро, используя сигнал ядерной локализации (NLS); из ядра клетки, к примеру, в цитоплазму, используя сигнал ядерного экспорта (NES); в митохондрии, используя сигнал митохондриальной наводки; в эндоплазматический ретикулум (ER), используя сигнал удержания в ER; в пероксисомы, используя сигнал пероксисомной наводки; в плазматическую мембрану, используя сигнал мембранной локализации; либо их комбинации.

В настоящем изобретении "слияние" может относиться к белкам и/или нуклеиновым кислотам, содержащим одну или несколько неприродных последовательностей (например, частей). Слияние может включать одну или несколько одинаковых неприродных последовательностей. Слияние может включать одну или несколько разных неприродных последовательностей. Слияние может представлять собой химеру. Слияние может включать аффинную метку нуклеиновой кислоты. Слияние может включать баркод. Слияние может включать аффинную метку пептида. Слияние может обеспечивать субклеточную локализацию направляемого на место полипептида (например, сигнал ядерной локализации (NLS) для наведения на ядро, сигнал митохондриальной локализации для наведения на митохондрии, сигнал хлоропластной локализации для наведения на хлоропласты, сигнал удержания в эндоплазматическом ретикулуме (ER) и др.). Слияние может обеспечить неприродную последовательность (например, аффинную метку), которая может использоваться для отслеживания или очистки. Слияние может представлять собой небольшую молекулу типа биотина или краситель типа флуоресцентных красителей Alexa, красителя Cyanine3, красителя Cyanine5.

Слияние может относиться к любому белку с функциональным действием. Например, слитый белок может включать активность метилтрансферазы, активность деметилазы, активность дисмутазы, активность алкилирования, активность депуринизации, активность окисления, активность образования пиримидиновых димеров, активность интегразы, активность транспозазы, активность рекомбиназы, активность полимеразы, активность лигазы, активность геликазы, активность фотолиазы или активность гликозилазы, активность ацетилтрансферазы, активность деацетилазы, активность киназы, активность фосфатазы, активность убиквитин-лигазы, активность деубиквитинирования, активность аденилирования, активность деаденилирования, активность сумоилирования, активность десумоилирования, активность рибозилирования, активность дерибозилирования, активность миристоилирования, активность ремоделирования, активность протеазы, активность оксидоредуктазы, активность трансферазы, активность гидролазы, активность лиазы, активность изомеразы, активность синтазы, активность синтетазы или активность демиростоилирования. Эффекторный белок может модифицировать геномный локус. Слитый белок может быть продуктом слияния в Cas-белке. Слитый белок может быть неприродной последовательностью в Cas-белке.

В настоящем изобретении "неприродный" может означать последовательность нуклеиновой кислоты или полипептида, которая не встречается у нативной нуклеиновой кислоты или белка. Неприродные может означать аффинные метки. Неприродные может означать слитые. Неприродные может означать последовательности природной нуклеиновой кислоты или полипептида, которые содержат мутации, вставки и/или делеции. Неприродная последовательность может проявлять или кодировать активность (например, ферментативную активность, активность метилтрансферазы, активность ацетилтрансферазы, активность киназы, активность убиквитинирования и т.д.), которую также может проявлять последовательность нуклеиновой кислоты и/или полипептида, с которой слита неприродная последовательность. Неприродную последовательность нуклеиновой кислоты или полипептида можно соединить с последовательностью природной нуклеиновой кислоты или полипептида (или ее вариантом) при помощи генной инженерии, получая химерную последовательность нуклеиновой кислоты и/или полипептида, кодирующую химерную нуклеиновую кислоту и/или полипептид.

Термины "субъект", "индивид" и "пациент" применяются здесь взаимозаменяемо для обозначения позвоночных, предпочтительно млекопитающих типа человека. К млекопитающим относятся, без ограничения, мыши, обезьяны, люди, сельскохозяйственные животные, спортивные животные и домашние животные. Также охватываются ткани, клетки и их потомство от биологических объектов, полученных *in vivo* или культивируемых *in vitro*.

Термины "лечение" и "обработка" в настоящем изобретении относятся к подходу для получения положительных или требуемых результатов, включая, без ограничения, терапевтическую пользу и/или профилактическую пользу. Например, лечение может включать введение описанной здесь системы или

популяции клеток. Под терапевтической пользой имеется в виду любое терапевтически значимое улучшение или воздействие на одно или несколько заболеваний, состояний или симптомов, подлежащих лечению. Для профилактической пользы композиция может вводиться субъекту, подверженному риску возникновения определенного заболевания, состояния или симптома, или же субъекту, сообщающему об одном или нескольких физиологических симптомах заболевания, даже если болезнь, состояние или симптомы еще не могли проявиться.

Термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к такому количеству композиции, например, композиции, включающей иммунные клетки типа лимфоцитов (например, Т-лимфоциты и/или NK-клетки), содержащие систему настоящего изобретения, которое является достаточным, чтобы вызвать требуемое действие при введении нуждающемуся в этом субъекту. В контексте настоящего изобретения термин "терапевтически эффективное" относится к такому количеству композиции, которое является достаточным для замедления проявления, остановки прогрессирования, ослабления или облегчения по меньшей мере одного симптома заболевания при лечении способами настоящего изобретения.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены системы для условной регуляции иммунных клеток. Типичная система включает: (a) химерный полипептид трансмембранного рецептора, включающий: (i) внеклеточную область, содержащую взаимодействующий с антигеном домен, который связывает антиген, и (ii) внутриклеточную область, содержащую сигнальный домен иммунной клетки; (b) химерный адаптерный полипептид, содержащий участок рецепторного связывания, который связывает химерный полипептид трансмембранного рецептора, когда рецепторный полипептид подвергается модификации при связывании с антигеном; (c) ген-модулирующий полипептид (GMP), содержащий исполнительный элемент, соединенный с сайтом распознавания расщепления; и (d) расщепляющий элемент, который расщепляет сайт распознавания расщепления только тогда, когда он находится вблизи сайта распознавания расщепления, высвобождая исполнительный элемент из GMP; причем: (i) GMP входит в состав внутриклеточной области рецептора, а расщепляющий элемент входит в состав адаптерного полипептида; (ii) GMP входит в состав адаптерного полипептида, а расщепляющий элемент входит в состав внутриклеточной области рецептора, или (iii) расщепляющий элемент комплексуется со вторым адаптерным полипептидом, который связывает химерный полипептид трансмембранного рецептора в ответ на модификацию рецептора, а GMP входит в состав химерного адаптерного полипептида.

Химерный полипептид трансмембранного рецептора, химерный адаптерный полипептид, ген-модулирующий полипептид (GMP) и расщепляющий элемент рассматриваемой системы могут располагаться в различных конфигурациях. В типичной конфигурации GMP входит в состав внутриклеточной области химерного полипептида трансмембранного рецептора, а расщепляющий элемент входит в состав химерного адаптерного полипептида. Химерный полипептид трансмембранного рецептора в типичной конфигурации может включать (a) внеклеточную область, содержащую взаимодействующий с антигеном домен, который связывает антиген; и (b) внутриклеточную область, содержащую: (i) сигнальный домен иммунной клетки; и (ii) ген-модифицирующий полипептид (GMP), соединенный с сигнальным доменом иммунной клетки, причем GMP содержит исполнительный элемент, связанный с сайтом распознавания расщепления; причем исполнительный элемент высвобождается из GMP при расщеплении сайта распознавания расщепления только при связывании антигена с внеклеточной областью химерного полипептида трансмембранного рецептора, содержащего взаимодействующий с антигеном домен.

В показательном примере, приведенном на фиг. 1, внеклеточная область рецептора может включать взаимодействующий с антигеном домен 101, а внутриклеточная область может включать: (i) сигнальный домен иммунной клетки 102 и (ii) GMP, содержащий исполнительный элемент 103, соединенный с сайтом распознавания расщепления 104.

Взаимодействующий с антигеном домен химерного полипептида трансмембранного рецептора может включать любой белок или молекулу, которая может связываться с антигеном. Взаимодействующий с антигеном домен описанного здесь химерного полипептида трансмембранного рецептора может представлять собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело, человеческое антитело, гуманизованное антитело либо его функциональное производное, вариант или фрагмент, включая, без ограничения, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, одноцепочечный Fv (scFv), мини-тело, диатело и однодоменное антитело типа нанотел из варибельного домена тяжелой цепи (V_H), варибельного домена легкой цепи (V_L) и верблюжьего варибельного домена (V_{HH}). В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен включает по меньшей мере один из Fab, Fab', F(ab')₂, Fv и scFv. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен включает миметик антитела. Миметиками антител называют молекулы, которые могут связывать молекулы мишени со сродством, сравнимым с антителом, и включают одноцепочечные связывающие молекулы, связывающие молекулы на основе цитохрома b562, белковые каркасы из фибронектина или типа фибронектина (например, аднектины), липокаллиновые каркасы, каликсариновые каркасы, A-домены и другие каркасы. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен включает трансмембранный рецептор либо его производное, вариант или фрагмент. Например, взаимодействующий с антигеном домен может включать, по меньшей мере, лигандсвязывающий домен трансмембранного рецептора.

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен включает гуманизованное антитело. Гуманизованные антитела могут быть получены различными методами, включая, без ограничения, пересадку CDR, перелицовку, перетасовку цепей и другие методы. Можно выбрать переменные домены человека, в том числе легких и тяжелых цепей, чтобы уменьшить иммуногенность гуманизованных антител. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен химерного полипептида трансмембранного рецептора содержит фрагмент гуманизованного антитела, который связывает антиген с высоким сродством и обладает другими благоприятными биологическими свойствами, как-то меньшей и/или минимальной иммуногенностью. Гуманизованное антитело или фрагмент антитела может сохранять такую же антигенную специфичность, как и соответствующее негуманизованное антитело.

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен включает одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). Молекулы scFv могут быть получены путем соединения областей тяжелой цепи (V_H) и легкой цепи (V_L) иммуноглобулина с помощью гибких линкеров типа полипептидных линкеров. scFvs могут быть получены различными способами.

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен подвергается генной инженерии для связывания конкретного антигена-мишени. Например, взаимодействующий с антигеном домен может представлять собой генно-инженерный scFv. Взаимодействующий с антигеном домен может подвергаться инженерии различными методами, включая, без ограничения, библиотеки дисплея типа библиотек фагового дисплея, библиотек дрожжевого дисплея, библиотек клеточного дисплея (например, из клеток млекопитающих), слияний типа белок-нуклеиновая кислота, библиотек рибосомного дисплея и/или библиотек периплазматического дисплея *E.coli*. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен, который подвергается инженерии, может связываться с антигеном с большим сродством, чем аналогичное антитело или антитело, которое не подвергалось инженерии.

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает несколько антигенов, например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 антигенов. Взаимодействующий с антигеном домен может связывать два родственных антигена, как-то два подтипа ботулинового токсина (например, ботулиновый нейротоксин подтипа A1 и подтипа A2). Взаимодействующий с антигеном домен может связывать два неродственных белка, как-то рецепторную тирозинкиназу erbB-2 (также называется Neu, ERBB2 и HER2) и фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF). Взаимодействующий с антигеном домен, способный связывать два антигена, может включать антитело, сконструированное для связывания двух неродственных белковых мишеней на отдельных, но перекрывающихся сайтах антитела. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен, который связывает несколько антигенов, включает молекулу биспецифичного антитела. Молекула биспецифичного антитела может содержать первую последовательность переменного домена иммуноглобулина со специфичностью связывания для первого эпитопа и вторую последовательность переменного домена иммуноглобулина со специфичностью связывания для второго эпитопа. В некоторых воплощениях первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). Первый и второй эпитопы могут перекрываться. В некоторых воплощениях первый и второй эпитопы не перекрываются. В некоторых воплощениях первый и второй эпитопы находятся на разных антигенах, например, на разных белках (или различных субъединицах мультимерного белка). В некоторых воплощениях молекула биспецифичного антитела включает последовательность переменного домена тяжелой цепи и последовательность переменного домена легкой цепи, обладающих специфичностью связывания для первого эпитопа, и последовательность переменного домена тяжелой цепи и последовательность переменного домена легкой цепи, обладающих специфичностью связывания для второго эпитопа. В некоторых воплощениях молекула биспецифичного антитела включает половину антитела со специфичностью связывания для первого эпитопа и половину антитела со специфичностью связывания для второго эпитопа. В некоторых воплощениях молекула биспецифичного антитела включает половину антитела или его фрагмент со специфичностью связывания для первого эпитопа и половину антитела или его фрагмент со специфичностью связывания для второго эпитопа.

В некоторых воплощениях внеклеточная область химерного полипептида трансмембранного рецептора содержит несколько взаимодействующих с антигеном доменов, например, по меньшей мере 2 взаимодействующих с антигеном домена (например, по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 взаимодействующих с антигеном доменов). Множественные взаимодействующие с антигеном домены могут проявлять связывание с одним и тем же или разными антигенами. В некоторых воплощениях внеклеточная область содержит по меньшей мере два взаимодействующих с антигеном домена, к примеру, по меньшей мере два scFv, соединенные в тандеме. В некоторых воплощениях два scFv-фрагмента соединяются пептидным линкером.

Взаимодействующий с антигеном домен внеклеточной области химерного полипептида трансмембранного рецептора может связывать мембраносвязанный антиген, к примеру антиген на внеклеточной поверхности клетки (например, клетки мишени). В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает антиген, который не связан с мембраной (например, немембраносвязанный), к примеру, внеклеточный антиген, который секретируется из клетки (например, клетки мишени), или антиген, локализованный в цитоплазме клетки (например, клетки мишени). Антигены (например, мембра-

носвязанные и не связанные с мембраной) могут быть связаны с заболеванием типа вирусной, бактериальной и/или паразитарной инфекции; воспалительным и/или аутоиммунным заболеванием; или новообразованием типа рака и/или опухоли. Неограничительные примеры антигенов, которые могут связываться со взаимодействующим с антигеном доменом химерного полипептида трансмембранного рецептора рассматриваемой системы, включают, без ограничения β -амилоид 1-40, 4-1BB, 5AC, 5T4, 707-AP, якорный белок-4 киназы A (AKAP-4), рецептор активина типа 2B (ACVR2B), киназа-1 типа рецептора активина (ALK1), антиген аденокарциномы, адипофилин, β -адренорецептор 3 (ADRB3), AGS-22M6, α -фолатный рецептор, α -фетопротеин (AFP), AIM-2, киназа анапластической лимфомы (ALK), андрогеновый рецептор, ангиопоэтин 2, ангиопоэтин 3, ангиопоэтин-связывающий рецептор 2 на клеточной поверхности (Tie 2), сибиреязвенный токсин, AOC3 (VAP-1), антиген созревания В-клеток (BCMA), B7-H3 (CD276), токсин *Bacillus anthracis*, фактор активации В-клеток (BAFF), клетки В-лимфомы, антиген 2 стромальных клеток костного мозга (BST2), братский регулятор импринтированных сайтов (BORIS), антиген C242, C5, CA-125, раковый антиген 125 (CA-125 или MUC16), раковый/тестикулярный антиген 1 (NY-ESO-1), раковый/тестикулярный антиген 2 (LAGE-1a), карбоангидраза 9 (CA-IX), карциноэмбриональный антиген (CEA), сердечный миозин, CCCTC-связывающий фактор (CTCF), CCL11 (эотаксин-1), CCR4, CCR5, CD11, CD123, CD125, CD140a, CD147 (базигин), CD15, CD152, CD154 (CD40L), CD171, CD179a, CD18, CD19, CD2, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23 (рецептор IgE), CD24, CD25 (α -цепь рецептора IL-2), CD27, CD274, CD28, CD3, CD3- ϵ , CD30, представитель f семейства молекул типа CD300 (CD300LF), CD319 (SLAMF7), CD33, CD37, CD38, CD4, CD40, лиганд CD40, CD41, CD44 v6, CD44 v7, CD44 v8, CD5, CD51, CD52, CD56, CD6, CD70, CD72, CD74, CD79A, CD79B, CD80, CD97, родственный CEA антиген, CFD, ch4D5, открытая рамка считывания 61 хромосомы X (CXORF61), клаудин 18.2 (CLDN18.2), клаудин 6 (CLDN6), *Clostridium difficile*, фактор слипания A, CLCA2, рецептор колониестимулирующего фактора 1 (CSF1R), CSF2, CTLA-4, представитель 12A семейства доменов лектина типа C (CLEC12A), подобная лектину типа C молекула 1 (CLL-1 или CLECL1), рецептор-4 хемокинов типа C-X-C, циклин B1, цитохром P4501B1 (CYP1B1), сур-В, цитомегаловирус, гликопротеин В цитомегаловируса, дабигатран, DLL4, DPP4, DR5, шигатоксин *E. coli* 1 типа, шигатоксин *E. coli* 2 типа, экто-ADP-рибозилтрансфераза 4 (ART4), содержащий EGF-подобный модуль муциноподобный белок-2 типа рецептора гормона (EMR2), содержащий EGF-подобные домены белок 7 (EGFL7), фактор элонгации 2 мутантный (ELF2M), эндотоксин, эфрин A2, эфрин B2, рецептор 2 эфрина типа А, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), вариант III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), эписиалин, молекула адгезии эпителиальных клеток (EpcAM), эпителиальный гликопротеин 2 (EGP-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EGP-40), ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERG, продукт слияния генов трансмембранной сериновой протеазы 2 (TMPRSS2) и ETS, *Escherichia coli*, транслокационный вариант ETS гена 6, расположенного на хромосоме 12p (ETV6-AML), F-белок респираторно-синцитиального вируса, FAP, Fc-фрагмент рецептора IgA (FCAR или CD89), белок-5 типа Fc-рецептора (FCRL5), фетальный ацетилхолиновый рецептор, β -цепь фибрина II, α -белок активации фибробластов (FAP), дополнительный домен-В фибронектина, FGF-5, Fms-подобная тирозинкиназа 3 (FLT3), фолатсвязывающий белок (FBP), фолатгидролаза, рецептор фолата 1, α -рецептор фолата, β -рецептор фолата, родственный Fos антиген 1, рецептор Frizzled, фукозил-GM1, G250, сопряженный с G-белком рецептор 20 (GPR20), представитель D сопряженных с G-белком рецепторов класса C группы 5 (GPC5D), ганглиозид G2 (GD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), α -цепь рецептора GMCSF, GPNMB, GnT-V, фактор роста и дифференцировки 8, GUCY2C, белок теплового шока 70-2, мутантный (mut hsp70-2), гемагглютинин, клеточный рецептор 1 вируса гепатита А (HAVCR1), поверхностный антиген гепатита В, вирус гепатита В, HER1, HER2/неу, HER3, гексасахаридная часть гликоцерамида GloboH (GloboH), HGF, HNGFR, высокомолекулярный ассоциированный с меланомой антиген (HMW-MAA), гистоновый комплекс, HIV-1, HLA-DR, HNGF, Hsp90, HST-2 (FGF6), вирус Е6 папилломы человека (HPV E6), вирус Е7 папилломы человека (HPV E7), киназа рецептора фактора роста гепатоцитов (scatter factor) человека, теломераза-обратная транскриптаза человека (hTERT), TNF человека, ICAM-1 (CD54), iCE, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IgE, Fc-область IgE, IGF-1, рецептор IGF-1, IGHE, IL-12, IL-13, IL-17, IL-17A, IL-17F, IL-1 β , IL-20, IL-22, IL-23, IL-31, IL-31RA, IL-4, IL-5, IL-6, рецептор IL-6, IL-9, полипептид 1 типа лямбда иммуноглобулина (IGLL1), гемагглютинин вируса гриппа А, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептор IGF-1), инсулиноподобный фактор роста 2 (ILGF2), интегрин α 4 β 7, интегрин β 2, интегрин α 2, интегрин α 4, интегрин α 5 β 1, интегрин α 7 β 7, интегрин α 11 β 3, интегрин α v β 3, рецептор α / β -интерферона, индуцированный γ -интерфероном белок, α -рецептор интерлейкина 11 (IL-11R α), субъединица α -2 рецептора интерлейкина 13 (IL-13Ra2 или CD213A2), кишечная карбоксиэстераза, рецептор вставочного домена киназы (KDR), KIR2D, KIT (CD117), молекула клеточной адгезии L1 (L1-CAM), легумин, представитель-2 подсемейства А иммуноглобулиноподобных рецепторов лейкоцитов (LILRA2), ассоциированный с лейкоцитами иммуноглобулиноподобный рецептор-1 (LAIR1), антиген Lewis-Y, LFA-1 (CD11a), LINGO-1, липотейхоевая кислота, LOXL2, L-селектин (CD62L), комплекс лимфоцитарного антигена 6, локус K9 (LY6K), лимфоцитарный антиген 75 (LY75), белковая тирозинкиназа лимфоцитов (LCK), α -лимфотоксин (LT- α) или β -фактор некроза опухолей (TNF- β), фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF или

MMIF), M-CSF, антиген дифференцировки молочной железы (NY-BR-1), MCP-1, раковый/тестикулярный антиген-1 меланомы (MAD-CT-1), раковый/тестикулярный антиген-2 меланомы (MAD-CT-2), ингибитор апоптоза меланомы (ML-IAP), ассоциированный с меланомой антиген 1 (MAGE-A1), мезотелин, муцин 1, связанный с клеточной поверхностью (MUC1), MUC-2, CanAg муцина, связанный с миелином гликопротеин, миостатин, N-ацетилглюкозилтрансфераза V (NA17), NCA-90 (антиген гранулоцитов), фактор роста нервов (NGF), регулируемая апоптозом невральная протеиназа 1, молекула адгезии нервных клеток (NCAM), ингибитор роста нейритов (например, NOGO-A, NOGO-B, NOGO-C), нейропилин-1 (NRP1), N-гликолилнейраминаовая кислота, NKG2D, рецептор Notch, O-ацетилганглиозид GD2 (OAcGD2), обонятельный рецептор 51E2 (OR51E2), онкофетальный антиген (h5T4), онкогенный слитый белок, состоящий из области кластера точки разрыва (BCR) и гомолога 1 онкогена Abelson вируса лейкемии мышей (Abl) (bcr-abl), *Oryctolagus cuniculus*, OX-40, oxLDL, мутантный p53, белок "paired box" Pax-3 (PAX3), белок "paired box" Pax-5 (PAX5), паннексин 3 (PANX3), котранспортер фосфата-натрия, фосфатидилсерин, плацентоспецифичный белок 1 (PLAC1), α -рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR- α), β -рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR- β), полисиаловая кислота, связывающий проакрозин белок sp32 (OY-TES1), белок запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-1), пропротеинконвертаза субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9), простаза, раковый антиген-1 карциномы простаты (PCTA-1 или Galectin 8), антиген-1 меланомы, распознаваемый T-клетками (MelanA или MART1), P15, P53, PRAME, антиген стволовых клеток простаты (PASA), специфичный мембранный антиген простаты (PSMA), кислая фосфатаза простаты (PAP), клетки карциномы простаты, простеин, сериновая протеаза 21 (тестисин или PRSS21), субъединица протеасомы (просомы, макропаина) β -типа 9 (PSMB9 или LMP2), *Pseudomonas aeruginosa*, гликопротеин вируса бешенства, RAGE, представитель С семейства гомологов Ras (RhoC), лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B (RANKL), рецептор поздних продуктов гликирования (RAGE-1), орфанный рецептор-1 типа рецепторной тирозинкиназы (ROR1), почечный убиквитарный антиген-1 (RU1), почечный убиквитарный антиген-2 (RU2), респираторно-синцитиальный вирус, антиген D резус-групп крови, резус-фактор, транслокационные точки разрыва у саркомы, склеростин (SOST), селектин P, молекула адгезии сиалил-Lewis (sLe), белок спермы 17 (SPA17), сфингозин-1-фосфат, распознаваемый T-клетками антиген-1, -2 и -3 плоскоклеточной карциномы (SART1, SART2 и SART3), стадийспецифичный эмбриональный антиген-4 (SSEA-4), *Staphylococcus aureus*, STEAP1, сурвивин, синдекан 1 (SDC1)+A314, SOX10, сурвивин, сурвивин-2B, синовиальная саркома, точка разрыва X-2 (SSX2), T-клеточный рецептор, белок TCR- γ с альтернативной рамкой считывания (TARP), теломераза, TEM1, тенасцин C, TGF- β (например, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3), рецептор тиреотропного гормона (TSHR), ингибитор пути тканевого фактора (TFPI), антиген Tn ((Tn Ag) или (GalNAc-Ser/Thr)), антиген созревания B-клеток из семейства рецепторов TNF (BCMA), TNF- α , TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRG, транскламиназа 5 (TGS5), опухолевый антиген CTAA16.88, эндотелиальный маркер опухолей 1 (TEM1/CD248), белок, родственник эндотелиальному маркеру опухолей 7 (TEM7R), опухолевый белок p53 (p53), опухолеспецифичный гликозилированный MUC1, связанный с опухолями передатчик кальциевых сигналов 2, связанный с опухолями гликопротеин 72 (TAG-72), связанный с опухолями гликопротеин 72 (TAG-72)+A327, рецептор TWEAK, тирозиназа, родственник тирозиназе белок 1 (TYRP1 или гликопротеин 75), родственник тирозиназе белок 2 (TYRP2), уроплакин 2 (UPK2), фактор роста сосудистого эндотелия (например, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGF), рецептор-1 фактора роста сосудистого эндотелия (VEGFR1), рецептор-2 фактора роста сосудистого эндотелия (VEGFR2), виментин, гомолог онкогена v-мус вируса птичьего миелоцитоматоза из нейробластомы (MYCN), фактор фон Виллебранда (VWF), белок опухоли Вильмса (WT1), представитель 1A семейства X-антигенов (XAGE1), β -амилоид и легкая к-цепь.

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает антиген, выбранный из группы, в которую входят биотинилированная молекула 707-AP, α -актинин-4, abl-bcr alb-b3 (b2a2), abl-bcr alb-b4 (b3a2), адипофилин, AFP, AIM-2, аннексин II, ART-4, BAGE, β -катенин, bcr-abl, bcr-abl p190 (e1a2), bcr-abl p210 (b2a2), bcr-abl p210 (b3a2), BING-4, CAG-3, CAIX, CAMEL, каспаза-8, CD171, CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44v7/8, CDC27, CDK-4, CEA, CLCA2, Cyp-B, DAM-10, DAM-6, DEK-CAN, EGFRvIII, EGP-2, EGP-40, ELF2, Ep-CAM, EphA2, EphA3, erb-B2, erb-B3, erb-B4, ES-ESO-1a, ETV6/AML, FBP, фетальный ацетилхолиновый рецептор, FGF-5, FN, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7B, GAGE-8, GD2, GD3, GnT-V, Gp100, gp75, Her-2, HLA-A*0201-R170I, HMW-MAA, HSP70-2M, HST-2 (FGF6), HST-2/neu, hTERT, iCE, IL-11R α , IL-13R α 2, KDR, KIAA0205, K-RAS, молекула клеточной адгезии L1, LAGE-1, LDLR/FUT, Lewis Y, MAGE-1, MAGE-10, MAGE-12, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-6, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-B1, MAGE-B2, "яблочный" фермент, маммаглобин-A, MART-1/Melan-A, MART-2, MC1R, M-CSF, мезотелин, MUC1, MUC16, MUC2, MUM-1, MUM-2, MUM-3, миозин, NA88-A, Neo-PAP, NKG2D, NPM/ALK, N-RAS, NY-ESO-1, OA1, OGT, онкофетальный антиген (h5T4), OS-9, полипептид P, P15, P53, PRAME, PSA, PSCA, PSMA, PTPRK, RAGE, ROR1, RU1, RU2, SART-1, SART-2, SART-3, SOX10, SSX-2, сурвивин, сурвивин-2B, SYT/SSX, TAG-72, TEL/AML1, TGF α RII, TGF β RII, TP1, TRAG-3, TRG, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TRP-2-6b, тирозиназа, VEGF-R2, WT1, α -фолатный рецептор и легкая

к-цепь. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывается с опухолевым антигеном.

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает антиген, включающий антитело, например, антитело, связанное с белком или полипептидом клеточной поверхности. Белок или полипептид на клеточной поверхности, с которым связывается антитело, может содержать антиген, связанный с заболеванием типа вирусной, бактериальной и/или паразитарной инфекции; воспалительным и/или аутоиммунным заболеванием; или новообразованием типа рака и/или опухоли. В некоторых воплощениях антитело связывает опухолевый антиген (например, белок или полипептид). В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен описанного здесь химерного полипептида трансмембранного рецептора может связывать моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело, человеческое антитело, гуманизованное антитело либо его функциональное производное, вариант или фрагмент, включая, без ограничения, Fab, Fab', F(ab')₂, Fc, Fv, scFv, минитело, диатело и однодоменное антитело типа нанотел из варибельного домена тяжелой цепи (V_H), варибельного домена легкой цепи (V_L) и верблюжьего варибельного домена (V_{Hнн}). В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен может связывать по меньшей мере один из Fab, Fab', F(ab')₂, Fc, Fv и scFv. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает Fc-домен антитела.

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает антитело, выбранное из группы, в которую входят: 20-(74)-(74) (милатузумаб, велтузумаб), 20-2b-2b, 3F8, 74-(20)-(20) (милатузумаб, велтузумаб), 8H9, A33, AB-16B5, абаговомаб, абциксимаб, абитузумаб, АБР 494 (биоаналог цетуксимаба), абрилумаб, АВТ-700, АВТ-806, актимаб-А (Ac-225 актиний-линтузумаб), актоксумаб, адалимумаб, АСC-1013, АDCT-301, АDCT-402, адекатумумаб, адуканумаб, афелимомаб, АFМ13, афутузумаб, АGЕN1884, АG515Е, АG516C3F, АG567Е, алацизумаб-пегол, АLD518, алемтузумаб, алирокумаб, алтумомаб пентетат, аматуксимаб, АМG 228, АМG 820, анатумомаб мафенатокс, анетумаб равтансин, анифролумаб, анрукинзумаб, АРN301, АРN311, аполизумаб, АРХ003/SIM-BD0801 (севацизумаб), АРХ005M, арцитумомаб, АRХ788, аскринвакумаб, аселизумаб, АSG-15ME, атезолизумаб, атинумаб, АТL101, алтизумаб (также известен как тоцилизумаб), аторолимумаб, авелумаб, В-701, бапинеузумаб, базиликсимаб, бавитуксимаб, ВAY1129980, ВAY1187982, бектумомаб, бегеломаб, белимумаб, бенрализумаб, бертилимумаб, бесилесомаб, беталутин (¹⁷⁷Lu-тетракетан-тегуломаб), бевацизумаб, BEVZ92 (биоаналог бевацизумаба), безлотоксумаб, ВGB-A317, ВHQ880, ВI 836880, ВI-505, бициромаб, бимагрумаб, бимекизумаб, биватузумаб мертансин, ВIW-8962, блинатумомаб, блосозумаб, ВMS-936559, ВMS-986012, ВMS-986016, ВMS-986148, ВMS-986178, ВNC101, бокоцизумаб, брентуксимаб ведотин, BrevaRex, бриакинумаб, бродалумаб, бролуцизумаб, бронтиктузумаб, С2-2b-2b, канакинумаб, кантузумаб мертансин, кантузумаб равтанзин, каплацизумаб, капромаб пендетид, карлумаб, катумаксомаб, иммуноконъюгат СBR96-доксорубицин, СВТ124 (бевацизумаб), СС-90002, СDХ-014, СDХ-1401, целделизумаб, цертолизумаб-пегол, цетуксимаб, СGЕN-15001Т, СGЕN-15022, СGЕN-15029, СGЕN-15049, СGЕN-15052, СGЕN-15092, Ch.14.18, цитатузумаб богатокс, циксутумумаб, клазакизумаб, кленоликсимаб, кливатузумаб тетракетан, СМ-24, кодритузумаб, колтуксимаб равтансин, конатумумаб, концизумаб, Cotara (I-131 йод-дерлотуксимаб-биотин), сR6261, кренезумаб, DA-3111 (биоаналог трастузумаба), дацетузумаб, даклизумаб, далотузумаб, дапиролизумаб-пегол, даратумумаб, даратумумаб Enhance (даратумумаб), дарлейкин, дектрекумаб, демцизумаб, денинтузумаб мафодотин, деносумаб, депатуксизумаб, депатуксизумаб мафодотин, дерлотуксимаб-биотин, детумомаб, DI-B4, динутуксимаб, диридавумаб, DKN-01, DMOT4039A, дорлимомаб аритокс, дрозитумаб, DS-1123, DS-8895, дулиготумаб, дупилумаб, дурвалумаб, дусигитумаб, экромексимаб, экулизумаб, эдобакомаб, эдреколомаб, эфализумаб, эфунгумаб, эдделумаб, элгемтумаб, элотузумаб, элсилимомаб, эмактузумаб, эмибетузумаб, энаватузумаб, энфортумаб ведотин, энлимомаб-пегол, эноблитузумаб, энокизумаб, энотикумаб, энситуксимаб, эпитумомаб цитуксетан, эпратузумаб, эрлизумаб, эртумаксомаб, этарацизумаб, этролизумаб, эвинакумаб, эволокумаб, эксбивирумаб, фанолесомаб, фаралимомаб, фарлетузумаб, фасинумаб, FBTA05, фелвизумаб, фезакинумаб, FF-21101, конъюгат антитело-препарат FGFR2, Fibromun, фиклатузумаб, фигитумумаб, фиривумаб, фланвотумаб, флетикумаб, фонтолизумаб, форалумаб, форавирумаб, FPA144, фресолимумаб, FS102, фулранумаб, футуксимаб, галиксимаб, ганитумаб, гантенерумаб, гавилимомаб, гемтузумаб озогамидин, герилимумаб, гевокизумаб, гирентуксимаб, глембатумумаб ведотин, GNR-006, GNR-011, голимумаб, гомиликсимаб, GSK2849330, GSK2857916, GSK3174998, GSK3359609, гуселкумаб, mAb Hu14.18K322A, hu3S193, Hu8F4, HuL2G7, HuMab-5B1, ибализумаб, ибритумомаб тиуксетан, икрукумаб, идаруцизумаб, IGN002, IGN523, иговомаб, IMAV362, IMAV362 (клаудиксимаб), ималумаб, IMC-CS4, IMC-D11, имциромаб, имгатузумаб, IMG529, IMMU-102 (Y-90 иттрий-этратузумаб тетракетан), IMMU-114, антагонистическое антитело ImmuTune IMP701, INCAGN1876, инклакумаб, INCSHR1210, индатуксимаб равтансин, индусатумаб ведотин, инфликсимаб, инолимомаб, инотузумаб озогамидин, интетумумаб, Iprafitcept, IPH4102, ипилимумаб, иратумумаб, исатуксимаб, истиратумаб, итолизумаб, иксекизумаб, JNJ-56022473, JNJ-61610588, келиксимаб, KTN3379, L191L2/L19TNF, лабетузумаб, лабетузумаб говитекан, LAG525, ламбролизумаб, лампализумаб, L-DOS47, лебрикизумаб, лемалесомаб, лензилумаб, лерделимумаб, лейкотуксимаб, лексатумумаб, либивирумаб, лифастузумаб ведотин, лигелизумаб, лилотомаб сатетракетан, линтузумаб, лирилумаб, LKZ145, лоделцизумаб, локиветмаб, лорвотузумаб мертансин, лука-

тумумаб, лулизумаб-пегол, люмиликсимаб, люмретузумаб, LY3164530, мапатумумаб, маргетуксимаб, маслимомаб, мартузумаб, маврилимумаб, MB311, MCS-110, MEDI0562, MEDI-0639, MEDI0680, MEDI-3617, MEDI-551 (инебилизумаб), MEDI-565, MEDI6469, меполизумаб, метелимумаб, MGB453, MGD006/S80880, MGD007, MGD009, MGD011, милатузумаб, милатузумаб-SN-38, минретумомаб, мирветуксимаб соравтанзин, митумомаб, МК-4166, ММ-111, ММ-151, ММ-302, могамулизумаб, MOR202, MOR208, MORAb-066, моролимумаб, мотавизумаб, моксетумомаб пасудотокс, муромонаб-CD3, наколомаб тафенатокс, намилумаб, наптумомаб эстафенатокс, нарнатумаб, натализумаб, небакумаб, нецитумумаб, немолизумаб, нерелимомаб, несвакумаб, нимотузумаб, ниволумаб, нофетумомаб мерпентан, NOV-10, обилтоксаксимаб, обинутузумаб, окаратузумаб, окрелизумаб, одулимомаб, офатумумаб, оларатумаб, олокизумаб, омализумаб, OMP-131R10, OMP-305B83, онартузумаб, онтуксизумаб, опицинумаб, опортузумаб монатокс, ореговомаб, ортикумаб, отеликсизумаб, отлертузумаб, OX002/MEN1309, окселумаб, озанезумаб, озорализумаб, пагибаксимаб, паливизумаб, панитумумаб, панкомаб, PankoMab-GEX, панобакумаб, парсатузумаб, пасколизумаб, пасотуксизумаб, патеклизумаб, патритумаб, PAT-SC1, PAT-SM6, пембролизумаб, пемтумомаб, перакизумаб, пертузумаб, пекселизумаб, PF-05082566 (утомилумаб), PF-06647263, PF-06671008, PF-06801591, пидилизумаб, пинатузумаб ведотин, пинтумомаб, плакулумаб, полатузумаб ведотин, понезумаб, приликсимаб, притоксаксимаб, притумумаб, PRO 140, Proxinium, PSMA ADC, квиллизумаб, ракотумомаб, радретумаб, рафивирумаб, ралпанцизумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, рефанезумаб, регавирумаб, REGN1400, REGN2810/SAR439684, реслизумаб, RFM-203, RG7356, RG7386, RG7802, RG7813, RG7841, RG7876, RG7888, RG7986, рилотумумаб, ринукумаб, ритуксимаб, RM-1929, RO7009789, робатумумаб, роледумаб, ромосозумаб, ронтализумаб, ровелизумаб, руплизумаб, сацитузумаб говитекан, самализумаб, SAR 408701, SAR566658, сарилумаб, SAT 012, сатумомаб пендетид, SCT200, SCT400, SEA-CD40, секукинумаб, серибантумаб, сетоксаксимаб, севирумаб, SGN-CD19A, SGN-CD19B, SGN-CD33A, SGN-CD70A, SGN-LIV1A, сибротузумаб, сифалимумаб, силтуксимаб, симтузумаб, сиплизумаб, сирукумаб, софитузумаб ведотин, соланезумаб, солитомаб, сонепцизумаб, сонтузумаб, стамулумаб, сулесомаб, сувизумаб, SYD985, SYM004 (футуксимаб и модотуксимаб), Sym015, TAB08, табалумаб, такатузумаб тетраксетан, тадоцизумаб, тализумаб, танезумаб, танибирумаб, таплитумомаб паптокс, тарекстумаб, TB-403, тефибазумаб, Teleukin, телимомаб аритокс, тенатумомаб, тенеликсимаб, теплизумаб, тепротумумаб, тесидолумаб, тегуломаб, TG-1303, TGN1412, конъюгат торий-227-эпратузумаб, тицилимумаб, тигатузумаб, тилдракизумаб, тисотумаб ведотин, TNX-650, тоцилизумаб, торализумаб, тосатоксумаб, тоситумомаб, товетумаб, тралокинумаб, трастузумаб, трастузумаб эмтансин, TRBS07, TRC105, трегализумаб, тремелимумаб, тревогрумаб, TRPH 011, TRX518, TSR-042, TTI-200.7, тукотузумаб целмолейкин, тувирумаб, U3-1565, U3-1784, ублитуксимаб, улокуплумаб, урелумаб, уртоксазумаб, устекинумаб, вадастуксимаб Talirine, вандортузумаб ведотин, ванктикумаб, вануцизумаб, вапаликсимаб, варлилумаб, вателизумаб, VB6-845, ведолизумаб, велтузумаб, вепалимомаб, весенкумаб, висилизумаб, волоциксимаб, ворсетузумаб мафодотин, вотумумаб, YYB-101, залутумумаб, занолимумаб, затуксимаб, зиралимумаб и золимомаб аритокс. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает Fc-домен вышеприведенного антигена. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает антиген, которое в свою очередь связывает антиген, выбранный из группы, в которую входят: β -амилоид 1-40, 4-1BB, 5AC, 5T4, киназа-1 типа рецептора активина, ACVR2B, антиген аденокарциномы, AGS-22M6, альфа-фетопротеин, ангиопоэтин 2, ангиопоэтин 3, сибирезвенный токсин, AOC3 (VAP-1), B7-H3, токсин Bacillus anthracis, BAFF, бета-амилоид, клетки В-лимфомы, антиген C242, C5, CA-125, IL31 собаки (Canis lupus familiaris), карбоангидраза 9 (CA-IX), сердечный миозин, CCL11 (эотаксин-1), CCR4, CCR5, CD11, CD18, CD125, CD140a, CD147 (базигин), CD15, CD152, CD154 (CD40L), CD19, CD2, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23 (рецептор IgE), CD25 (α -цепь рецептора IL-2), CD27, CD274, CD28, CD3, CD3-эпсилон, CD30, CD33, CD37, CD38, CD4, CD40, лиганд CD40, CD41, CD44 v6, CD5, CD51, CD52, CD56, CD6, CD70, CD74, CD79B, CD80, SEA, родственный SEA антиген, CFD, ch4D5, CLDN18.2, Clostridium difficile, фактор слипания A, CSF1R, CSF2, CTLA-4, рецептор-4 хемокинов типа C-X-C, цитомегаловирус, гликопротеин В цитомегаловируса, дабигатран, DLL4, DPP4, DR5, шигатоксин E. coli 1 типа, шигатоксин E. coli 2 типа, EGFL7, EGFR, эндотоксин, ЕрсАМ, эписиалин, ERBB3, Escherichia coli, F-белок респираторно-синцитиального вируса, FAP, бета-цепь фибрина II, дополнительный домен-В фибронектина, фолатгидролаза, рецептор фолата 1, альфа-рецептор фолата, рецептор Frizzled, ганглиозид GD2, GD2, ганглиозид GD3, глипикан 3, α -цепь рецептора GMCSF, GPNMB, фактор роста и дифференцировки 8, GUCY2C, гемагглютинин, поверхностный антиген гепатита В, вирус гепатита В, FIERI, HER2/neu, HER3, HGF, HNGFR, гистоновый комплекс, HIV-1, HLA-DR, HNGF, Hsp90, киназа рецептора фактора роста гепатоцитов (scatter factor) человека, TNF человека, бета-амилоид человека, ICAM-1 (CD54), IFN- α , IFN- γ , IgE, Fc-область IgE, рецептор IGF-1, IGF-1, IGHE, IL 17A, IL 17F, IL 20, IL-12, IL-13, IL-17, IL-1 β , IL-22, IL-23, IL-31RA, IL-4, IL-5, IL-6, рецептор IL-6, IL-9, IGF2, гемагглютинин вируса гриппа А, рецептор инсулиноподобного фактора роста I, интегрин $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 4$ -интегрин, интегрин $\alpha 5\beta 1$, интегрин $\alpha 7\beta 7$, интегрин $\alpha IIb\beta 3$, интегрин $\alpha v\beta 3$, рецептор α/β -интерферона, индуцируемый γ -интерфероном белок, ITGA2, ITGB2 (CD18), KIR2D, антиген Lewis-Y, LFA-1 (CD11a), LINGO-1, липотейхоевая кислота, LOXL2, L-селектин (CD62L), LTA, MCP-1,

мезотелин, MIF, MS4A1, MSLN, MUC1, CanAg муцина, связанный с миелином гликопротеин, миостатин, NCA-90 (антиген гранулоцитов), регулируемая апоптозом невральная протеиназа 1, NGF, N-гликолилейраминаовая кислота, NOGO-A, рецептор Notch, NRP1, *Oryctolagus cuniculus*, OX-40, oxLDL, PCSK9, PD-1, PDCD1, PDGF-R α , котранспортер фосфата-натрия, фосфатидилсерин, бета-рецептор тромбоцитарного фактора роста, клетки карциномы простаты, *Pseudomonas aeruginosa*, гликопротеин вируса бешенства, RANKL, респираторно-синцитиальный вирус, RHD, резус-фактор, RON, RTN4, склеростин, SDC1, селектин P, SLAMF7, SOST, сфингозин-1-фосфат, *Staphylococcus aureus*, STEAP1, TAG-72, Т-клеточный рецептор, TEM1, тенасцин С, TFPI, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β , TNF- α , TRAIL-R1, TRAIL-R2, опухолевый антиген СТАА16.88, опухолеспецифичный гликозилированный MUC1, связанный с опухолями передатчик кальциевых сигналов 2, рецептор TWEAK, TYRP1 (гликопротеин 75), VEGFA, VEGFR1, VEGFR2, виментин и VWF.

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен может связывать миметик антигена. Миметики антител, как описано здесь в другом месте, могут связывать молекулы мишени со сродством, сравнимым с антителом. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен может связывать гуманизованное антитело, как описано здесь в другом месте. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен химерного полипептида трансмембранного рецептора может связывать фрагмент гуманизированного антитела. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен может связывать одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает Fc-область иммуноглобулина (например, IgG, IgA, IgM или IgE) подходящего млекопитающего (например, человека, мыши, крысы, козы, овцы или обезьяны). Подходящий Fc связывающий домен может происходить из встречающегося в природе белка типа Fc-рецептора млекопитающих или некоторых бактериальных белков (например, белка А и белка G). Кроме того, Fc-связывающий домен может представлять собой синтетический полипептид, специально сконструированный для связывания Fc-области любой из описанных здесь молекул Ig с требуемым сродством и специфичностью. Например, такой Fc-связывающий домен может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает Fc-область иммуноглобулина. Примеры включают, без ограничения, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), однодоменные антитела и нанотела. С другой стороны, Fc-связывающий домен может представлять собой синтетический пептид, который специфически связывает Fc-область, как-то домен Kunitz, небольшой модульный иммунофармацевтический препарат (SMIP), аднектин, авимер, аффитело, DARPIn или антикалин, которые можно идентифицировать при скрининге библиотеки пептидов на связывание с Fc.

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен включает Fc-связывающий домен, содержащий внеклеточный лиганд-связывающий домен Fc-рецептора млекопитающих. Fc-рецепторы, как правило, это рецепторы клеточной поверхности, которые экспрессируются на поверхности многих иммунных клеток (включая В-клетки, дендритные клетки, клетки естественных киллеров (NK), макрофаги, нейтрофилы, тучные клетки и эозинофилы) и обладают специфичностью связывания к Fc-домену антител. В некоторых случаях связывание Fc-рецептора с Fc-областью антител может запускать эффекты антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Fc-рецептор, используемый для конструирования описанного здесь химерного полипептида трансмембранного рецептора, может быть природным полиморфным вариантом типа варианта с измененным (например, повышенным или пониженным) сродством к Fc-домену по сравнению с представителем дикого типа. С другой стороны, Fc-рецептор может быть функциональным вариантом представителя дикого типа, несущим одну или несколько мутаций (например, до 10 замен аминокислотных остатков), изменяющих сродство связывания с Fc-областью молекулы Ig. В некоторых воплощениях мутация может изменять профиль гликозилирования Fc-рецептора и тем самым сродство связывания с Fc-доменом.

В табл. 1 приведен ряд типичных полиморфизмов во внеклеточных доменах Fc-рецептора (например, см. Kim et al., *J. Mol. Evol.*, 53: 1-9, 2001).

Таблица 1. Типичные полиморфизмы у Fc-рецепторов

Номер аминокислоты	19	48	65	89	105	130	134	141	142	158
FCR10	R	S	D	I	D	G	F	Y	T	V
P08637	R	S	D	I	D	G	F	Y	I	F
S76824	R	S	D	I	D	G	F	Y	I	V
J04162	R	N	D	V	D	D	F	H	I	V
M31936	S	S	N	I	D	D	F	H	I	V
M24854	S	S	N	I	E	D	S	H	I	V
X07934	R	S	N	I	D	D	F	H	I	V
X14356 (Fc γ RII)	N	N	N	S	E	S	S	S	I	I
M31932 (Fc γ RI)	S	T	N	R	E	A	F	T	I	G
X06948 (Fc α 1)	R	S	E	S	Q	S	E	S	I	V

Fc-рецепторы обычно классифицируют на основании изотипа антител, с которыми они способны связываться. Например, рецепторы Fc-гамма (Fc γ R) обычно связываются с антителами типа IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4); рецепторы Fc-альфа (Fc α R) обычно связываются с антителами типа IgA; а

рецепторы Fc-эпсилон (FcεR) обычно связываются с антителами типа IgE. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен включает рецептор Fcγ либо его производное, вариант или фрагмент. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен содержит Fc-связывающий домен, содержащий FcR, выбранный из FcγRI (CD64), FcγRIa, FcγRIb, FcγRIc, FcγRIIA (CD32), включая аллотипы H131 и R131, FcγRIIB (CD32), включая FcγRIIB-1 и FcγRIIB-2, FcγRIIA (CD16a), включая аллотипы V158 и F158, FcγRIIB (CD16b), включая аллотипы FcγRIIB-NA1 и FcγRIIB-NA2, их производных, вариантов и фрагментов. FcγR может происходить из любого организма, включая, без ограничения, людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян. FcγR мыши включают, без ограничения, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) и FcγRIII-2 (CD16-2). В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен включает рецептор Fcε либо его производное, вариант или фрагмент. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен включает FcR, выбранный из FcRI, FcRRII (CD23), их производных, вариантов и фрагментов. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен включает рецептор Fcα либо его производное, вариант или фрагмент. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен включает FcR, выбранный из FcαRI (CD89), Fcα/μR, их производных, вариантов и фрагментов. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен включает FcR, выбранный из FcRn, его производных, вариантов и фрагментов. Выбор лиганд-связывающего домена Fc-рецептора для химерных полипептидов трансмембранного рецептора может зависеть от различных факторов, как-то изотипа антитела, с которым должен связываться Fc-связывающий домен, и требуемого средства при связывающем взаимодействии.

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен содержит внеклеточный лиганд-связывающий домен CD16, который может включать в себя природный полиморфизм, который может модулировать сродство к Fc-домену. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен содержит внеклеточный лиганд-связывающий домен CD16, включающий полиморфизм в положении 158 (например, валин или фенилаланин). В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен получают в условиях, которые изменяют его степень гликозилирования и его сродство к Fc-домену. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен содержит внеклеточный лиганд-связывающий домен CD16, включающий модификации, которые делают содержащий их химерный полипептид трансмембранного рецептора специфичным для подмножества антител типа IgG.

Например, могут быть включены мутации, которые повышают или понижают сродство к подтипу IgG (например, IgG1). В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен содержит внеклеточный лиганд-связывающий домен CD32, который может включать природный полиморфизм, модулирующий сродство к Fc-домену. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен содержит внеклеточный лиганд-связывающий домен CD32, включающий модификации, которые делают содержащий их химерный полипептид трансмембранного рецептора специфичным для подмножества антител типа IgG. Например, могут быть включены мутации, которые повышают или снижают сродство к подтипу IgG (например, IgG1).

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен содержит внеклеточный лиганд-связывающий домен CD64, который может включать природный полиморфизм, модулирующий сродство к Fc-домену. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен получают в условиях, которые изменяют его степень гликозилирования и его сродство к Fc-домену. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен содержит внеклеточный лиганд-связывающий домен CD64, включающий модификации, которые делают содержащий их химерный полипептид трансмембранного рецептора специфичным для подмножества антител типа IgG. Например, могут быть включены мутации, которые повышают или снижают сродство к подтипу IgG (например, IgG1).

В других воплощениях взаимодействующий с антигеном домен включает природный бактериальный белок, который способен связываться с Fc-областью молекул IgG, либо его производное, вариант или фрагмент (например, белок А, белок G). В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен включает белок А либо его производное, вариант или фрагмент. Белок А - это поверхностный белок 42 кДа, первоначально обнаруженный в клеточной стенке бактерий *Staphylococcus aureus*. Он состоит из пяти доменов, каждый из которых укладывается в пучок из трех спиралей и может связываться с IgG посредством взаимодействия с Fc-областью большинства антител, а также с Fab-фрагментом антител семейства V_H3 человека. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен включает белок G либо его производное, вариант или фрагмент. Белок G - это белок примерно в 60 кДа, который экспрессируется в стрептококковых бактериях группы С и G, который связывается как с Fab, так и с Fc-областью IgG млекопитающих. Хотя нативный белок G также связывает альбумин, однако были разработаны рекомбинантные варианты, которые лишены связывания с альбумином.

Взаимодействующие с антигеном домены также могут быть созданы de novo методами комбинаторной биологии или направленной эволюции. Начиная с белкового каркаса (например, scFv, происходящего из IgG, домена Kunitz, полученного из ингибитора протеаз типа Kunitz, повтора анкирина, домена Z из белка А, липокалина, домена фибронектина III типа, домена SH3 из Fyn и др.), можно случайным образом заменять боковые цепи аминокислот у набора остатков на поверхности с тем, чтобы получить

большую библиотеку вариантных каркасов. Из больших библиотек можно выделить варианты, обладающие сродством к мишени типа Fc-домена, сначала отбирая по связыванию, а затем проводя амплификацию методом фагового, рибосомного или клеточного дисплея. Для выделения таких белков с наибольшим сродством к мишени можно использовать повторные циклы отбора и амплификации. Типичные Fc-связывающие пептиды могут содержать аминокислотную последовательность ETQRCTWHMELVWEREREHN (SEQ ID NO: 19), KEASCSYWLGVWCVAGVE (SEQ ID NO: 20) или DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO: 21).

Какой-нибудь из описанных здесь Fc-связывающих пептидов может обладать подходящим сродством связывания к Fc-доменам антител. Сродством связывания именуется кажущаяся константа ассоциации или K_A . Значение K_A является обратной величиной константы диссоциации K_D . Внеклеточный лигандсвязывающий домен из домена Fc-рецептора описанных здесь химерных полипептидов трансмембранного рецептора может обладать сродством связывания с Fc-областью антител со значением K_D по меньшей мере 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} или еще меньше. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен, который связывается с Fc-областью антител, обладает высоким сродством связывания для антитела, изотипа антител или их подтипа по сравнению со сродством связывания взаимодействующего с антигеном домена с другим антителом, изотипом антител или их подтипом.

В некоторых воплощениях внеклеточный лигандсвязывающий домен Fc-рецептора обладает специфичностью к одному антителу, изотипу антител или их подтипу по сравнению со связыванием внеклеточного лигандсвязывающего домена Fc-рецептора с другим антителом, изотипом антител или их подтипом. Fc γ -рецепторы с относительно высоким сродством связывания включают CD64A, CD64B и CD64C. Fc μ -рецепторы с относительно низким сродством связывания включают CD32A, CD32B, CD16A и CD16B. Fc ϵ -рецептор с относительно высоким сродством связывания - FcRI, а Fc ϵ -рецептор с относительно низким сродством связывания - Fc ϵ RII/CD23.

Сродство связывания или специфичность связывания для Fc-рецептора либо его производного, варианта или фрагмента или же для химерного полипептида трансмембранного рецептора, содержащего Fc-связывающий домен, можно определить различными методами, включая равновесный диализ, равновесное связывание, гель-фильтрацию, ELISA, поверхностный плазмонный резонанс и спектроскопию.

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен, содержащий внеклеточный лиганд-связывающий домен Fc-рецептора, имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% (например, на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше) идентична аминокислотной последовательности внеклеточного лиганд-связывающего домена природного Fc μ -рецептора, Fc α -рецептора, Fc ϵ -рецептора или FcRn. "Степень идентичности" или "% идентичности" двух аминокислотных последовательностей можно определить с помощью алгоритма Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, в модификации Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993. Такой алгоритм встроен в программы NBLAST и XBLAST (версия 2.0) по Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. Поиск по белкам BLAST может выполняться с помощью программы XBLAST, оценка = 50, длина слова = 3, получая аминокислотные последовательности, гомологичные молекулам белков по изобретению. Если между двумя последовательностями существуют пробелы, то можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402, 1997. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен включает Fc-связывающий домен, содержащий вариант внеклеточного лиганд-связывающего домена Fc-рецептора. В некоторых воплощениях вариант внеклеточного лиганд-связывающего домена Fc-рецептора может содержать до 10 вариаций аминокислотных остатков (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) относительно аминокислотной последовательности эталонного внеклеточного лиганд-связывающего домена. В некоторых воплощениях вариант может быть природным вариантом вследствие полиморфизма гена. В других воплощениях вариант может быть неестественной модифицированной молекулой. Например, во внеклеточный лиганд-связывающий домен Fc-рецептора можно вводить мутации для изменения его профиля гликозилирования и тем самым его сродства связывания с соответствующим Fc-доменом.

В некоторых примерах взаимодействующий с антигеном домен содержит Fc-связывающий домен, включающий Fc-рецептор, выбранный из CD16A, CD16B, CD32A, CD32B, CD32C, CD64A, CD64B, CD64C или их вариантов, фрагментов или производных, как описано здесь. Внеклеточный лиганд-связывающий домен Fc-рецептора может содержать до 10 вариаций аминокислотных остатков (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) относительно аминокислотной последовательности внеклеточного лиганд-связывающего домена CD16A, CD16B, CD32A, CD32B, CD32C, CD64A, CD64B, CD64C, как описано здесь. Мутации аминокислотных остатков внеклеточного лиганд-связывающего домена Fc-рецептора могут приводить к повышению сродства связывания для домена Fc-рецептора при связывании с антителом, изотипом антител или их подтипом относительно доменов Fc-рецептора, не содержащих мутаций. Например, мутация остатка 158 рецептора Fc-гамма CD16A может привести к повышению сродства связывания Fc-рецептора с Fc-областью антител. В некоторых воплощениях мутация представляет собой

замену фенилаланина на валин у остатка 158 Fc γ -рецептора CD16A. Можно делать различные подходящие альтернативные или дополнительные мутации во внеклеточном лиганд-связывающем домене Fc-рецептора, которые могут повышать или уменьшать сродство связывания с Fc-областью таких молекул, как антитела.

Внеклеточная область, содержащая взаимодействующий с антигеном домен, может соединяться с внутриклеточной областью, к примеру, при помощи пронизывающего мембрану сегмента. В некоторых воплощениях пронизывающий мембрану сегмент включает полипептид. Пронизывающий мембрану полипептид, соединяющий внеклеточную область и внутриклеточную область химерного трансмембранного рецептора, может иметь любую подходящую полипептидную последовательность. В некоторых случаях пронизывающий мембрану полипептид содержит полипептидную последовательность пронизывающей мембрану части эндогенного пронизывающего мембрану белка или белка дикого типа. В некоторых воплощениях пронизывающий мембрану полипептид имеет полипептидную последовательность, содержащую по меньшей мере 1 (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше) аминокислотную замену, делецию или вставку по сравнению с пронизывающей мембрану частью эндогенного пронизывающего мембрану белка или белка дикого типа. В некоторых воплощениях пронизывающий мембрану полипептид содержит неприродную полипептидную последовательность типа последовательности полипептидного линкера. Полипептидный линкер может быть гибким или жестким. Полипептидный линкер может быть структурированным или неструктурированным. В некоторых воплощениях пронизывающий мембрану полипептид передает сигнал из внеклеточной области во внутриклеточную область рецептора, к примеру, сигнал, означающий связывание лиганда.

Сигнальный домен иммунной клетки во внутриклеточной области химерного полипептида трансмембранного рецептора рассматриваемой системы может содержать первичный сигнальный домен. Первичным сигнальным доменом может быть любой сигнальный домен либо его производное, вариант или фрагмент, вовлеченный в сигнализацию иммунных клеток. Например, сигнальный домен может участвовать в регуляции первичной активации комплекса TCR стимулирующим образом либо ингибирующим образом. Первичный сигнальный домен может включать в себя сигнальный домен Fc γ -рецептора (Fc γ R), Fc ϵ -рецептора (Fc ϵ R), Fc α -рецептора (Fc α R), неонатального Fc-рецептора (FcRn), CD3, CD3 ζ , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD4, CD5, CD8, CD21, CD22, CD28, CD32, CD40L (CD154), CD45, CD66d, CD79a, CD79b, CD80, CD86, CD278 (также известен как ICOS), CD247 ζ , CD247 η , DAP10, DAP12, FYN, LAT, Lck, MAPK, комплекса MHC, NFAT, NF- κ B, PLC- γ , iC3b, C3dg, C3d или Zap70. В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит активационный мотив иммунорецептора на основе тирозина или ITAM. Первичный сигнальный домен, содержащий ITAM, может содержать два повтора аминокислотной последовательности YxxL/I, разделенных 6-8 аминокислотами, где каждый x независимо означает любую аминокислоту, производящую консервативный мотив YxxL/I₍₆₋₈₎YxxL/I. Первичный сигнальный домен, содержащий ITAM, может быть модифицирован, к примеру, посредством фосфорилирования, когда взаимодействующий с антигеном домен связывается с антигеном. Фосфорилированный ITAM может функционировать в качестве места посадки для других белков, к примеру, белков, участвующих в различных путях сигнализации. В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит модифицированный домен ITAM, например, мутированный, укороченный и/или оптимизированный домен ITAM с измененной (например, повышенной или пониженной) активностью по сравнению с нативным доменом ITAM.

В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит сигнальный домен Fc γ R (например, ITAM). Сигнальный домен Fc γ R может быть выбран из Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA (CD32), Fc γ RIIB (CD32), Fc γ RIIA (CD16a) и Fc γ RIIB (CD16b). В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит сигнальный домен Fc ϵ R (например, ITAM). Сигнальный домен Fc ϵ R может быть выбран из Fc ϵ RI и Fc ϵ RII (CD23). В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит сигнальный домен Fc α R (например, ITAM). Сигнальный домен Fc α R может быть выбран из Fc α RI (CD89) и Fc α / μ R. В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3 ζ . В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит ITAM CD3 ζ .

В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит ингибиторный мотив иммунорецептора на основе тирозина или ITIM. Содержащий ITIM первичный сигнальный домен может содержать консервативную последовательность аминокислот (S/I/V/LxYxxI/V/L), которая встречается в цитоплазматических хвостах некоторых ингибиторных рецепторов иммунной системы. Содержащий ITIM первичный сигнальный домен может быть модифицирован, например, фосфорилирован такими ферментами, как представители семейства киназ Src (например, Lck). После фосфорилирования в ITIM могут рекрутироваться и другие белки, в том числе ферменты. К таким другим белкам относятся, без ограничения, ферменты типа фосфотирозиновых фосфатаз SHP-1 и SHP-2, инозитол-фосфатазы SHIP и белков, содержащих один или несколько доменов SH2 (например, ZAP70). Первичный сигнальный домен может содержать сигнальный домен (например, ITIM) BTLA, CD5, CD31, CD66a, CD72, CMRF35H, DCIR, EPO-R, Fc γ RIIB (CD32), белка-2 типа Fc-рецептора (FCRL2), белка-3 типа Fc-рецептора (FCRL3), белка-4 типа Fc-рецептора (FCRL4), белка-5 типа Fc-рецептора (FCRL5), белка-6 типа Fc-рецептора (FCRL6), белка

G6b (G6B), рецептора интерлейкина-4 (IL4R), связанного с транслокацией рецептора-1 из надсемейства иммуноглобулинов (IRTA1), связанного с транслокацией рецептора-2 из надсемейства иммуноглобулинов (IRTA2), рецептора 2DL1 типа иммуноглобулина клеток-киллеров (KIR2DL1), рецептора 2DL2 типа иммуноглобулина клеток-киллеров (KIR2DL2), рецептора 2DL3 типа иммуноглобулина клеток-киллеров (KIR2DL3), рецептора 2DL4 типа иммуноглобулина клеток-киллеров (KIR2DL4), рецептора 2DL5 типа иммуноглобулина клеток-киллеров (KIR2DL5), рецептора 3DL1 типа иммуноглобулина клеток-киллеров (KIR3DL1), рецептора 3DL2 типа иммуноглобулина клеток-киллеров (KIR3DL2), представителя-1 подсемейства В рецепторов типа иммуноглобулина лейкоцитов (LIR1), представителя-2 подсемейства В рецепторов типа иммуноглобулина лейкоцитов (LIR2), представителя-3 подсемейства В рецепторов типа иммуноглобулина лейкоцитов (LIR3), представителя-5 подсемейства В рецепторов типа иммуноглобулина лейкоцитов (LIR5), представителя-8 подсемейства В рецепторов типа иммуноглобулина лейкоцитов (LIR8), лейкоцитарного рецептора-1 типа иммуноглобулина (LAIR-1), связанного с функцией тучных клеток антигена (MAFA), NKG2A, запускающего естественную цитотоксичность рецептора-2 (NKp44), NTB-A, белка-1 запрограммированной клеточной смерти (PD-1), PILR, SIGLECL1, связывающего сиаловую кислоту Ig-подобного лектина-2 (SIGLEC2 или CD22), связывающего сиаловую кислоту Ig-подобного лектина-3 (SIGLEC3 или CD33), связывающего сиаловую кислоту Ig-подобного лектина-5 (SIGLEC5 или CD170), связывающего сиаловую кислоту Ig-подобного лектина-6 (SIGLEC6), связывающего сиаловую кислоту Ig-подобного лектина-7 (SIGLEC7), связывающего сиаловую кислоту Ig-подобного лектина-10 (SIGLEC10), связывающего сиаловую кислоту Ig-подобного лектина-11 (SIGLEC11), связывающего сиаловую кислоту Ig-подобного лектина-4 (SIGLEC4), связывающего сиаловую кислоту Ig-подобного лектина-8 (SIGLEC8), связывающего сиаловую кислоту Ig-подобного лектина-9 (SIGLEC9), молекулы адгезии-1 тромбоцитов и эндотелиальных клеток (PECAM-1), сигнально-регуляторного белка (SIRP 2) и регулирующего порог сигнализации трансмембранного адаптера 1 (SIT). В некоторых воплощениях первичный сигнальный домен содержит модифицированный домен ITIM, например, мутированный, укороченный и/или оптимизированный домен ITIM с измененной (например, повышенной или пониженной) активностью по сравнению с нативным доменом ITIM.

В некоторых воплощениях сигнальный домен иммунной клетки содержит несколько первичных сигнальных доменов. Например, сигнальный домен иммунной клетки может содержать по меньшей мере 2 первичных сигнальных домена, например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 или 10 первичных сигнальных доменов. В некоторых воплощениях сигнальный домен иммунной клетки содержит по меньшей мере 2 домена ITAM (например, по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 доменов ITAM). В некоторых воплощениях сигнальный домен иммунной клетки содержит по меньшей мере 2 домена ITIM (например, по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 доменов ITIM) (например, по меньшей мере 2 первичных сигнальных домена). В некоторых воплощениях сигнальный домен иммунной клетки содержит и домены ITAM, и домены ITIM.

Сигнальный домен иммунной клетки во внутриклеточной области химерного полипептида трансмембранного рецептора может включать и костимулирующий домен. В некоторых воплощениях костимулирующий домен, к примеру, из костимулирующей молекулы, может обеспечивать костимулирующие сигналы для сигнализации иммунной клетки типа сигнализации из доменов ITAM и/или ITIM, например, для активации и/или дезактивации иммунных клеток. В типичной конфигурации химерного полипептида трансмембранного рецептора, приведенной на фиг. 2, сигнальный домен иммунной клетки 202 содержит первичный сигнальный домен 202a и по меньшей мере один костимулирующий домен 202b. Внутриклеточная область рецептора также включает в себя GMP, содержащий исполнительный элемент 203, соединенный с сайтом распознавания расщепления 204. В некоторых воплощениях костимуляторный домен функционирует, регулируя сигнал пролиферации и/или выживания в иммунных клетках. В некоторых воплощениях костимулирующий сигнальный домен включает в себя сигнальный домен белка MHC класса I, белка MHC класса II, белка рецептора TNF, белка типа иммуноглобулина, рецептора цитокина, интегрин, сигнальной молекулы активации лейкоцитов (белка SLAM), активирующего NK-клетки рецептора, BTLA или рецептора Toll-лиганда. В некоторых воплощениях костимулирующий домен включает сигнальный домен из молекулы, выбранной из группы, в которую входят: 2B4/CD244/SLAMF4, 4-1BB/TNFSF9/CD137, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BAFFR/TNFRSF13C, BAFF/BLyS/TNFSF13B, BLAME/SLAMF8, BTLA/CD272, CD100 (SEMA4D), CD103, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD150, CD160 (BY55), CD18, CD19, CD2, CD200, CD229/SLAMF3, лиганд CD27/TNFSF7, CD27/TNFRSF7, CD28, CD29, CD2F-10/SLAMF9, лиганд CD30/TNFSF8, CD30/TNFRSF8, CD300a/LMIR1, CD4, лиганд CD40/TNFSF5, CD40/TNFRSF5, CD48/SLAMF2, CD49a, CD49D, CD49f, CD53, CD58/LFA-3, CD69, CD7, CD8 α , CD8 β , CD82/Kai-1, CD84/SLAMF5, CD90/Thy1, CD96, CDS, CEACAM1, CRACC/SLAMF7, CRTAM, CTLA-4, DAP12, дектин-1/CLEC7A, DNAM1 (CD226), DPPIV/CD26, DR3/TNFRSF25, EphB6, GADS, Gi24/VISTA/B7-H5, лиганд GITR/ TNFSF18, GITR/TNFRSF18, HLA класса I, HLA-DR, HVEM/TNFRSF14, IA4, ICAM-1, ICOS/CD278, Ikaros, IL2R β , IL2R γ , IL7R α , интегрин α 4/CD49d, интегрин α 4 β 1, интегрин α 4 β 7/LPAM-1, IPO-3, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB1, ITGB2, ITGB7, KIRDS2, LAG-

3, LAT, LIGHT/TNFSF14, LTBR, Ly108, Ly9 (CD229), связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), лимфотоксин- α /TNF- β , NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), NTB-A/SLAMF6, лиганд OX40/TNFSF4, OX40/TNFRSF4, PAG/Cbp, PD-1, PDCD6, PD-L2/B7-DC, PSGL1, RELT/TNFRSF19L, SELPLG (CD162), SLAM (SLAMF1), SLAM/CD150, SLAMF4 (CD244), SLAMF6 (NTB-A), SLAMF7, SLP-76, TACI/TNFRSF13B, TCL1A, TCL1B, TIM-1/KIM-1/HAVCR, TIM-4, TL1A/TNFSF15, TNFR1/TNFRSF1B, TNF- α , TRANCE/RANKL, TSLP, TSLPR, VLA1 и VLA-6. В некоторых воплощениях сигнальный домен иммунной клетки содержит несколько костимулирующих доменов, к примеру, по меньшей мере 2, например, по меньшей мере 3, 4 или 5 костимулирующих доменов.

Сигнальный домен иммунной клетки может соединяться с ген-модулирующим полипептидом (GMP). GMP может содержать исполнительный элемент, соединенный с сайтом распознавания расщепления. Исполнительный элемент может включать нуклеазу (например, ДНК-нуклеазу и/или РНК-нуклеазу), модифицированную нуклеазу (например, ДНК-нуклеазу и/или РНК-нуклеазу), лишённую нуклеазной активности или обладающую меньшей нуклеазной активностью по сравнению с нуклеазой дикого типа, её производное, вариант или фрагмент. Исполнительный элемент может регулировать экспрессию и/или активность гена или редактировать последовательность нуклеиновой кислоты (например, гена и/или продукта гена). В некоторых воплощениях исполнительный элемент включает в себя ДНК-нуклеазу типа генно-инженерной (например, программируемой или наводимой) ДНК-нуклеазы, чтобы запускать геномное редактирование последовательности ДНК-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент включает в себя РНК-нуклеазу типа генно-инженерной (например, программируемой или наводимой) РНК-нуклеазы, чтобы запускать геномное редактирование последовательности РНК-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент обладает пониженной или минимальной нуклеазной активностью. Исполнительный элемент с пониженной или минимальной нуклеазной активностью может регулировать экспрессию и/или активность гена путем создания физических препятствий полинуклеотида-мишени или привлечения дополнительных факторов для эффективного подавления или усиления экспрессии полинуклеотида-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит безнуклеазный ДНК-связывающий белок, происходящий из ДНК-нуклеазы, который может индуцировать активацию или репрессию транскрипции последовательности ДНК-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит безнуклеазный РНК-связывающий белок, происходящий из РНК-нуклеазы, который может индуцировать активацию или репрессию транскрипции последовательности РНК-мишени. Исполнительный элемент может регулировать экспрессию или активность гена и/или редактировать последовательность нуклеиновой кислоты независимо от того, экзогенная она или эндогенная.

В исполнительных элементах может использоваться любая подходящая нуклеаза. К подходящим нуклеазам относятся, без ограничения, CRISPR-ассоциированные (Cas) белки или Cas-нуклеазы, в том числе CRISPR-ассоциированные (Cas) полипептиды I типа, CRISPR-ассоциированные (Cas) полипептиды II типа, CRISPR-ассоциированные (Cas) полипептиды III типа, CRISPR-ассоциированные (Cas) полипептиды IV типа, CRISPR-ассоциированные (Cas) полипептиды V типа и CRISPR-ассоциированные (Cas) полипептиды VI типа; нуклеазы с "цинковым пальцем" (ZFN); эффекторные нуклеазы типа активаторов транскрипции (TALEN); мегануклеазы; РНК-связывающие белки (RBP); CRISPR-ассоциированные РНК-связывающие белки; рекомбиназы; флиппазы; транспозазы; белки Argonaute; их производные, варианты или фрагменты.

Регуляция генов может относиться к любым генам, представляющим интерес. Предусматривается, что это охватывает и генетические гомологи описанных здесь генов. Например, ген может проявлять определенную степень идентичности и/или гомологии с описанными здесь генами. Так, предусматривается, что можно модифицировать гены, которые проявляют гомологичность на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (на уровне нуклеиновой кислоты или белка). Также предусматривается, что можно модифицировать гены, которые проявляют идентичность на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (на уровне нуклеиновой кислоты или белка).

В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит CRISPR-ассоциированный (Cas) белок или Cas-нуклеазу, которая функционирует в неприродной системе CRISPR (Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas (CRISPR-associated). У бактерий эта система может обеспечивать адаптивный иммунитет к чужеродной ДНК (Barrangou R. et al. "CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes" *Science* (2007) 315: 1709-1712; Makarova K.S. et al. "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems" *Nat Rev Microbiol.* (2011) 9:467-477; Garneau J.E. et al. "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA" *Nature* (2010) 468:67-71; Sapranauskas R. et al. "The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*" *Nucleic Acids Res* (2011) 39: 9275-9282).

У самых различных организмов, включая разнообразных млекопитающих, животных, растений и дрожжей, система CRISPR/Cas (например, модифицированная и/или немодифицированная) может ис-

пользоваться в качестве инструмента инженерии генома. Система CRISPR/Cas может содержать направляющую нуклеиновую кислоту типа направляющей РНК (гидРНК) в комплексе с Cas-белком для направленной регуляции экспрессии и/или активности гена-мишени или редактирования нуклеиновой кислоты-мишени. Направляемый РНК Cas-белок (например, Cas-нуклеаза типа нуклеазы Cas9) может специфически связывать полинуклеотид-мишень (например, ДНК) зависимым от последовательности образом. Cas-белки, если они обладают нуклеазной активностью, могут расщеплять ДНК (Gasiunas G. et al. "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria" *Proc Natl Acad Sci USA* (2012) 109: E2579-E2 86; Jinek M. et al. "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity" *Science* (2012) 337:816-821; Sternberg S.H. et al. "DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9" *Nature* (2014) 507:62; Deltcheva E. et al. "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III" *Nature* (2011) 471:602-607) и широко применяются для программируемого редактирования генома у различных организмов и в модельных системах (Cong L. et al. "Multiplex genome engineering using CRISPR Cas systems" *Science* (2013) 339:819-823; Jiang W. et al. "RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems" *Nat. Biotechnol.* (2013) 31: 233-239; Sander J.D. & Joung J.K. "CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes" *Nature Biotechnol.* (2014) 32:347-355).

В некоторых случаях Cas-белок подвергается мутации и/или модификации, образуя дефектный по нуклеазе белок или белок с пониженной нуклеазной активностью по сравнению с Cas-белком дикого типа. Дефектный по нуклеазе белок может сохранять способность к связыванию ДНК, но может быть лишен или же обладать пониженной активностью расщепления нуклеиновой кислоты. Исполнительный элемент, содержащий Cas-нуклеазу (например, сохраняющую активность нуклеазы дикого типа, с пониженной активностью нуклеазы и/или лишенную активности нуклеазы), может функционировать в системе CRISPR/Cas для регуляции уровня и/или активности мишени гена или белка (например, снижения, повышения или устранения). Cas-белок может связываться с полинуклеотидом-мишенью и предотвращать транскрипцию посредством создания физического препятствия или редактировать последовательность нуклеиновой кислоты для получения нефункциональных продуктов гена.

В некоторых воплощениях исполнительный элемент включает Cas-белок, который образует комплекс с направляющей нуклеиновой кислотой типа направляющей РНК (гидРНК). В некоторых воплощениях часть исполнительный элемент включает Cas-белок, который образует комплекс с одной направляющей нуклеиновой кислотой типа одинарной направляющей РНК (sgРНК). В некоторых воплощениях исполнительный элемент включает РНК-связывающий белок (RBP), необязательно в комплексе с направляющей нуклеиновой кислотой типа направляющей РНК (например, sgРНК), которая способна образовывать комплекс с Cas-белком.

На фиг. 3А схематически представлена система, содержащая химерный рецепторный полипептид, в которой исполнительный элемент содержит РНК-связывающий белок 300a, необязательно в комплексе с направляющей нуклеиновой кислотой (например, sgРНК). После высвобождения из РНК-связывающего белка (RBP), к примеру, при диссоциации направляющей нуклеиновой кислоты из RBP или расщеплении сайта распознавания расщепления 300c, направляющая нуклеиновая кислота может образовывать комплекс с Cas-белком 300b, который способен регулировать экспрессию и/или активность гена или редактировать последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит безнуклеазный ДНК-связывающий белок, происходящий из ДНК-нуклеазы, который может вызывать активацию или репрессию транскрипции последовательности ДНК-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит безнуклеазный РНК-связывающий белок, происходящий из РНК-нуклеазы, который может вызывать активацию или репрессию транскрипции последовательности РНК-мишени. Например, исполнительный элемент может содержать Cas-белок, который не обладает активностью расщепления.

Может использоваться любая подходящая система CRISPR/Cas. Для обозначения системы CRISPR/Cas могут применяться различные системы обозначения. Типичные системы обозначения приведены в Makarova K.S. et al. "An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems" *Nat Rev Microbiol.* (2015)13:722-736; и Shmakov S. et al. "Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems" *Mol Cell* (2015) 60:1-13. Система CRISPR/Cas может быть системой I типа, II типа, III типа, IV типа, V типа, VI типа или любой другой подходящей системой CRISPR/Cas. В настоящем изобретении система CRISPR/Cas может быть системой класса 1, класса 2 или любой другой подходящей системой CRISPR/Cas. Определение класса 1 или класса 2 основывается на генах, кодирующих эффекторный модуль. Системы класса 1 обычно содержат мульти-субъединичный sgРНК-эффекторный комплекс, тогда как системы класса 2 обычно содержат эффекторный комплекс из одного белка типа Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3 или sgРНК. В системах CRISPR/Cas класса 1 для осуществления регуляции может использоваться комплекс из нескольких Cas-белков. Система CRISPR/Cas класса 1 может включать, к примеру, CRISPR/Cas I типа (например, I, IA, IB, IC, ID, IE, IF, IU), III типа (например, III, IIIA, IIIB, IIIC, IIID) и IV типа (например, IV, IVA, IVB). В системах CRISPR/Cas класса 2 для осуществления регуляции может использоваться один большой Cas-белок. Система CRISPR/Cas класса 2 может включать, к примеру, CRISPR/Cas II типа (например, II, IIA, IIB) и V типа. Системы CRISPR могут быть взаимодей-

полняющими и/или же функциональные модули могут располагаться в транс-положении, облегчая наведение на локус CRISPR. На фиг. 17 представлена иллюстрация, адаптированная из фиг. 2 в Makarova K.S. et al. "An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems" Nat Rev Microbiol. (2015) 13:722-736, на которой представлена архитектура геномных локусов для различных подтипов системы CRISPR-Cas.

Исполнительный элемент, содержащий Cas-белок, может быть представлен Cas-белком класса I или класса 2. Cas-белок может представлять собой Cas-белок I типа, II типа, III типа, IV типа, V типа или VI типа. Cas-белок может содержать один или несколько доменов. Неограничительные примеры доменов включают домен распознавания направляющей нуклеиновой кислоты и/или связывающий домен, нуклеазные домены (например, ДНКазные или РНКазные домены, RuvC, HNH), ДНК-связывающий домен, РНК-связывающий домен, геликазные домены, домены взаимодействия белок-белок и домены димеризации. Домен распознавания направляющей нуклеиновой кислоты и/или связывающий домен может взаимодействовать с направляющей нуклеиновой кислотой. Нуклеазный домен может содержать каталитическую активность для расщепления нуклеиновой кислоты. Нуклеазный домен может быть лишен каталитической активности для предотвращения расщепления нуклеиновой кислоты. Cas-белок может представлять собой химерный Cas-белок, слитый с другими белками или полипептидами. Cas-белок может быть химерой из различных Cas-белков, к примеру, содержащих домены из разных Cas-белков.

Неограничительные примеры Cas-белков включают c2c1, C2c2, c2c3, Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas5e (CasD), Cas6, Cas6e, Cas6f, Cas7, Cas8a, Cas8a1, Cas8a2, Cas8b, Cas8c, Cas9 (Csn1 или Csx12), Cas10, Cas10d, Cas10, Cas10d, CasF, CasG, CasH, Cpf1, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1 (CasA), Cse2 (CasB), Cse3 (CasE), Cse4 (CasC), Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4 и Cul966, их гомологи или модифицированные варианты.

Cas-белок может происходить из любого подходящего организма. Неограничительные примеры включают *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Nocardiosis dassonvillei*, *Streptomyces pristinae spiralis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptosporangium roseum*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Bacillus pseudomycoloides*, *Bacillus selenitireducens*, *Exiguobacterium sibiricum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus salivarius*, *Microscilla marina*, *Burkholderiales bacterium*, *Polaromonas naphthalenivorans*, *Polaromonas sp.*, *Crocospaera watsonii*, *Cyanothecce sp.*, *Microcystis aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Synechococcus sp.*, *Acetohalobium arabicum*, *Ammonifex degensii*, *Caldicellulosiruptor beccsii*, *Candidatus desulforudis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Fingoldia magna*, *Natranaerobius thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Allochromatium vinosum*, *Marinobacter sp.*, *Nitrosococcus halophilus*, *Nitrosococcus watsoni*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ktedonobacter racemifer*, *Methanohalobium evestigatum*, *Anabaena variabilis*, *Nodularia spumigena*, *Nostoc sp.*, *Arthrospira maxima*, *Arthrospira platensis*, *Arthrospira sp.*, *Lyngbya sp.*, *Microcoleus chthonoplastes*, *Oscillatoria sp.*, *Petrogona mobilis*, *Thermosiphon africanus*, *A Caryochloris marina*, *Leptotrichia shahii* и *Francisella novicida*. В некоторых аспектах организм представлен *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*). В некоторых аспектах организм представлен *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). В некоторых аспектах организм представлен *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*).

Cas-белок может происходить из различных видов бактерий, включая, без ограничения, *Veillonella atypical*, *Fusobacterium nucleatum*, *Filifactor alocis*, *Solobacterium moorei*, *Coprococcus catus*, *Treponema denticola*, *Peptoniphilus duerdenii*, *Catenibacterium mitsuokai*, *Streptococcus mutans*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Acidaminococcus intestine*, *Olsenella uli*, *Oenococcus kitaharae*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gasseri*, *Fingoldia magna*, *Mycoplasma mobile*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma ovipneumoniae*, *Mycoplasma canis*, *Mycoplasma synoviae*, *Eubacterium rectale*, *Streptococcus thermophilus*, *Eubacterium dolichum*, *Lactobacillus coryniformis subsp. torquens*, *Ilyobacter polytropus*, *Ruminococcus albus*, *Akkermansia muciniphila*, *Acidothermus cellulolyticus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium dentium*, *Corynebacterium diphtheria*, *Elusimicrobium minutum*, *Nitratifactor salsuginis*, *Sphaerochaeta globus*, *Fibrobacter succinogenes subsp. succinogenes*, *Bacteroides fragilis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Prevotella micans*, *Prevotella ruminicola*, *Flavobacterium columnare*, *Aminomonas paucivorans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Candidatus Puniceispirillum marinum*, *Verminephrobacter eiseniae*, *Ralstonia syzygii*, *Dinoroseobacter shibae*, *Azospirillum*, *Nitrobacter hamburgensis*, *Bradyrhizobium*, *Wolinella succinogenes*, *Campylobacter jejuni subsp. jejuni*, *Helicobacter mustelae*, *Bacillus cereus*, *Acidovorax ebreus*, *Clostridium perfringens*, *Parvibaculum lavamentivorans*, *Roseburia intestinalis*, *Neisseria meningitidis*, *Pasteurella multocida subsp. multocida*, *Sutterella wadsworthensis*, *Proteobacterium*, *Legionella pneumophila*, *Parasutterella excrementihominis*, *Wolinella succinogenes* и *Francisella novicida*.

В настоящем изобретении Cas-белок может быть белком дикого типа или модифицированной формой Cas-белка. Cas-белок может представлять собой активный вариант, неактивный вариант или фрагмент белка дикого типа или модифицированного Cas-белка. Cas-белок может включать изменения аминокислот типа делеции, вставки или замены, варианты, мутации, слияния, химеры или их комбинации относительно Cas-белка дикого типа. Cas-белок может быть полипептидом, который по последовательности по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен или аналогичен типичному Cas-белку дикого типа. Cas-

белок может быть полипептидом, который по последовательности не более чем на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% идентичен и/или аналогичен типичному Cas-белку дикого типа. Варианты или фрагменты по последовательности могут быть по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны или аналогичны белку дикого типа или модифицированному Cas-белку или его части. Варианты или фрагменты могут быть нацелены на локус нуклеиновой кислоты в комплексе с направляющей нуклеиновой кислотой даже при отсутствии активности расщепления нуклеиновой кислоты.

Cas-белок может содержать один или несколько нуклеазных доменов типа ДНКазных доменов. Например, белок Cas9 может содержать нуклеазный домен типа RuvC и/или нуклеазный домен типа HNH. Домены RuvC и HNH могут разрезать разные нити двухцепочечной ДНК, образуя двухцепочечный разрыв в ДНК. Cas-белок может содержать и только один нуклеазный домен (например, Cpf1 содержит домен RuvC, но не содержит домена HNH).

Cas-белок может содержать аминокислотную последовательность, которая по последовательности по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична или аналогична нуклеазному домену (например, домену RuvC, домену HNH) Cas-белка дикого типа.

Cas-белок может быть модифицирован для оптимизации регуляции экспрессии генов. Cas-белок может быть модифицирован для повышения или уменьшения сродства связывания с нуклеиновой кислотой, специфичности связывания нуклеиновой кислоты и/или ферментативной активности. Cas-белок также может быть модифицирован для изменения любой другой активности или свойства белка типа стабильности. Например, может быть модифицирован, удален или инактивирован один или несколько нуклеазных доменов Cas-белка или же Cas-белок может быть усечен для удаления доменов, которые не существенны для функции белка, или же для оптимизации (например, повышения или снижения) активности Cas-белка для регуляции экспрессии генов.

Cas-белок может быть слитым белком. Например, Cas-белок может быть слит с доменом расщепления, доменом эпигенетической модификации, доменом активации транскрипции или доменом репрессии транскрипции. Cas-белок также может быть слит с гетерологичным полипептидом, обеспечивающим повышенную или пониженную стабильность. Слитый домен или гетерологичный полипептид может располагаться на N-конце, C-конце или внутри Cas-белка.

Cas-белок может быть представлен в любом виде. Например, Cas-белок может быть представлен в виде белка типа одного лишь Cas-белка или в комплексе с направляющей нуклеиновой кислотой. Cas-белок может быть представлен в виде нуклеиновой кислоты, кодирующей Cas-белок, типа РНК (например, матричной РНК (мРНК)) или ДНК.

Нуклеиновая кислота, кодирующая Cas-белок, может быть оптимизирована по кодонам для эффективной трансляции белка в определенных клетках или организме.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие Cas-белки, могут быть стабильно встроены в геном клетки. Нуклеиновые кислоты, кодирующие Cas-белки, могут быть функционально связаны с промотором, работающим в клетке. Нуклеиновые кислоты, кодирующие Cas-белки, могут быть функционально связаны с промотором в экспрессирующей конструкции. Экспрессионные конструкции могут включать в себя конструкции из нуклеиновых кислот, способные направлять экспрессию нужного гена или другой последовательности нуклеиновой кислоты (например, гена Cas), которые могут переносить такую представляющую интерес последовательность нуклеиновой кислоты в клетки мишени.

В некоторых воплощениях Cas-белок является "мертвым" Cas-белком. Мертвым Cas-белком может быть белок, который не обладает активностью расщепления нуклеиновой кислоты.

Cas-белок может включать модифицированную форму Cas-белка дикого типа. Модифицированная форма Cas-белка дикого типа может включать изменения аминокислот (например, делеции, вставки или замены), которые снижают активность расщепления нуклеиновых кислот у Cas-белка. Например, модифицированная форма Cas-белка может иметь менее 90%, менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10%, менее 5% или менее 1% активности расщепления нуклеиновых кислот у Cas-белка дикого типа (например, Cas9 из *S. pyogenes*). Модифицированная форма Cas-белка может практически не обладать активностью расщепления нуклеиновых кислот. Когда Cas-белок представлен модифицированной формой, практически не обладающей активностью расщепления нуклеиновых кислот, то она может называться ферментативно неактивной и/или "мертвой" (сокращенно "d"). Мертвый Cas-белок (например, dCas, dCas9) может связываться с полинуклеотидом-мишенью, но не может его расщеплять. В некоторых аспектах мертвый Cas-белок представлен мертвым белком Cas9.

Полипептид dCas9 может связываться с одиночной направляющей РНК (sgРНК), чтобы активировать или репрессировать транскрипцию ДНК мишени. sgРНК можно вводить в клетки, экспрессирующие генно-инженерный полипептид химерного рецептора. В некоторых случаях такие клетки содержат одну или несколько различных sgРНКs, которые нацелены на одну и ту же нуклеиновую кислоту. В других случаях sgРНКs нацелены на разные нуклеиновые кислоты в клетке. Нуклеиновые кислоты, на которые нацелена направляющая РНК, могут быть любыми, которые экспрессируются в клетках типа иммунных клеток. Нуклеиновой кислотой-мишенью может быть ген, участвующий в регуляции иммунных клеток.

В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота связана с раком. Нуклеиновая кислота, связанная с раком, может представлять собой ген клеточного цикла, ген клеточного ответа, ген апоптоза или ген фагоцитоза. Рекомбинантная направляющая РНК может распознаваться белком CRISPR, безнуклеазным белком CRISPR, их вариантами, производными или фрагментами.

Ферментативно неактивный может означать такой полипептид, который может связываться с последовательностью нуклеиновой кислоты в полинуклеотиде специфичным для последовательности образом, но не может расщеплять полинуклеотид-мишень. Ферментативно неактивный сайт-направленный полипептид может содержать ферментативно неактивный домен (например, нуклеазный домен). Ферментативно неактивный может означать отсутствие активности. Ферментативно неактивный может означать практически полное отсутствие активности. Ферментативно неактивный может означать почти полное отсутствие активности. Ферментативно неактивный может означать активность на уровне менее 1%, менее 2%, менее 3%, менее 4%, менее 5%, менее 6%, менее 7%, менее 8%, менее 9% или менее 10% от типичной активности дикого типа (например, от активности расщепления нуклеиновой кислоты у Cas9 дикого типа).

У Cas-белка может быть удален или мутирован один или несколько нуклеазных доменов (например, RuvC, HNH) с тем, чтобы они больше не были функциональными или обладали меньшей нуклеазной активностью. Например, если у Cas-белка, содержащего по меньшей мере два нуклеазных домена (например, Cas9), удалить или мутировать один из нуклеазных доменов, то такой Cas-белок, известный как никаза, может создавать одноцепочечные разрывы на участке распознавания РНК CRISPR (срРНК) в двухцепочечной ДНК, но не двухцепочечные разрывы. Такая никаза может расщеплять комплементарную нить или некомплементарную нить, но не может расщеплять обе. Если у Cas-белка удалить или мутировать все нуклеазные домены (например, нуклеазные домены RuvC и HNH у белка Cas9, нуклеазный домен RuvC у белка Cpf1), то такой Cas-белок может обладать пониженной способностью или совсем не обладать способностью к расщеплению обеих нитей двухцепочечной ДНК. Примером мутации, которая может превратить белок Cas9 в никазу, является мутация D10A (аспартат на аланин в положении 10 у Cas9) в домене RuvC у Cas9 из *S. pyogenes*. Мутация H939A (гистидин на аланин в положении аминокислоты 839) или H840A (гистидин на аланин в положении аминокислоты 840) в домене HNH у Cas9 из *S. pyogenes* может превратить Cas9 в никазу. Примером мутации, которая может превратить белок Cas9 в мертвый Cas9, является мутация D10A (аспартат на аланин в положении 10 у Cas9) в домене RuvC и мутация H939A (гистидин на аланин в положении аминокислоты 839) или H840A (гистидин на аланин в положении аминокислоты 840) в домене HNH у Cas9 из *S. pyogenes*.

"Мертвый" Cas-белок может содержать одну или несколько мутаций по сравнению с версией белка дикого типа. В результате мутации активность расщепления нуклеиновой кислоты у одного или нескольких доменов расщепления нуклеиновой кислоты может составлять менее 90%, менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10%, менее 5% или менее 1% от Cas-белка дикого типа. В результате мутации один или несколько доменов расщепления нуклеиновой кислоты могут сохранить способность к расщеплению комплементарной нити нуклеиновой кислоты-мишени, но уменьшится способность к расщеплению некомплементарной нити нуклеиновой кислоты-мишени. В результате мутации один или несколько доменов расщепления нуклеиновой кислоты могут сохранить способность к расщеплению некомплементарной нити нуклеиновой кислоты-мишени, но уменьшится способность к расщеплению комплементарной нити нуклеиновой кислоты-мишени. В результате мутации один или несколько доменов расщепления нуклеиновой кислоты могут утратить способность к расщеплению и комплементарной нити, и некомплементарной нити нуклеиновой кислоты-мишени. Подлежащие мутации остатки в нуклеазном домене могут соответствовать одному или нескольким каталитическим остаткам нуклеазы. Например, для инактивации одного или нескольких доменов расщепления нуклеиновой кислоты (например, нуклеазных доменов) можно подвергать мутации такие остатки у типичного полипептида Cas9 дикого типа *S. pyogenes*, как Asp10, His840, Asn854 и Asn856. Остатки, подлежащие мутации в нуклеазном домене Cas-белка, могут соответствовать остаткам Asp10, His840, Asn854 и Asn856 у полипептида Cas9 дикого типа *S. pyogenes*, например, при определении по последовательности и/или по структурному выравниванию.

В качестве неограниченных примеров можно подвергать мутации остатки D10, G12, G17, E762, H840, N854, N863, H982, H983, A984, D986 и/или A987 (или соответствующие мутации у любых Cas-белков). К примеру, D10A, G12A, G17A, E762A, H840A, N854A, N863A, H982A, H983A, A984A и/или D986A. Могут подойти и мутации, отличные от замены на аланин.

Мутацию D10A можно комбинировать с одной или несколькими мутациями H840A, N854A или N856A, получая белок Cas9, практически не обладающий активностью расщепления ДНК (например, мертвый белок Cas9). Мутацию H840A можно комбинировать с одной или несколькими мутациями D10A, N854A или N856A, получая сайт-направленный полипептид, практически не обладающий активностью расщепления ДНК. Мутацию N854A можно комбинировать с одной или несколькими мутациями H840A, D10A или N856A, получая сайт-направленный полипептид, практически не обладающий активностью расщепления ДНК. Мутацию N856A можно комбинировать с одной или несколькими мутациями H840A, N854A или D10A, получая сайт-направленный полипептид, практически не обладающий актив-

ностью расщепления ДНК.

В некоторых воплощениях Cas-белок представлен Cas-белком класса 2. В некоторых воплощениях Cas-белок представлен Cas-белком II типа. В некоторых воплощениях Cas-белок представлен белком Cas9, модифицированной версией белка Cas9 или получен из белка Cas9. К примеру, это белок Cas9, не обладающий активностью расщепления. В некоторых воплощениях белок Cas9 представлен белком Cas9 из *S. pyogenes* (например, с номером доступа Q99ZW2 в SwissProt). В некоторых воплощениях белок Cas9 представлен Cas9 из *S. aureus* (например, с номером доступа J7RUA5 в SwissProt). В некоторых воплощениях белок Cas9 представлен модифицированной версией белка Cas9 из *S. pyogenes* или *S. aureus*. В некоторых воплощениях белок Cas9 получен из белка Cas9 из *S. pyogenes* или *S. aureus*. К примеру, это Cas9 из *S. pyogenes* или *S. aureus*, не обладающий активностью расщепления.

Cas9 обычно может означать полипептид, который по последовательности по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% идентичен и/или аналогичен типичному полипептиду Cas9 дикого типа (например, Cas9 из *S. pyogenes*). Cas9 может означать полипептид, который по последовательности не более чем на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% идентичен и/или аналогичен типичному полипептиду Cas9 дикого типа (например, из *S. pyogenes*). Cas9 может означать белок дикого типа или модифицированную форму белка Cas9, которая может включать изменения аминокислот типа делеции, вставки или замены, варианты, мутации, слияния, химеры или их комбинации.

В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит "нуклеазу с цинковым пальцем" или "ZFN". ZFN означает слияние между доменом расщепления типа домена расщепления FokI и по меньшей мере одним мотивом "цинковый палец" (например, по меньшей мере с 2, 3, 4 или 5 мотивами "цинковый палец"), которые могут связывать такие полинуклеотиды, как ДНК и РНК. Гетеродимеризация двух индивидуальных ZFN на определенном положении в полинуклеотиде при определенной ориентации и расстановке может приводить к расщеплению полинуклеотида. Например, связывание ZFN с ДНК может вызвать двухцепочечный разрыв ДНК. Для того, чтобы два домена расщепления могли димеризоваться и расщеплять ДНК, две индивидуальные ZFN должны связаться с противоположными нитями ДНК так, чтобы их С-концы были на определенном расстоянии друг от друга. В некоторых случаях может потребоваться, чтобы линкерные последовательности между доменом с цинковым пальцем и доменом расщепления отделяли 5'-концы каждого сайта связывания на 5-7 пар оснований. В некоторых случаях домен расщепления сливаются с С-концом каждого домена с цинковым пальцем. Типичные ZFN включают, без ограничения, описанные в Urnov et al., *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11: 636-646; Gaj et al., *Nat Methods*, 2012, 9(8):805-7; U.S. Patent Nos. 6534261; 6607882; 6746838; 6794136; 6824978; 6866997; 6933113; 6979539; 7013219; 7030215; 7220719; 7241573; 7241574; 7585849; 7595376; 6903185; 6479626 и U.S. Application Publication Nos. 2003/0232410 и 2009/0203140.

В некоторых воплощениях содержащий ZFN исполнительный элемент может создавать двухцепочечные разрывы в полинуклеотидах-мишенях типа ДНК. Двухцепочечный разрыв ДНК может привести к репарации разрыва ДНК, что способствует проведению модификации генов (например, редактированию нуклеиновой кислоты). Репарация разрыва ДНК может происходить путем соединения негомولوجических концов (NHEJ) или путем гомологичной репарации (HDR). При HDR предоставляется донорская матрица репарации ДНК, которая содержит фланкирующие сайты с участками гомологии к ДНК мишени. В некоторых воплощениях ZFN представлена никазой с цинковым пальцем, которая вызывает сайт-специфичные одноцепочечные разрывы или "ники" ДНК, что приводит к HDR. Описание никаз с цинковым пальцем приводится, например, в Ramirez et al., *Nucl Acids Res*, 2012, 40(12): 5560-8; Kim et al., *Genome Res*, 2012, 22(7): 1327-33. В некоторых воплощениях ZFN связывает полинуклеотиды (например, ДНК и/или РНК), но не способна их расщеплять.

В некоторых воплощениях домен расщепления исполнительного элемента, содержащего ZFN, содержит модифицированную форму домена расщепления дикого типа. Модифицированная форма домена расщепления может включать изменения аминокислот (например, делеции, вставки или замены), которые снижают активность расщепления нуклеиновой кислоты у домена расщепления. К примеру, активность расщепления нуклеиновой кислоты у модифицированной формы домена расщепления может составлять менее 90%, менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10%, менее 5% или менее 1% от активности расщепления нуклеиновой кислоты у домена расщепления дикого типа. Модифицированная форма домена расщепления может практически не обладать активностью расщепления нуклеиновой кислоты. В некоторых воплощениях домен расщепления ферментативно неактивен.

В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит "TALEN" или "TAL-эффекторную нуклеазу". TALEN относится к генно-инженерным эффекторным нуклеазам типа активаторов транскрипции, которые обычно содержат центральный домен ДНК-связывающих tandemных повторов и расщепляющий домен. TALENs получают путем слияния ДНК-связывающего домена TAL-эффектора с доменом расщепления ДНК. В некоторых случаях ДНК-связывающий tandemный повтор содержит 33-35 аминокислот и содержит два гипервариабельных аминокислотных остатка в положениях 12 и 13, которые могут распознавать по меньшей мере одну определенную пару оснований ДНК. Белок эффектора

типа активатора транскрипции (TALE) может быть слит с нуклеазой типа эндонуклеазы дикого типа или мутантной эндонуклеазы FokI или с каталитическим доменом FokI. Получено несколько мутаций у FokI для её использования в TALENs, которые, к примеру, улучшают специфичность или активность расщепления. Такие TALENs могут быть настроены на связывание любой желательной последовательности ДНК. TALENs можно использовать для получения модификаций генов (например, редактирования последовательности нуклеиновых кислот) путем создания двухцепочечных разрывов в последовательности ДНК-мишени, которая в свою очередь подвергается NHEJ или HDR. В некоторых случаях для содействия HDR предоставляется одноцепочечная донорская матрица репарации ДНК. Подробное описание TALENs и их применение для редактирования генов приводится, например, в U.S. Patent Nos. 8440431, 8440432, 8450471, 8586363 и 8697853; Scharenberg et al., *Curr Gene Ther.*, 2013, 13(4): 291-303; Gaj et al., *Nat Methods*, 2012, 9 (8): 805-7; Beurdeley et al., *Nat Commun.*, 2013, 4:1762; и Joung and Sander, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2013, 14 (1): 49-55.

В некоторых воплощениях получают TALEN с пониженной нуклеазной активностью. В некоторых воплощениях нуклеазный домен TALEN содержит модифицированную форму нуклеазного домена дикого типа. Модифицированная форма нуклеазного домена может включать изменения аминокислот (например, делеции, вставки или замены), которые снижают активность расщепления нуклеиновой кислоты у нуклеазного домена. К примеру, активность расщепления нуклеиновой кислоты у модифицированной формы нуклеазного домена может составлять менее 90%, менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10%, менее 5% или менее 1% от активности расщепления нуклеиновой кислоты у нуклеазного домена дикого типа. Модифицированная форма нуклеазного домена может практически не обладать активностью расщепления нуклеиновой кислоты. В некоторых воплощениях нуклеазный домен ферментативно неактивен.

В некоторых воплощениях белок эффектора типа активатора транскрипции (TALE) слит с доменом, который может модулировать транскрипцию и не содержит нуклеазы. В некоторых воплощениях белок эффектора типа активатора транскрипции (TALE) предназначается для функционирования в качестве активатора транскрипции. В некоторых воплощениях белок эффектора типа активатора транскрипции (TALE) предназначается для функционирования в качестве репрессора транскрипции. Например, ДНК-связывающий домен белка эффектора типа активатора транскрипции (TALE) может быть слит (например, соединен) с одним или несколькими доменами активации транскрипции или с одним или несколькими доменами репрессии транскрипции. Неограничительные примеры доменов активации транскрипции включают домен активации VP16 Herpes simplex и тетрамерный повтор домена активации VP16, например, домен активации VP64. Неограничительный пример домена репрессии транскрипции включает домен Krüppel-associated box (KRAB).

В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит мегануклеазу. Мегануклеазы обычно относятся к редко-расщепляющим эндонуклеазам или хоминг-эндонуклеазам, которые могут быть высокоспецифичными. Мегануклеазы могут распознавать участки ДНК мишени длиной по меньшей мере от 12 пар оснований, например, длиной от 12 до 40 пар оснований, от 12 до 50 пар оснований или от 12 до 60 пар оснований. Мегануклеазы могут представлять собой модульные ДНК-связывающие нуклеазы типа слитых белков, содержащих по меньшей мере один каталитический домен эндонуклеазы и по меньшей мере один ДНК-связывающий домен или белок, определяющий последовательность нуклеиновой кислоты-мишени. ДНК-связывающий домен может содержать по меньшей мере один мотив, который распознает одно- или двухцепочечную ДНК. Мегануклеаза может быть мономерной или димерной. В некоторых воплощениях мегануклеаза является природной (встречается в природе) или дикого типа, а в других случаях мегануклеаза бывает неприродной, искусственной, инженерной, синтезированной, полученной методом рационального проектирования или вручную. В некоторых воплощениях мегануклеазы по настоящему изобретению включают мегануклеазу I-CreI, мегануклеазу I-CeuI, мегануклеазу I-MsoI, мегануклеазу I-SceI, их варианты, производные и фрагменты. Подробные описания полезных мегануклеаз и их применение при редактировании генов приводится, например, в Silva et al., *Curr Gene Ther.*, 2011, 11(1): 11-27; Zaslavskiy et al., *BMC Bioinformatics*, 2014, 15:191; Takeuchi et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111 (11): 4061-4066 и в U.S. Patent Nos. 7842489; 7897372; 8021867; 8163514; 8133697; 8021867; 8119361; 8119381; 812436 и 8129134.

В некоторых воплощениях нуклеазный домен мегануклеазы содержит модифицированную форму нуклеазного домена дикого типа. Модифицированная форма нуклеазного домена может включать изменения аминокислот (например, делеции, вставки или замены), которые снижают активность расщепления нуклеиновой кислоты у нуклеазного домена. К примеру, активность расщепления нуклеиновой кислоты у модифицированной формы нуклеазного домена может составлять менее 90%, менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10%, менее 5% или менее 1% от активности расщепления нуклеиновой кислоты у нуклеазного домена дикого типа. Модифицированная форма нуклеазного домена может практически не обладать активностью расщепления нуклеиновой кислоты. В некоторых воплощениях нуклеазный домен ферментативно неактивен. В некоторых воплощениях мегануклеаза может связывать ДНК, но не может расщеплять ДНК.

В некоторых воплощениях исполнительный элемент слит с одним или несколькими доменами ре-

прессоров транскрипции, активаторов транскрипции, эпигенетическими доменами, рекомбиназными доменами, транспозазными доменами, флиппазными доменами, никазными доменами или их комбинациями. Домен активатора может включать один или несколько tandemных доменов активации, расположенных на карбоксильном конце белка. В некоторых случаях исполнительный элемент включает в себя один или несколько tandemных репрессорных доменов, расположенных на карбоксильном конце белка. Неограничительные примеры активаторных доменов включают GAL4, домен активации VP16 вируса Herpes simplex, VP64 (тетрамер из активационных доменов VP16 Herpes simplex), субъединицу p65 NF-κB, трансактиватор R вируса Эпштейна-Барра (Rta), которые описаны в Chavez et al., Nat Methods, 2015, 12(4): 326-328; и U.S. Patent App. Publ. No. 2014/0068797. Неограничительные примеры репрессорных доменов включают домен KRAB (Krüppel-associated box) из Kox1, домен взаимодействия Mad-mSIN3 (SID), репрессорный домен ERF (ERD), которые описаны в Chavez et al., Nat Methods, 2015, 12(4): 326-328; и U.S. Patent App. Publ. No. 2014/0068797. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит один или несколько tandemных репрессорных доменов, расположенных на N-конце белка.

Исполнительный элемент также может быть слит с гетерологичным полипептидом, обеспечивающим повышенную или пониженную стабильность. Слитый домен или гетерологичный полипептид может располагаться на N-конце, на C-конце или внутри исполнительного элемента.

Исполнительный элемент может содержать гетерологичный полипептид для удобства отслеживания или очистки типа флуоресцентного белка, метки для очистки или эпитопной метки. Примеры флуоресцентных белков включают зеленые флуоресцентные белки (например, GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, eGFP, Emerald, Azami Green, Monomeric Azami Green, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), желтые флуоресцентные белки (например, YFP, eYFP, Citrine, Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), синие флуоресцентные белки (например, eBFP, eBFP2, Azurite, mKalama1, GFPuv, Sapphire, T-Sapphire), голубые флуоресцентные белки (например, eCFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), красные флуоресцентные белки (mKate, mKate2, mPlum, DsRed monomer, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-Monomer, HcRed-Tandem, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRaspberry, mStrawberry, Jred), оранжевые флуоресцентные белки (mOrange, mKO, Kusabira-Orange, Monomeric Kusabira-Orange, m-Tangerine, tdTomato) и другие подходящие флуоресцентные белки. Примеры тегов включают глутатион-S-трансферазу (GST), хитин-связывающий белок (CBP), белок, связывающий мальтозу, тиоредоксин (TRX), poly(NANP), tandemный тег для аффинной очистки (TAP), мус, AcV5, AU1, AU5, E, ECS, E2, FLAG, гематоглютинин (HA), nus, Softag 1, Softag 3, Strep, SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, SI, T7, V5, VSV-G, гистидин (His), биотин-карбоксильный белок-переносчик (BCCP) и кальмодулин.

Исполнительный элемент может высвобождаться из GMP при расщеплении сайта распознавания расщепления. В химерном полипептиде трансмембранного рецептора сайт распознавания расщепления в GMP может быть фланкирован сигнальным доменом иммунной клетки и исполнительным элементом. Расщепляющий элемент может распознавать и/или расщеплять сайт распознавания расщепления, к примеру, если он находится в непосредственной близости от сайта распознавания расщепления. Расщепляющий элемент может содержать полипептидную последовательность. Расщепляющий элемент может входить в состав химерного адаптерного полипептида. Расщепляющий элемент может составлять N-конец, C-конец или внутреннюю часть химерного адаптерного полипептида. В некоторых воплощениях расщепляющий элемент образует комплекс с химерным адаптерным полипептидом. Расщепляющий элемент может входить в комплекс с N-концом, C-концом или внутренней частью химерного адаптерного полипептида. На фиг. 3B представлена типичная компоновка различных компонентов рассматриваемой системы. Сайт распознавания расщепления 304 в GMP фланкирован сигнальным доменом иммунной клетки 302 и исполнительным элементом 303, а расщепляющий элемент 306 входит в состав химерного адаптерного полипептида 305.

На фиг. 4A-D схематически представлено высвобождение исполнительного элемента из GMP. На фиг. 4A представлено связывание антигена с химерным полипептидом трансмембранного рецептора. Химерный полипептид трансмембранного рецептора включает внеклеточную область, содержащую взаимодействующий с антигеном домен 401, и внутриклеточную область, содержащую GMP. Внутриклеточная область также содержит сигнальный домен иммунной клетки. GMP включает в себя исполнительный элемент 402a, соединенный с сайтом распознавания расщепления 402b. В ответ на связывание антигена рецептор подвергается модификации путем фосфорилирования 403 во внутриклеточной области рецептора (фиг. 4B). После модификации (например, фосфорилирования) рецептора к рецептору рекрутируется адаптерный белок, содержащий участок рецепторного связывания, как показано на фиг. 4C. Рецептор содержит расщепляющий элемент 404; расщепляющий элемент может комплексоваться с адаптером или соединяться, к примеру, пептидной связью и/или пептидным линкером с участком рецепторного связывания. Когда он находится в непосредственной близости от сайта распознавания расщепления, расщепляющий элемент может расщеплять сайт распознавания, высвобождая исполнительный элемент из GMP, как показано на фиг. 4D. После высвобождения исполнительный элемент может поступать в ядро для регуляции экспрессии и/или активности гена-мишени или для редактирования последовательности нуклеиновой кислоты. На фиг. 4E-H представлена аналогичная система, в которой модификация рецептора включает конформационное изменение. В некоторых воплощениях адаптерный белок

привязан к мембране (например, в виде мембраносвязанного белка).

В некоторых воплощениях расщепляющий элемент расщепляет сайт распознавания только тогда, когда он находится в непосредственной близости от сайта распознавания расщепления. Сайт распознавания расщепления может содержать полипептидную последовательность, которая является последовательностью распознавания для протеазы. Расщепляющий элемент может обладать протеазной активностью, которая распознает полипептидную последовательность. Расщепляющий элемент, обладающий протеазной активностью, может представлять собой протеазу или её производное, вариант или фрагмент. Протеаза означает такой фермент, который осуществляет протеолиз, при котором полипептиды расщепляются на более мелкие полипептиды или аминокислоты. Для применения в качестве расщепляющего элемента подходят различные протеазы. Некоторые протеазы бывают очень неразборчивыми и гидролизуют широкий спектр белковых субстратов. Некоторые протеазы бывают высокоспецифичными и расщепляют субстраты только с определенной последовательностью, например, последовательностью распознавания расщепления или доменом отщепления пептида. В некоторых воплощениях сайт распознавания расщепления содержит несколько последовательностей распознавания расщепления, причем каждая последовательность распознавания расщепления может распознаваться одним и тем же или разными расщепляющими элементами, обладающими протеазной активностью (например, протеазами). Специфичные к последовательности протеазы, которые можно использовать в качестве расщепляющих элементов, включают, без ограничения, суперсемейство протеаз CA, например, семейства C1, C2, C6, C10, C12, C16, C19, C28, C31, C32, C33, C39, C47, C51, C54, C58, C64, C65, C66, C67, C70, C71, C76, C78, C83, C85, C86, C87, C93, C96, C98 и C101, включая папаин (*Carica papaya*), бромелаин (*Ananas comosus*), катепсин К (печеночника) и кальпаин (*Homo sapiens*); суперсемейство протеаз CD, например, семейства C11, C13, C14, C25, C50, C80 и C84, как-то каспаза-1 (*Rattus norvegicus*) и сепараза (*Saccharomyces cerevisiae*); суперсемейство протеаз CE, например, семейства C5, C48, C55, C57, C63 и C79, включая аденаин (аденовируса 2 типа человека); суперсемейство протеаз CF, например, семейство C15, включая пироглутамилпептидазу I (*Bacillus amyloliquefaciens*); суперсемейство протеаз CL, например, семейства C60 и C82, включая сортазу А (*Staphylococcus aureus*); суперсемейство протеаз CM, например, семейство C18, включая пептидазу-2 вируса гепатита С (вируса гепатита С); суперсемейство протеаз CN, например, семейство C9, включая пептидазу nsP2 типа вируса sindbis (вируса sindbis); суперсемейство протеаз CO, например, семейство C40, включая дипептидилпептидазу VI (*Lysinibacillus sphaericus*); суперсемейство протеаз CP, например, семейство C97, включая пептидазу DeSI-1 (*Mus musculus*); суперсемейство протеаз PA, например, семейства C3, C4, C24, C30, C37, C62, C74 и C99, включая протеазу TEV (вируса гравировки табака); суперсемейство протеаз PB, например, семейства C44, C45, C59, C69, C89 и C95, включая предшественника амидофосфорибозилтрансферазы (*Homo sapiens*); суперсемейство протеаз PC, семейства C26 и C56, включая γ -глутамилгидролазу (*Rattus norvegicus*); суперсемейство протеаз PD, например, семейство C46, включая белок Hedgehog (*Drosophila melanogaster*); суперсемейство PE, например, семейство P1, включая аминокислотпептидазу DmpA (*Ochrobactrum anthropi*); и другие протеазы, например, семейства C7, C8, C21, C23, C27, C36, C42, C53 и C75. Дополнительные протеазы включают сериновые протеазы, например, из суперсемейства SB, например, семейства S8 и S53, включая субтилизин (*Bacillus licheniformis*); из суперсемейства SC, например, семейства S9, S10, S15, S28, S33 и S37, включая пролил-олигопептидазу (*Sus scrofa*); из суперсемейства SE, например, семейства S11, S12 и S13, включая D-Ala-D-Ala-пептидазу С (*Escherichia coli*); из суперсемейства SF, например, семейства S24 и S26, включая сигнальную пептидазу I (*Escherichia coli*); из суперсемейства SJ, например, семейства S16, S50 и S69, включая пептидазу 1-A (*Escherichia coli*); из суперсемейства SK, например, семейства S14, S41 и S49, включая протеазу Clp (*Escherichia coli*); из суперсемейства SO, например, семейства S74, включая саморасщепляющий белок эндосиалидазы CIMCD фага K1F (фага K1F энтеробактерий); из суперсемейства SP, например, семейства S59, включая нуклеопорин 145 (*Homo sapiens*); из суперсемейства SR, например, семейства S60, включая лактоферрин (*Homo sapiens*); из суперсемейства SS, семейства S66, включая LD-карбокисептидазу -тетрапептидазу муреина (*Pseudomonas aeruginosa*); из суперсемейства ST, например, семейства S54, включая ромбоид-1 (*Drosophila melanogaster*); из суперсемейства PA, например, семейства S1, S3, S6, S7, S29, S30, S31, S32, S39, S46, S55, S64, S65 и S75, включая химотрипсин А (*Bos taurus*); из суперсемейства PB, например, семейства S45 и S63, включая предшественника ацилазы пенициллина G (*Escherichia coli*); из суперсемейства PC, например, семейства S51, включая дипептидазу E (*Escherichia coli*); из суперсемейства PE, например, семейства P1, включая аминокислотпептидазу DmpA (*Ochrobactrum anthropi*); неопределенные, например, семейства S48, S62, S68, S71, S72, S79 и S81; треониновые протеазы, например, из суперсемейства PB, например, семейства T1, T2, T3 и T6, включая архейные протеасомы, β -компонент (*Thermoplasma acidophilum*); и из суперсемейства PE, семейства T5, включая орнитин-ацетилтрансферазу (*Saccharomyces cerevisiae*); аспарагиновые протеазы, например, BACE1, BACE2; катепсин D; катепсин E; химозин; напсин-А; непентезин; пепсин; плазмепсин; пресенилин; ренин; и протеаза ВИЧ-1, а также металлопротеиназы, например экзопептидазы, металлоэкзопептидазы; эндопептидазы и металлоэндопептидазы. Последовательность распознавания расщепления (например, полипептидная последовательность) может распознаваться любой из описанных здесь проте-

аз.

В некоторых воплощениях сайт распознавания расщепления содержит последовательность распознавания расщепления (например, полипептидную последовательность или домен отщепления пептида), которая распознается протеазой, выбранной из группы, в которую входят ахромопептидаза, аминопептидаза, анкрод, ангиотензинпревращающий фермент, бромелаин, кальпаин, кальпаин I, кальпаин II, карбоксипептидаза А, карбоксипептидаза В, карбоксипептидаза G, карбоксипептидаза Р, карбоксипептидаза W, карбоксипептидаза Y, каспаза 1, каспаза 2, каспаза 3, каспаза 4, каспаза 5, каспаза 6, каспаза 7, каспаза 8, каспаза 9, каспаза 10, каспаза 11, каспаза 12, каспаза 13, катепсин В, катепсин С, катепсин D, катепсин Е, катепсин G, катепсин Н, катепсин L, химопапаин, химаза, химотрипсин, клострипаин, коллагеназа, комплемент C1г, комплемент C1s, фактор комплемента D, фактор комплемента I, кукумизин, дипептидилпептидаза IV, эластаза (лейкоцитарная), эластаза (панкреатическая), эндопротеиназа Arg-C, эндопротеиназа Asp-N, эндопротеиназа Glu-C, эндопротеиназа Lys-C, энтерокиназа, фактор Ха, фицин, фузин, гранзим А, гранзим В, протеаза ВИЧ, IG-аза, тканевой калликреин, лейцин-аминопептидаза (общая), лейцин-аминопептидаза (цитозольная), лейцин-аминопептидаза (микросомальная), матриксная металлопротеаза, метионин-аминопептидаза, нейтраза, папаин, пепсин, плазмин, пролидаза, проназа Е, специфический антиген простаты, протеаза алкалофильная из *Streptomyces griseus*, протеаза из *Aspergillus*, протеаза из *Aspergillus saitoi*, протеаза из *Aspergillus sojae*, протеаза из *B. licheniformis* (щелочная или алкалаза), протеаза из *Bacillus polymyxa*, протеаза из *Bacillus sp.*, протеаза из *Rhizopus sp.*, протеаза S, протеасомы, протеиназа из *Aspergillus oryzae*, протеиназа 3, протеиназа А, протеиназа К, белок С, пироглутамат-аминопептидаза, ренин, ренин, стрептокиназа, субтилизин, термолизин, тромбин, активатор тканевого плазминогена, трипсин, триптаза и урокиназа.

В табл. 2 перечислены типичные протеазы и соответствующие им распознаваемые последовательности, которые могут использоваться в системах по изобретению.

Таблица 2. Типичные протеазы и соответствующие распознаваемые ими последовательности

Название протеазы	Синонимы	Распознавательная последовательность
Arg-C	аргинил-пептидаза, эндопротеиназа Arg-C, тканевой калликреин	R-x
Asp-N	эндопротеиназа Asp-N, пептидил-Asp-металлоэндопептидаза	x-D

Asp-N (N-концевой Glu)	эндопротеиназа Asp-N, пептидил-Asp-металлоэндопептидаза	x-[DE]
BNPS или NCS/мочевина	3-бром-3-метил-2-(2-нитрофенилтио)-3H-индол, BNPS-скатол, N-хлорсукцинимид/мочевина	W-x
Каспаза-1	ICE, интерлейкин-1 β -превращающий фермент	[FLWY]-x-[AHT]-D- {DEKPQR}
Каспаза-10	Flce2, Mch4	I-E-A-D-x
Каспаза-2	Ich-1, Nedd2	D-V-A-D- {DEKPQR} или D-E-H-D- {DEKPQR}
Каспаза-3	апопаин, CPP32, Yama	D-M-Q-D- {DEKPQR} или D-E-V-D- {DEKPQR}
Каспаза-4	ICE(rel)II, Ich-2, TX	L-E-V-D- {DEKPQR} или [LW]-E-H-D- {DEKPQR}
Каспаза-5	ICE(rel)III, TY	[LW]-E-H-D-x
Каспаза-6	Mch2	V-E-[HI]-D- {DEKPQR}
Каспаза-7	CMH-1, ICE-LAP3, Mch-3	D-E-V-D- {DEKPQR}
Каспаза-8	FLICE, MASH, Mch5	[IL]-E-T-D- {DEKPQR}
Каспаза-9	ICE-Lap6, Mch6	L-E-H-D-x
Химотрипсин		[FY]-{P} или W- {MP}
Химотрипсин (низкая специфичность)		[FLY]-{P} или W- {MP} или M- {PY} или H- {DMPW}
Клострипан	клостридопептидаза B	R-x
CNBr	цианогенбромид	M-x
CNBr (метил-Cys)	цианогенбромид	M-x или x-C
CNBr (с кислотами)	цианогенбромид	[MW]-x
Энтерокиназа	энтеропептидаза	[DE](4)-K-x
фактор Ха	коагуляционный фактор Ха	[AFGILTVM]-[DE]-G-R-x
Муравьиная кислота		D-x
Glu-C (AmAc буфер)	эндопротеиназа Glu-C, протеаза V8, глутамилэндопептидаза	E-x
Glu-C (Phos буфер)	эндопротеиназа Glu-C, протетазы V8, глутамилэндопептидаза	[DE]-x
Гранзим В	протеиназа-2 цитотоксических Т-лимфоцитов, гранзим-2, гранзим В, лимфоцитарная протеаза, SECT, Т-клеточная сериновая протеаза 1-3E	I-E-P-D-x
Протеаза HRV3C	протеаза 3C риновируса человека, пикорнаин 3С, протеаза 3С	L-E-V-L-F-Q-G-P
Гидроксиламин	гидроксиламмония хлорид	N-G
Йодбензойная кислота	2-йодбензойная кислота	W-x
Lys-C	эндопротеиназа Lys-C, лизил-эндопептидаза	K-x
Lys-N	эндопротеиназа Lys-N, пептидил-Lys-металлоэндопептидаза, нейтральная протеиназа Armillaria mellea	x-K
Lys-N (Cys-модифицированная)	эндопротеиназа Lys-N, пептидил-Lys-металлоэндопептидаза, нейтральная протеиназа Armillaria mellea	x-[CK]
Мягкий кислотный гидролиз		D-P
NBS (длительное воздействие)	N-бромсукцинимид	[HWY]-x
NBS (короткое воздействие)	N-бромсукцинимид	[WY]-x

NTCB	2-нитро-5-тиоцианатобензойная кислота, 2-нитро-5-тиоцианобензойная кислота	x-C
Панкреатическая эластаза	панкреопептидаза E, эластаза-1	[AGSV]-x
Пепсин А	пепсин	{HKR}-{P}-{R}-[FLWY]- {P} или {HKR}-{P}- [FLWY]-x-{P}
Пепсин А (низкая специфичность)	пепсин	{HKR}-{P}-{R}-[FL]-{P} или {HKR}-{P}-[FL]-x-{P}
Пролилэндопептидаза	пролил-олигопептидаза, фермент расщепления после пролина	[HKR]-P-{P}
Протеиназа К	эндопептидаза К, пептидаза К	[AEFILTVWY]-x
Протеаза TEV	протеаза вируса гравировки табака, эндопептидаза ядерных включений-а	E-x-x-Y-x-Q-[GS]
Термолизин	термофильная бактериальная протеаза	{DE}-[AFILMV]-{P}
Тромбин	фактор Па	x-x-G-R-G-x или [AFGILTVW]- [AFGILTVW]-P-R-{DE}- {DE}
Трипсин	трипсин-1	x-[KR]-{P} или W-K-P или M-R-P, но не: [CD]-K-D или C-K-[HY] или C-R-K или R-R-[HR]
Трипсин (Arg-блокированный)		K-{P}
Трипсин (Cys-модифицированный)		[RKC]-{P}
Трипсин (Lys-блокированный)		R-{P}

При выборе протеаз для применения в качестве расщепляющих элементов их можно выбирать по желательным характеристикам, таким как селективность по пептидной связи, активность при определенных значениях pH, молекулярная масса и т.п. В табл. 3 приведены свойства типичных протеаз.

Таблица 3. Типичные протеазы и характеристики протеаз

Протеаза	Номер по ЕС	Класс	Селективность по пептидной связи	pH-оптимум	Молек. масса (кДа)	Номер доступа
Эндопротеиназы						
Трипсин (бычий)	3.4.21.4	сериновая	P ₁ -P ₁ ¹ - (P ₁ = Lys, Arg)	8,0-9,0	23,5	P00760 ^S
Химотрипсин (бычий)	3.4.21.1	сериновая	P ₁ -P ₁ ¹ - (P ₁ = ароматическая, P ₁ ¹ = неспецифическая)	7,5-8,5	25	P00766 ^S
Эндопротеиназа Asp-N (Pseudomonas fragi)	3.4.24.33	металло	P ₁ -Asp- (и -P ₁ -цистеиновая кислота)	6,0-8,0	27	∅
Эндопротеиназа Arg-C (подчелюстная железа мыши)	∅	сериновая	-Arg-P ₁ -	8,0-8,5	30	н/п

Эндопротеиназа Glu-C (протеаза V8) (Staphylococcus aureus)	3.4.21.19	сериновая	-Glu-P ₁ ¹⁻ (и -Asp-P ₁ ¹⁻) (2)	8,0	27	P04188 ^S
Эндопротеиназа Lys-C (Lysobacter enzymogenes)	3.4.21.50	сериновая	-Lys-P ₁ ¹⁻	8,0	30 ^{NR} 33 ^R	S77957 ^P
Пепсин (свиной)	3.4.23.1	аспаратная	P ₁ -P ₁ ¹⁻ (P ₁ = предпочтительно гидрофобная)	2,0-4,0	34,5	P00791 ^S
Термолизин (Bacillus thermoproteolyticus)	3.4.24.27	металло	P ₁ -P ₁ ¹⁻ (P ₁ = Leu, Phe, Ile, Val, Met, Ala)	7,0-9,0	37,5	P00800 ^S
Эластаза (свиная)	3.4.21.36	сериновая	P ₁ -P ₁ ¹⁻ (P ₁ = незаряженная, неароматическая)	7,8-8,5	25,9	P00772 ^S
Папаин (Carica papaya)	3.4.22.2	цистеиновая	P ₁ -P ₁ ¹⁻ (P ₁ = предпочтительно Arg, Lys)	6,0-7,0	23	P00784 ^S
Протеиназа К (Tritirachium album)	3.4.21.64	сериновая	P ₁ -P ₁ ¹⁻ (P ₁ = предпочтительно ароматическая, гидрофобная)	7,5-12,0	18,5	P06873 ^S
Субтилизин (Bacillus subtilis)	3.4.21.62	сериновая	P ₁ -P ₁ ¹⁻ (P ₁ = предпочтительно нейтральная/кислая)	7,0-11,0	30 ^S 27,3 ^L	P04189 ^S
Клострипаин (эндопротеиназа Arg-C) (Clostridium histolyticum)	3.4.22.8	цистеиновая	-Arg-P ₁ - (P ₁ = Pro предпочтительно)	7,1-7,6	59	P09870 ^S
Экзопептидазы						
Карбоксипептидаза А (бычья)	3.4.17.1	металло	P ₁ -P ₁ ¹⁻ (P ₁ не может быть Arg, Lys, Pro)	7,0-8,0	34,5	P00730 ^S
Карбоксипептидаза В (свиная)	3.4.17.2	металло	P ₁ -P ₁ ¹⁻ (P ₁ = Lys, Arg)	7,0-9,0	34,6	P00732 ^S
Карбоксипептидаза Р (Penicillium janthinellum)	Ф	сериновая	P ₁ -P ₁ ¹⁻ (неспецифически)	4,0-5,0	51	н/п
Карбоксипептидаза Υ (дрожжевая)	3.4.16.5	сериновая	P ₁ -P ₁ ¹⁻ (неспецифически)	5,5-6,5	61	P00729 ^S
Катепсин С	3.4.14.1	цистеиновая	X-P ₁ -P ₁ ¹⁻ (удаляет N-концевой дипептид)	5,5	210	н/п
Ациламиноацилпептидаза (свиная)	3.4.19.1	сериновая	Ac-P ₁ -P ₁ ¹⁻ (P ₁ = предпочтительно Ser, Ala, Met)	7,5	80 ^H 360 ^P	P19205 ^{S+}
Пироглутамат-аминопептидаза (бычья)	3.4.19.3	цистеиновая	P ₁ -P ₁ ¹⁻ (P ₁ = 5-оксипролин или пироглутамат)	7,0-9,0	70-80 ^B	н/п

В некоторых воплощениях сайт распознавания расщепления содержит первую часть последовательности интеина, которая реагирует со второй частью последовательности интеина с высвобождением исполнительного элемента. Для облегчения высвобождения исполнительного элемента из химерного рецепторного полипептида может использоваться гетерологическая система с разделенным интеином. Исполнительный элемент может ковалентно соединяться с первой частью последовательности интеина. Исполнительный элемент может соединяться через свой N-конец или C-конец с первой частью последовательности интеина. Вторая часть последовательности интеина может входить в состав химерного адаптерного полипептида. Вторая часть последовательности интеина может служить расщепляющим элементом. Первой частью или второй частью последовательности интеина может быть N-концевой интеин, C-концевой интеин или любая другая подходящая часть интеина, которая может способствовать высвобождению исполнительного элемента. Последовательности интеина могут происходить из любого подходящего источника. Первая и вторая часть могут быть из одного источника (например, организма, белка) или из разных источников.

В одном показательном примере, представленном на фиг. 12А, химерный рецепторный полипептид

содержит исполнительный элемент 1201, ковалентно связанный (например, на своем N-конце или С-конце) пептидной связью с первой частью последовательности интеина 1202, содержащей N-конец интеина. Слитый с N-концом интеина исполнительный элемент может входить в контакт со второй частью последовательности интеина 1203, содержащей С-конец интеина, как показано на фиг. 12В, к примеру, со второй частью последовательности интеина, связанной с адаптерным полипептидом. При таком контакте между первой и второй частью последовательности интеина может происходить сайт-специфичное расщепление (например, на участке между исполнительным элементом и N-концом интеина), как показано на фиг. 12С, при этом высвобождается исполнительный элемент, как показано на фиг. 12D. В альтернативной конфигурации, представленной на фиг. 12Е-Н, исполнительный элемент связан и/или закомплексован с адаптерным полипептидом, а не с рецепторным полипептидом. В другом показательном примере исполнительный элемент может быть ковалентно связан (например, на своем N-конце или С-конце) пептидной связью с первой частью интеина, содержащей С-конец интеина. Слитый с С-концом интеина исполнительный элемент может входить в контакт со второй частью последовательности интеина, содержащей N-конец интеина. При таком контакте между первой и второй частью интеина может происходить сайт-специфичное расщепление (например, на подходящем участке между исполнительным элементом и С-концом интеина), при этом высвобождается исполнительный элемент.

В некоторых воплощениях сайт распознавания расщепления содержит дисульфидную связь. Дисульфидная связь может соединять исполнительный элемент с химерным рецепторным полипептидом. Дисульфидная связь может образовываться между одним или несколькими цистеинами исполнительного элемента и рецептором. Цистеины могут быть встроены в состав исполнительного элемента или рецептора. Цистеины могут входить в состав нативной или последовательности дикого типа. Цистеин может присутствовать в линкерном пептиде, присоединенном к исполнительному элементу или рецептору. Расщеплению дисульфидной связи может способствовать, к примеру, изменение окислительно-восстановительных условий у дисульфидной связи. Изменение окислительно-восстановительных условий может приводить к восстановлению дисульфидной связи до тиолов и высвобождению исполнительного элемента. Расщеплению дисульфидной связи может способствовать расщепляющий элемент, содержащий окислительно-восстановительное средство, которое может катализировать восстановление дисульфидной связи. Окислительно-восстановительным средством может быть фермент либо его производное, вариант или фрагмент. Фермент может быть оксидоредуктазой. Примеры оксидоредуктаз включают белок-дисульфидредуктазы, тиоредоксины, глутаредоксины, тиол-дисульфид-оксидоредуктазы (например, DsbA, VdbA-D, MdbA и SdbA) и глутатион-дисульфидредуктазы. Окислительно-восстановительное средство может быть из любого подходящего источника, включая прокариот и эукариот. Для оптимальной активности фермента могут потребоваться кофакторы (например, никотинамидные кофакторы, флавины либо их производные и аналоги). В одном показательном примере, представленном на фиг. 13А, химерный рецепторный полипептид содержит исполнительный элемент 1301, соединенный дисульфидной связью. Дисульфидная связь может расщепляться расщепляющим элементом 1302, содержащим фермент типа оксидоредуктазы, к примеру, оксидоредуктазы, закомплексованной и/или связанной с адаптерным полипептидом, как показано на фиг. 13В. При расщеплении дисульфидной связи может высвобождаться исполнительный элемент, как показано на фиг. 13С. Исполнительный элемент после высвобождения может перемещаться в ядро клетки, где он может регулировать экспрессию и/или активность гена или редактировать последовательность нуклеиновой кислоты, как показано на фиг. 13D. На фиг. 13Е-Н представлена альтернативная конфигурация, в которой исполнительный элемент закомплексован и/или связан с адаптерным полипептидом, а расщепляющий элемент (например, оксидоредуктаза) связан с рецептором.

В некоторых воплощениях химерный полипептид трансмембранного рецептора содержит по меньшей мере одну нацеливающую последовательность, которая направляет транспорт рецептора в определенный район клетки. Нацеливающая последовательность может использоваться для направления транспортировки полипептида, с которым связана нацеливающая последовательность, в определенный район клетки. К примеру, нацеливающая последовательность может направлять рецептор в ядро клетки, используя сигнал ядерной локализации (NLS), за пределы ядра (например, в цитоплазму), используя сигнал ядерного экспорта (NES), в митохондрии, эндоплазматический ретикулум (ER), аппарат Гольджи, хлоропласты, апопласты, пероксисомы, плазматические мембраны или мембраны различных органелл клетки. В некоторых воплощениях нацеливающая последовательность содержит сигнал ядерного экспорта (NES) и направляет полипептид за пределы ядра, к примеру, в цитоплазму клетки. Нацеливающая последовательность может направлять полипептид в цитоплазму с использованием различных сигналов ядерного экспорта. Обычно сигналы ядерного экспорта представляют собой короткие аминокислотные последовательности из гидрофобных остатков (например, по меньшей мере 2, 3, 4 или 5 гидрофобных остатков), которые направляют белок на экспорт из ядра клетки в цитоплазму через комплекс ядерных пор с помощью ядерного транспорта. Не все субстраты NES могут конститутивно экспортироваться из ядра. В некоторых воплощениях нацеливающая последовательность содержит сигнал ядерной локализации (NLS, например, NLS SV40) и направляет полипептид в ядро клетки. Нацеливающая последовательность может направлять полипептид в ядро клетки, используя различные сигналы ядерной локализации (NLS). По-

следовательность NLS может состоять из одной части или из двух частей.

Неограничительные примеры NLS включают последовательности NLS, происходящие из: NLS большого Т-антигена вируса SV40 с аминокислотной последовательностью PKKKRKV (SEQ ID NO: 2); NLS из нуклеоплазмينا (например, двухчастного NLS нуклеоплазмينا с последовательностью KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 3)); NLS с-мус с аминокислотной последовательностью PA-AKRVKLD (SEQ ID NO: 4) или RQRRNELKRSP (SEQ ID NO: 5); NLS hRNPA1 M9 с последовательностью NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGYYFAKPRNQGGY (SEQ ID NO: 6); последовательности RMRIZFKNKGKDTAELRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV (SEQ ID NO: 7) из домена IBB альфа-импортина; последовательности VSRKRPRP (SEQ ID NO: 8) и PPKKARED (SEQ ID NO: 9) из Т-белка миомы; последовательности PPKKKPL (SEQ ID NO: 10) из p53 человека; последовательности SALIK-KKKKMAP (SEQ ID NO: 11) из c-abl IV мыши; последовательности DRLRR (SEQ ID NO: 12) и PKQKRRK (SEQ ID NO: 13) из NS1 вируса гриппа; последовательности RKLKKKIKKL (SEQ ID NO: 14) из дельта-антигена вируса гепатита; последовательности REKKKFLKRR (SEQ ID NO: 15) из белка Mx1 мыши; последовательности KRKGDEVGDGVDEVAKKKKK (SEQ ID NO: 16) из полимеразы поли-(ADP-рибозы) человека; и последовательности RKCLQAGMNLEARKTKK (SEQ ID NO: 17) из глюкокортикоидного рецептора стероидных гормонов человека.

В некоторых воплощениях нацеливающая последовательность включает нацеливающий на мембрану пептид и направляет полипептид в плазматическую мембрану или мембрану клеточной органеллы. Нацеливающая на мембрану последовательность может обеспечивать транспорт химерного полипептида трансмембранного рецептора на поверхностную клеточную мембрану или на другую клеточную мембрану. Связанные с клеточными мембранами молекулы содержат определенные участки, способствующие мембранной ассоциации, и такие участки могут быть включены в нацеливающую на мембрану последовательность. Например, некоторые белки содержат последовательности на N-конце или C-конце, которые ацилированы, и эти ацильные группировки способствуют связи с мембраной. Такие последовательности могут распознаваться ацилтрансферазами и зачастую соответствуют определенному мотиву в последовательности. Некоторые ацилирующие мотивы могут быть модифицированы одной ацильной группировкой (зачастую за ней следуют несколько положительно заряженных остатков (к примеру, с-Src человека) для улучшения ассоциации с анионными "головками" липидов), а другие могут быть модифицированы несколькими ацильными группировками. Например, N-концевая последовательность белковой тирозинкиназы Src может содержать одну миристоиловую группировку. Двойные участки ацилирования располагаются в N-концевых районах некоторых протеинкиназ типа подгруппы представителей семейства Src (например, Yes, Fyn, Lck) и α -субъединицы G-белков. Такие двойные участки ацилирования часто располагаются в пределах первых 18 аминокислот таких белков и соответствуют мотиву последовательности Met-Gly-Cys-Xaa-Cys (SEQ ID NO: 18), причем Met отщепляется, Gly подвергается N-ацилированию, а один из остатков Cys подвергается S-ацилированию. Зачастую Gly подвергается миристоилированию, а Cys - пальмитоилированию. Также могут использоваться участки ацилирования, соответствующие мотиву последовательности Cys-Ala-Ala-Xaa (так называемой "рамки СААХ"), которые могут быть модифицированы группировкой C15- или C10-изопренила, из C-концевых участков γ -субъединиц G-белков и других белков. Эти и другие ацилирующие мотивы включают, к примеру, приведенные в Gauthier-Campbell et al., *Molecular Biology of the Cell* 15: 2205-2217 (2004); Glati et al., *Biochem. J.* 303: 697-700 (1994); и Zlakine et al., *J. Cell Science* 110: 673-679 (1997), и могут быть включены в нацеливающие последовательности, чтобы индуцировать мембранную локализацию.

В некоторых воплощениях в нацеливающую последовательность включена нативная последовательность из белка, содержащего ацилирующий мотив. Например, в некоторых воплощениях в N-концевой участок химерного полипептида может быть включена N-концевая часть Lck, Fyn или Yes или альфа-субъединицы G-белка, как-то первые 25 N-концевых аминокислот такого белка или меньше (например, от 5 до 20 аминокислот, от 10 до 19 аминокислот или от 15 до 19 аминокислот из нативной последовательности, необязательно с мутациями). В некоторых воплощениях с C-концом химерного полипептида может быть связана C-концевая последовательность из 25 или менее аминокислот из γ -субъединицы G-белка, содержащей последовательность мотива рамки СААХ (например, от 5 до 20 аминокислот, от 10 до 18 аминокислот или от 15 до 18 аминокислот из нативной последовательности, необязательно с мутациями).

Может использоваться любая нацеливающая на мембрану последовательность. В некоторых воплощениях такие последовательности включают, без ограничения, нацеливающие последовательности миристоилирования, нацеливающие последовательности пальмитоилирования, последовательности пре-нирования (например, фарнезилирования, геранил-геранилирования, рамки СААХ), мотивы межбелкового взаимодействия или трансмембранные последовательности (с использованием сигнальных пептидов) из рецепторов. Примеры включают приведенные, к примеру, в ten Klooster J.P. et al., *Biology of Cell* (2007) 99, 1-12; Vincent S. et al., *Nature Biotechnology* 21: 936-40, 1098 (2003).

Существуют и другие белковые домены, которые могут усиливать удержание белка в различных мембранах. Например, домен гомологичности плекстрина (PH) в ~120 аминокислот встречается у более

чем 200 белков человека, которые обычно участвуют во внутриклеточной сигнализации. PH-домены могут связываться с различными липидами фосфатидилинозитола (PI) в мембранах (например, PI (3,4,5)-P3, PI (3,4)-P2, PI (4,5)-P2) и тем самым играть ключевую роль в рекрутинге белков в различные мембранные или клеточные компартменты. Часто уровень фосфорилирования PI-липидов регулируется, к примеру, киназой PI-3 или PTEN, поэтому взаимодействие мембран с PH-доменами может быть не таким стабильным, как при ацилировании липидов.

В некоторых воплощениях в нацеливающих последовательностях, направляющих полипептиды в клеточную мембрану, может использоваться сигнальная последовательность мембранного якорения. Имеются различные последовательности мембранного якорения. Например, можно использовать сигнальные последовательности мембранного якорения из различных мембраносвязанных белков. Последовательности могут включать в себя таковые из: 1) интегральных мембранных белков класса I типа β -цепи рецептора IL-2 и β -цепи рецептора инсулина; 2) интегральных мембранных белков класса II типа нейтральной эндопептидазы; 3) белков III типа, таких как цитохром P450 NF-25 человека; и 4) белков IV типа, таких как P-гликопротеин человека.

В некоторых воплощениях химерный рецепторный полипептид связан с доменом фолдинга полипептидов, который может способствовать сворачиванию белка. В некоторых воплощениях исполнительный элемент связан с доменом проникновения в клетки. Например, домен проникновения в клетки может происходить из белка TAT HIV-1, мотива проникновения в клетки TLM из вируса гепатита В человека, MPG, Rep-1, VP22, проникающего в клетки пептида вируса Herpes simplex или последовательности полиаргининового пептида. Проникающий в клетки домен может располагаться на N-конце, C-конце или же где-то внутри исполнительного элемента.

Нацеливающая последовательность может быть связана с любым подходящим участком химерного рецепторного полипептида, к примеру, на N-конце, C-конце или во внутренней области рецептора. В некоторых воплощениях с рецептором связаны по меньшей мере две нацеливающие последовательности. У типичного химерного рецепторного полипептида, представленного на фиг. 5, первая нацеливающая последовательность 501a может быть связана с внеклеточной областью рецептора, а вторая нацеливающая последовательность 501b может быть связана с внутриклеточной областью рецептора типа GMP. Когда рецептор связан с несколькими нацеливающими последовательностями, к примеру, с нацеливающими последовательностями, направляющими в разные компартменты клетки, то окончательная локализация рецептора может определяться относительной силой нацеливающих последовательностей. Например, рецептор, содержащий и нацеливающую последовательность, включающую NES, и нацеливающую последовательность, включающую NLS, может локализоваться в цитоплазме, если NES будет сильнее, чем NLS. С другой стороны, если NLS будет сильнее, чем NES, то рецептор может локализоваться в ядре, даже если у рецептора будет присутствовать как сигнал ядерной локализации, так и сигнал ядерного экспорта. Нацеливающая последовательность может содержать несколько копий, к примеру, каждого из NLS и NES, для точной настройки клеточной локализации.

В некоторых случаях нацеливающая последовательность связана с исполнительным элементом. После высвобождения исполнительного элемента из GMP при расщеплении сайта распознавания расщепления нацеливающая последовательность может направить исполнительный элемент в такое место клетки, которое отличается от рецептора. Например, химерный трансмембранный рецептор может содержать первую нацеливающую последовательность, которая направляет рецептор на плазматическую мембрану, а исполнительный элемент может отдельно содержать вторую нацеливающую последовательность, которая направляет локализацию в ядро клетки. Первоначально исполнительный элемент (входящий в состав рецептора) может локализоваться на плазматической мембране из-за первой нацеливающей последовательности. После высвобождения исполнительного элемента из GMP при расщеплении сайта распознавания расщепления исполнительный элемент может локализоваться в ядре клетки под действием нацеливающей последовательности. В некоторых воплощениях исполнительный элемент транслоцируется в ядро клетки после расщепления сайта распознавания расщепления.

Связывание химерного адаптерного полипептида с химерным трансмембранным полипептидом рецептора, когда рецепторный полипептид подвергается модификации при связывании с антигеном, может привести расщепляющий элемент в близость с сайтом распознавания расщепления. При расщеплении сайта распознавания исполнительный элемент может высвободиться из GMP. После высвобождения исполнительный элемент может образовывать комплекс с полинуклеотидом-мишенью, к примеру, в цитоплазме клетки или в ядре клетки. Образование комплекса исполнительного элемента с полинуклеотидом-мишенью может регулировать экспрессию и/или активность по меньшей мере одного гена или редактировать последовательность нуклеиновой кислоты.

В другой типичной конфигурации GMP входит в состав химерного адаптерного полипептида, а расщепляющий элемент входит в состав внутриклеточной области химерного полипептида трансмембранного рецептора. Химерный адаптерный полипептид в типичной конфигурации может содержать: (а) участок рецепторного связывания, который связывается с рецептором, подвергшимся модификации при связывании с антигеном, причем данный рецептор включает внутриклеточную область, содержащую

сигнальный домен иммунной клетки; и (b) ген-модулирующий полипептид (GMP), связанный с участком рецепторного связывания, причем GMP содержит исполнительный элемент, связанный с сайтом распознавания расщепления; причем исполнительный элемент высвобождается из GMP при расщеплении сайта распознавания расщепления только после связывания участком рецепторного связывания с модифицированным рецептором. Как видно из фиг. 6А, типичный химерный адаптерный полипептид может содержать участок рецепторного связывания 601, связанный с GMP 602. GMP может содержать исполнительный элемент 603, связанный с сайтом распознавания расщепления 604.

Участок рецепторного связывания у химерного адаптерного полипептида может быть любой белок, его производное, вариант или фрагмент, который может связываться с рецептором. Участок рецепторного связывания может связывать, к примеру, химерный трансмембранный рецептор, который подвергся модификации в ответ на связывание антигена. Участок рецепторного связывания может содержать связывающий домен партнера по связыванию (например, белка), который рекрутируется в рецептор, подвергшийся модификации. В некоторых воплощениях модификация рецептора включает конформационное изменение по меньшей мере в одной области рецептора. В некоторых воплощениях модификация рецептора включает химическую модификацию типа фосфорилирования или дефосфорилирования. В некоторых воплощениях модификация рецептора включает модификации по нескольким сайтам модификации, причем каждый сайт модификации эффективно связывается с адаптерным полипептидом. В некоторых случаях участок рецепторного связывания связывает сигнальный домен иммунной клетки. Участок рецепторного связывания может связывать, к примеру, первичный сигнальный домен и/или костимулирующий домен. Если рецептор содержит домен ITAM или ITIM, то участок рецепторного связывания может включать и партнера по связыванию (например, белок), рекрутированный в фосфорилированный ITAM или ITIM, либо его производное, вариант или фрагмент.

Партнеры по связыванию (например, белки), способные связывать фосфорилированные субстраты типа фосфорилированного ITAM и/или ITIM, включают, без ограничения, такие молекулы, как белки, содержащие домен гомологии-2 Src (SH2) и связывающий фосфотирозин домен (PTB). Примеры белков, содержащих домен SH2, включают ABL1, ABL2, BCAR3, BLK, BLNK, BMX, BTK, CHN2, CISH, CRK, CRKL, CSK, DAPP1, EAT-2, FER, FES, FGR, FRK, FYN, GADS, GRAP, GRAP2, GRB10, GRB14, GRB2, GRB7, HCK, HSH2D, INPP5D, INPPL1, ITK, JAK2, LCK, LCP2, LYN, MATK, NCK1, NCK2, PIK3R1, PIK3R2, PIK3R3, PLCG1, PLCG2, PTK6, PTPN11, PTPN6, RASA1, SAP, SH2B1, SH2B2, SH2B3, SH2D1A, SH2D1B, SH2D2A, SH2D3A, SH2D3C, SH2D4A, SH2D4B, SH2D5, SH2D6, SH3BP2, SHB, SHC1, SHC2, SHC3, SHC4, SHD, SHE, SHP1, SHP2, SLA, SLA2, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6, SOCS7, SRC, SRMS, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6, SUPT6H, SYK, TEC, TENC1, TNS, TNS1, TNS3, TNS4, TXK, VAV1, VAV2, VAV3, YES1 и ZAP70. Примеры белков, содержащих домен PTB, включают APBA1, APBA2, APBA3, EPS8, EPS8L1, EPS8L2, EPS8L3, TENC1, TNS, TNS1, TNS3, TNS4, DOK1, DOK2, DOK3, DOK4, DOK5, DOK6, DOK7, FRS2, FRS3, IRS1, IRS2, IRS3, IRS4, SHC1, SHC2, SHC3, SHC4, TLN1, TLN2 и X11a. В некоторых воплощениях участок рецепторного связывания включает белок, содержащий домен SH2 и/или домен PTB либо его производное, вариант или фрагмент. В некоторых воплощениях участок рецепторного связывания содержит домен рецепторного связывания из ZAP70. В некоторых воплощениях участок рецепторного связывания содержит костимулирующую молекулу либо её производное, вариант или фрагмент, который рекрутируется в модифицированный рецептор.

В некоторых конфигурациях химерный адаптерный полипептид рассматриваемой системы может включать ген-модулирующий полипептид (GMP). Как уже описано здесь, GMP может содержать исполнительный элемент, связанный с сайтом распознавания расщепления. Исполнительный элемент может содержать нуклеазу (например, ДНК-нуклеазу и/или РНК-нуклеазу), модифицированную нуклеазу (например, ДНК-нуклеазу и/или РНК-нуклеазу), которая дефектна по нуклеазе или обладает меньшей нуклеазной активностью по сравнению с нуклеазой дикого типа, её вариант, производное или фрагмент, как уже описано здесь. Исполнительный элемент может регулировать экспрессию и/или активность гена или редактировать последовательность нуклеиновой кислоты (например, гена и/или продукта гена). Исполнительный элемент может регулировать экспрессию или активность гена и/или редактировать последовательность нуклеиновой кислоты, будь то экзогенной или эндогенной. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит ДНК-нуклеазу типа генно-инженерной (например, программируемой или наводимой) ДНК-нуклеазы, чтобы запускать геномное редактирование последовательности ДНК-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит РНК-нуклеазу типа генно-инженерной (например, программируемой или наводимой) РНК-нуклеазы, чтобы запускать редактирование последовательности РНК-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент обладает пониженной или минимальной нуклеазной активностью. Исполнительный элемент с пониженной или минимальной нуклеазной активностью может регулировать экспрессию и/или активность гена путем создания физических препятствий полинуклеотиду-мишени или привлечения дополнительных факторов, эффективно подавляющих или усиливающих экспрессию полинуклеотида-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит безнуклеазный ДНК-связывающий белок, происходящий из ДНК-нуклеазы, который может вызывать активацию или репрессию транскрипции последовательности

ДНК-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит безнуклеазный РНК-связывающий белок, происходящий из РНК-нуклеазы, который может вызывать активацию или репрессию транскрипции последовательности РНК-мишени. Например, исполнительный элемент может содержать Cas-белок, который не обладает активностью расщепления.

В исполнительных элементах может использоваться любая подходящая нуклеаза. К подходящим нуклеазам относятся, без ограничения, CRISPR-ассоциированные (Cas) белки или Cas-нуклеазы, в том числе CRISPR-ассоциированные (Cas) полипептиды I типа, CRISPR-ассоциированные (Cas) полипептиды II типа, CRISPR-ассоциированные (Cas) полипептиды III типа, CRISPR-ассоциированные (Cas) полипептиды IV типа, CRISPR-ассоциированные (Cas) полипептиды V типа и CRISPR-ассоциированные (Cas) полипептиды VI типа; нуклеазы с "цинковым пальцем" (ZFN); эффекторные нуклеазы типа активаторов транскрипции (TALEN); мегануклеазы; РНК-связывающие белки (RBP); CRISPR-ассоциированные РНК-связывающие белки; рекомбиназы; флипазы; транспозазы; белки Argonaute; их производные, варианты или фрагменты.

В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит Cas-белок, который образует комплекс с направляющей нуклеиновой кислотой типа направляющей РНК. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит РНК-связывающий белок (RBP), необязательно в комплексе с направляющей нуклеиновой кислотой типа направляющей РНК, который способен образовывать комплекс с Cas-белком. На фиг. 6B представлен типичный химерный адаптерный полипептид, у которого исполнительный элемент содержит РНК-связывающий белок 600a, необязательно в комплексе с направляющей нуклеиновой кислотой. После высвобождения из РНК-связывающего белка (RBP), к примеру, при диссоциации направляющей нуклеиновой кислоты из RBP или расщеплении сайта распознавания расщепления, направляющая нуклеиновая кислота может образовать комплекс с Cas-белком 600b, который способен регулировать экспрессию и/или активность гена или редактировать последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит безнуклеазный ДНК-связывающий белок, происходящий из ДНК-нуклеазы, который может вызывать активацию или репрессию транскрипции последовательности ДНК-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит безнуклеазный РНК-связывающий белок, происходящий из РНК-нуклеазы, который может вызывать активацию или репрессию транскрипции последовательности РНК-мишени. Например, исполнительный элемент может содержать Cas-белок, который не обладает активностью расщепления.

В некоторых воплощениях сайт распознавания расщепления фланкирован участком рецепторного связывания и исполнительным элементом. Исполнительный элемент может высвобождаться из GMP при расщеплении сайта распознавания расщепления расщепляющим элементом. Расщепляющий элемент может распознавать и/или расщеплять сайт распознавания расщепления, к примеру, когда он находится поблизости от сайта распознавания расщепления. Расщепляющий элемент может содержать полипептидную последовательность. В некоторых конфигурациях расщепляющий элемент входит в состав химерного полипептида трансмембранного рецептора. Расщепляющий элемент может составлять N-конец, C-конец или внутреннюю часть рецептора. Расщепляющий элемент может входить в комплекс с N-концом, C-концом или внутренней частью рецептора. В типичной конфигурации, представленной на фиг. 7, сайт распознавания расщепления 703 фланкирован участком рецепторного связывания 701 и исполнительным элементом 704, а расщепляющий элемент 706 входит в состав химерного полипептида трансмембранного рецептора 705.

На фиг. 8A-D схематически представлено высвобождение исполнительного элемента из GMP. На фиг. 8A представлено связывание антигена с химерным полипептидом трансмембранного рецептора. Химерный полипептид трансмембранного рецептора включает внеклеточную область, содержащую взаимодействующий с антигеном домен 805, и внутриклеточную область, содержащую расщепляющий элемент 806. Расщепляющий элемент может входить в комплекс с рецептором или соединяться с рецептором, к примеру, пептидной связью и/или пептидным линкером. GMP входит в состав химерного адаптерного полипептида. GMP, соединенный с участком рецепторного связывания 801, включает в себя исполнительный элемент 802a, соединенный с сайтом распознавания расщепления 802b. В ответ на связывание антигена рецептор подвергается модификации путем фосфорилирования 803 во внутриклеточной области рецептора (фиг. 8B). После модификации (например, фосфорилирования) рецептора к рецептору рекрутируется химерный адаптерный полипептид, как показано на фиг. 8C. Рецептор содержит расщепляющий элемент 806. Когда он находится в непосредственной близости от сайта распознавания расщепления, расщепляющий элемент может расщеплять сайт распознавания, высвобождая исполнительный элемент из GMP, как показано на фиг. 8D. После высвобождения исполнительный элемент может поступать в ядро для регуляции экспрессии и/или активности гена-мишени или редактирования последовательности нуклеиновой кислоты. На фиг. 8E-H представлена аналогичная система, в которой модификация рецептора включает конформационное изменение. В некоторых воплощениях химерный адаптерный белок привязан к мембране (например, в виде мембраносвязанного белка).

В других конфигурациях расщепляющий элемент находится в комплексе со вторым адаптерным полипептидом, который связывает химерный полипептид трансмембранного рецептора, когда рецепторный полипептид подвергается модификации при связывании с антигеном. В типичной конфигурации,

показанной на фиг. 9, сайт распознавания расщепления 903 фланкирован участком рецепторного связывания 901 и исполнительным элементом 904, а расщепляющий элемент 906 входит в состав второго адаптерного полипептида 907.

На фиг. 10A-D схематически представлено высвобождение исполнительного элемента из GMP. На фиг. 108A представлено связывание антигена с химерным полипептидом трансмембранного рецептора. Химерный полипептид трансмембранного рецептора включает внеклеточную область, содержащую взаимодействующий с антигеном домен, и внутриклеточную область. GMP, содержащий исполнительный элемент, соединенный с сайтом распознавания расщепления, входит в состав химерного адаптерного полипептида. Сайт распознавания расщепления 1002b фланкирован участком рецепторного связывания 1001 и исполнительным элементом 1002a. В ответ на связывание антигена рецептор подвергается модификации путем фосфорилирования 1003 во внутриклеточной области (фиг. 10B). После модификации (например, фосфорилирования) рецептора к нему рекрутируется химерный адаптерный полипептид, как показано на фиг. 10B. Второй адаптерный полипептид 1007, содержащий расщепляющий элемент 1006, тоже рекрутируется в модифицированный рецептор (фиг. 10C). Расщепляющий элемент может входить в комплекс со вторым адаптерным полипептидом или соединяться с ним, к примеру, пептидной связью и/или пептидным линкером. Когда он находится поблизости от сайта распознавания расщепления, расщепляющий элемент может расщеплять сайт распознавания, высвобождая исполнительный элемент из GMP, как показано на фиг. 10D. После высвобождения исполнительный элемент может поступать в ядро для регуляции экспрессии и/или активности гена-мишени или редактирования последовательности нуклеиновой кислоты. На фиг. 10E-H представлена система в альтернативной конфигурации, в которой химерный адаптерный полипептид содержит расщепляющий элемент, а второй адаптерный полипептид содержит исполнительный элемент. В некоторых воплощениях химерный адаптерный полипептид привязан к мембране (например, в виде мембраносвязанного белка). В некоторых воплощениях второй адаптерный полипептид привязан к мембране (например, в виде мембраносвязанного белка).

На фиг. 18A-D схематически представлено высвобождение исполнительного элемента в системе, включающей первый мембраносвязанный адаптер и второй цитоплазматический адаптер. На фиг. 18A представлена ассоциация первого мембраносвязанного адаптера, содержащего домен мембранной привязки 1801a (например, СААХ), сайт распознавания протеазы 1801b (например, TEV) и исполнительный элемент 1801c, с химерным трансмембранным рецептором 1802.

Химерный трансмембранный рецептор может функционировать в качестве каркаса и включает в себя по меньшей мере два адаптер-связывающих сайта (например, EGFR или рецепторной тирозинкиназы (RTK)). Один адаптер-связывающий сайт может связываться с мембраносвязанным адаптером, как показано на фиг. 18B. В некоторых случаях связывание мембраносвязанного адаптера зависит от связывания антигена с рецептором. В некоторых системах мембраносвязанный адаптер располагается поблизости от рецептора, и ассоциация может не зависеть от связывания антигена с рецептором. Как показано на фиг. 18B и 18C, при взаимодействии антигена с рецептором может условно рекрутироваться второй адаптерный белок, содержащий цитоплазматический рецептор-связывающий элемент 1803a и протеазу 1803b, к другому адаптер-связывающему сайту рецептора. Содержащий протеазу второй адаптерный белок при рекрутировании к трансмембранному рецептору может расщеплять сайт распознавания протеазы 1801b у мембраносвязанной молекулы, тем самым высвобождая исполнительный элемент 1801c, как показано на фиг. 18D.

В некоторых воплощениях расщепляющий элемент расщепляет по сайту распознавания только тогда, когда он находится вблизи сайта распознавания расщепления. Сайт распознавания расщепления содержит полипептидную последовательность, которая является последовательностью распознавания для протеазы (например, домен расщепления пептида). Расщепляющий элемент обладает активностью протеазы, которая распознает полипептидную последовательность. Расщепляющий элемент, обладающий протеазной активностью, может содержать любую протеазу, включая (без ограничения) протеазы, уже описанные здесь, либо их производные, варианты или фрагменты. В некоторых воплощениях сайт распознавания расщепления содержит несколько последовательностей распознавания расщепления, причем каждая последовательность распознавания расщепления может распознаваться одним и тем же или разными расщепляющими элементами, обладающими протеазной активностью (например, протеазой).

В некоторых воплощениях сайт распознавания расщепления содержит первую часть последовательности интеина, которая реагирует со второй частью последовательности интеина с высвобождением исполнительного элемента. Для облегчения высвобождения исполнительного элемента из химерного адаптерного полипептида может использоваться гетерологическая система с разделенным интеином. Исполнительный элемент может ковалентно соединяться с первой частью последовательности интеина. Исполнительный элемент может соединяться через свой N-конец или C-конец с первой частью последовательности интеина. Расщепляющий элемент может содержать вторую часть последовательности интеина. Первой частью или второй частью последовательности интеина может быть N-концевой интеин, C-концевой интеин или любая другая подходящая часть интеина, которая может способствовать высвобождению исполнительного элемента. Последовательности интеина могут происходить из любого подходящего источника. Первая и вторая часть могут быть из одного источника (например, организма, бел-

ка) или из разных источников. В одном показательном примере исполнительный элемент может быть ковалентно связан (например, на своем N-конце или C-конце) пептидной связью с первой частью последовательности интеина, содержащей N-конец интеина. Слитый с N-концом интеина исполнительный элемент может входить в контакт со второй частью последовательности интеина, содержащей C-конец интеина. При таком контакте между первой и второй частью последовательности интеина может происходить сайт-специфичное расщепление (например, на участке между исполнительным элементом и N-концом интеина), при этом высвобождается исполнительный элемент. В другом показательном примере исполнительный элемент может быть ковалентно связан (например, на своем N-конце или C-конце) пептидной связью с первой частью последовательности интеина, содержащей C-конец интеина. Слитый с C-концом интеина исполнительный элемент может входить в контакт со второй частью последовательности интеина, содержащей N-конец интеина. При таком контакте между первой и второй частью интеина может происходить сайт-специфичное расщепление (например, на подходящем участке между исполнительным элементом и C-концом интеина), при этом высвобождается исполнительный элемент.

В некоторых воплощениях сайт распознавания расщепления содержит дисульфидную связь. Дисульфидная связь может соединять исполнительный элемент с химерным адаптерным полипептидом. Дисульфидная связь может образовываться между одним или несколькими цистеинами исполнительного элемента и участком рецепторного связывания. Цистеины могут быть встроены в исполнительный элемент или участок рецепторного связывания. Цистеины могут входить в состав нативной или последовательности дикого типа исполнительного элемента или участка рецепторного связывания. Цистеин может присутствовать в линкерном пептиде, присоединенном к исполнительному элементу или участку рецепторного связывания. Расщеплению дисульфидной связи может способствовать, к примеру, изменение окислительно-восстановительных условий у дисульфидной связи. Изменение окислительно-восстановительных условий может приводить к восстановлению дисульфидной связи до тиолов и высвобождению исполнительного элемента. Расщеплению дисульфидной связи может способствовать расщепляющий элемент, содержащий окислительно-восстановительное средство, которое может катализировать восстановление дисульфидной связи. Окислительно-восстановительным средством может быть фермент либо его производное, вариант или фрагмент. Фермент может быть оксидоредуктазой. Примеры оксидоредуктаз включают белок-дисульфидредуктазы, тиоредоксины, глутаредоксины, тиол-дисульфидоксидоредуктазы (например, DsbA, BdbA-D, MdbA и SdbA) и глутатион-дисульфидредуктазы. Окислительно-восстановительное средство может быть из любого подходящего источника, включая прокариот и эукариот. Для оптимальной активности фермента могут потребоваться кофакторы (например, никотинамидные кофакторы, флавины либо их производные и аналоги).

В некоторых воплощениях химерный адаптерный полипептид содержит по меньшей мере одну нацеливающую последовательность, которая направляет транспорт адаптера в определенный район клетки. К примеру, нацеливающая последовательность может направлять рецептор в ядро клетки, используя сигнал ядерной локализации (NLS), за пределы ядра (например, в цитоплазму), используя сигнал ядерного экспорта (NES), в митохондрии, эндоплазматический ретикулум (ER), аппарат Гольджи, хлоропласты, апопласты, пероксисомы, плазматические мембраны или мембраны различных органелл клетки. В некоторых воплощениях нацеливающая последовательность содержит сигнал ядерного экспорта (NES) и направляет химерный адаптерный полипептид за пределы ядра. В некоторых воплощениях нацеливающая последовательность содержит сигнал ядерной локализации (NLS) и направляет адаптер в ядро клетки. Нацеливающая последовательность может направлять полипептид в ядро клетки, используя различные сигналы ядерной локализации (NLS). В некоторых воплощениях нацеливающая последовательность включает нацеливающий на мембрану пептид и направляет адаптер на плазматическую мембрану или мембрану клеточной органеллы. Нацеливающая последовательность может направлять адаптер на мембрану, используя сигнальную последовательность мембранного якорения, как описано выше. Доступны различные последовательности мембранного якорения.

Нацеливающая последовательность может быть связана с любым подходящим участком химерного адаптерного полипептида, к примеру, на N-конце, C-конце полипептида или во внутренней области адаптера. В некоторых воплощениях с адаптером связаны по меньшей мере две нацеливающие последовательности. Например, как показано на фиг. 11, первая нацеливающая последовательность 1101a может быть связана с участком рецепторного связывания адаптера, а вторая нацеливающая последовательность 1101b может быть связана с GMP адаптера, к примеру, с исполнительным элементом. Когда адаптер связан с несколькими нацеливающими последовательностями, к примеру, с нацеливающими последовательностями, направляющими в разные компартменты клетки, то окончательная локализация адаптера может определяться относительной силой нацеливающих последовательностей. Например, адаптер, содержащий и нацеливающую последовательность, включающую NES, и нацеливающую последовательность, включающую NLS, может локализоваться в цитоплазме, если NES будет сильнее, чем NLS. С другой стороны, если NLS будет сильнее, чем NES, то адаптер может локализоваться в ядре, даже если у адаптера будет присутствовать как сигнал ядерной локализации, так и сигнал ядерного экспорта. Нацеливающая последовательность может содержать несколько копий, к примеру, каждого из NLS и NES, для точной настройки клеточной локализации.

В некоторых случаях нацеливающая последовательность связана с исполнительным элементом. После высвобождения исполнительного элемента из GMP при расщеплении сайта распознавания расщепления нацеливающая последовательность может направлять исполнительный элемент в такое место клетки, которое отличается от адаптера. Например, химерный адаптерный полипептид может содержать первую нацеливающую последовательность, которая направляет адаптер в цитоплазму клетки, а исполнительный элемент может отдельно содержать вторую нацеливающую последовательность, которая направляет локализацию в ядро клетки. Первоначально исполнительный элемент (входящий в состав адаптера) может локализоваться в цитоплазме клетки из-за первой нацеливающей последовательности. После высвобождения исполнительного элемента из GMP при расщеплении сайта распознавания расщепления исполнительный элемент может локализоваться в ядре клетки под действием второй нацеливающей последовательности. В некоторых воплощениях исполнительный элемент транслоцируется в ядро клетки после расщепления последовательности распознавания расщепления.

В некоторых воплощениях нацеливающая последовательность включает нацеливающий на мембрану пептид и направляет полипептид в плазматическую мембрану или мембрану клеточной органеллы. Нацеливающая на мембрану последовательность может обеспечивать транспорт химерного полипептида трансмембранного рецептора на поверхностную клеточную мембрану или на другую клеточную мембрану. Может использоваться любая подходящая нацеливающая на мембрану последовательность, описанная здесь.

В некоторых воплощениях химерный адаптерный полипептид связан с доменом фолдинга полипептидов, который может способствовать сворачиванию белка. В некоторых воплощениях исполнительный элемент может быть связан с доменом проникновения в клетки. Например, домен проникновения в клетки может происходить из белка TAT HIV-1, мотива проникновения в клетки TLM из вируса гепатита В человека, MPG, Per-1, VP22, проникающего в клетки пептида вируса Herpes simplex или последовательности полиаргининового пептида. Проникающий в клетки домен может располагаться на N-конце, C-конце или же где-то внутри исполнительного элемента.

Исполнительный элемент рассматриваемой системы после высвобождения из химерного адаптерного полипептида или химерного полипептида трансмембранного рецептора может связываться с полинуклеотидом-мишенью и регулировать экспрессию и/или активность полинуклеотида-мишени путем создания физической преграды полинуклеотиду-мишени или привлечения дополнительных факторов для эффективного подавления или усиления экспрессии полинуклеотида-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит активатор транскрипции для эффективного повышения экспрессии полинуклеотида-мишени. Исполнительный элемент может содержать репрессор транскрипции для эффективного снижения экспрессии полинуклеотида-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент способен редактировать последовательность нуклеиновой кислоты.

В некоторых воплощениях полинуклеотид-мишень содержит геномную ДНК. В некоторых воплощениях полинуклеотид-мишень содержит участок плазмиды, к примеру, плазмиды, несущей экзогенный ген. В некоторых воплощениях полинуклеотид-мишень содержит РНК, например, мРНК. В некоторых воплощениях полинуклеотид-мишень содержит эндогенный ген или генный продукт. Исполнительный элемент может включать в себя одну или несколько копий сигнала ядерной локализации, что позволяет ему перемещаться в ядро клетки при отщеплении от GMP.

В другой типичной конфигурации GMP входит в состав химерного полипептида трансмембранного рецептора, а расщепляющий элемент входит в состав химерного трансмембранного полипептида. В некоторых воплощениях химерный трансмембранный полипептид, содержащий расщепляющий элемент, содержит взаимодействующий с антигеном домен, и его также можно называть трансмембранным рецепторным полипептидом. Этот трансмембранный рецепторный полипептид в некоторых случаях содержит сигнальный домен иммунной клетки. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает тот же самый антиген, что и химерный полипептид трансмембранного рецептора, содержащий GMP. В некоторых воплощениях взаимодействующий с антигеном домен связывает другой антиген, чем химерный полипептид трансмембранного рецептора, содержащий GMP. В некоторых воплощениях химерный трансмембранный полипептид не содержит взаимодействующего с антигеном домена и может именоваться трансмембранным белком. Как описано выше, GMP может содержать исполнительный элемент, связанный с последовательностью распознавания расщепления. Химерный полипептид трансмембранного рецептора, содержащий расщепляющий элемент, может кластеризоваться и/или взаимодействовать с химерным трансмембранным полипептидом (например, рецепторным или не рецепторным), содержащим GMP, в ответ на связывание антигена с химерным полипептидом трансмембранного рецептора. Кластеризация и/или взаимодействие между двумя полипептидами может приводить GMP в непосредственную близость с расщепляющим элементом, что способствует расщеплению сайта распознавания расщепления расщепляющим элементом. Трансмембранный белок, содержащий расщепляющий элемент, может кластеризоваться и/или взаимодействовать с содержащим GMP химерным полипептидом трансмембранного рецептора при связывании лиганда с внеклеточной областью химерного полипептида трансмембранного рецептора. В некоторых воплощениях химерный трансмембранный полипептид содержит молекулу T-клеточного рецепторного комплекса либо его производное, вариант или

фрагмент. В некоторых воплощениях химерный трансмембранный полипептид (например, рецепторный или не рецепторный) содержит молекулу, способную кластеризоваться и/или олигомеризоваться с другим трансмембранным полипептидом (рецепторным или не рецепторным), либо её производное, вариант или фрагмент. На фиг. 19 представлена иллюстрация системы, в которой GMP входит в состав первого химерного полипептида трансмембранного рецептора 1901, а расщепляющий элемент входит в состав второго химерного полипептида трансмембранного рецептора 1902. При связывании антигена со внеклеточными антигенсвязывающими доменами первого и второго рецепторного полипептида первый и второй химерный трансмембранный рецепторный полипептид могут кластеризоваться, приводя расщепляющий элемент 1905 в близость с сайтом распознавания расщепления 1903. Расщепляющий элемент способен расщеплять и высвобождать исполнительный элемент 1904 (например, Cas9, необязательно в комплексе с sgРНК, например, dCas9) из рецептора.

Системы и композиции настоящего изобретения применимы в ряде приложений. Например, системы и способы настоящего изобретения применимы в способах регуляции экспрессии генов и/или клеточной активности. В одном аспекте раскрыты здесь системы и композиции используются в способах регуляции экспрессии генов и/или клеточной активности в иммунных клетках. Иммунные клетки, регулируемые с помощью данной системы, могут быть полезными в различных приложениях, включая, без ограничения, иммунотерапию для лечения заболеваний и расстройств. Заболевания и расстройства, которые можно лечить с помощью модифицированных иммунных клеток настоящего изобретения, включают воспалительные заболевания, раковые и инфекционные заболевания. В некоторых воплощениях иммунотерапия применяется для лечения рака.

Рассматриваемые системы можно вводить в различные иммунные клетки, в том числе любые клетки, участвующие в иммунном ответе. В некоторых воплощениях иммунные клетки включают гранулоциты типа азофилов, эозинофилов и нейтрофилов; тучные клетки; моноциты, которые могут превращаться в макрофаги; антиген-презентирующие клетки типа дендритных клеток; и лимфоциты типа клеток естественных киллеров (NK-клеток), В-клеток и Т-клеток. В некоторых воплощениях иммунные клетки представлены иммунными эффекторными клетками. Иммунные эффекторные клетки - это такие иммунные клетки, которые могут выполнять определенную функцию в ответ на стимул. В некоторых воплощениях иммунные клетки представлены такими иммунными эффекторными клетками, которые могут индуцировать клеточную смерть. В некоторых воплощениях иммунные клетки представлены лимфоцитами. В некоторых воплощениях лимфоциты представлены NK-клетками. В некоторых воплощениях лимфоциты представлены Т-клетками. В некоторых воплощениях Т-клетки представлены активированными Т-клетками. Т-клетки включают как наивные, так и клетки памяти (например, центральной памяти или T_{CM} , эффекторной памяти или T_{EM} и эффекторной RA-памяти или T_{EMRA}), эффекторные клетки (например, цитотоксические Т-клетки или CTL или Tc-клетки), клетки-хелперы (например, Th1, Th2, Th3, Th9, Th7, TFH), регуляторные клетки (например, клетки Treg и Tr1), Т-клетки естественных киллеров (NKT-клетки), инфильтрирующие опухоли лимфоциты (TIL), активируемые лимфоцитами клетки-киллеры (LAKs), Т-клетки $\alpha\beta$, Т-клетки $\gamma\delta$ и другие уникальные классы Т-клеточных линий. Т-клетки можно подразделить на две широкие категории: Т-клетки CD8+ и Т-клетки CD4+, исходя из того, какой белок присутствует на поверхности клетки. Т-клетки, экспрессирующие рассматриваемую систему, могут выполнять несколько функций, включая уничтожение инфицированных клеток и активацию или рекрутирование других иммунных клеток. Т-клетки CD8+ называют цитотоксическими Т-клетками или цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL). CTLs, экспрессирующие рассматриваемую систему, могут участвовать в распознавании и удалении инфицированных вирусом клеток и раковых клеток. CTLs имеют специализированные компартменты или гранулы, содержащие цитотоксины, вызывающие апоптоз, например, запрограммированную смерть клеток. Т-клетки CD4+ можно подразделить на четыре подгруппы - Th1, Th2, Th17 и Treg, причем "Th" означает "Т-хелперная клетка", хотя могут существовать и другие подгруппы. Клетки Th1 могут координировать иммунные реакции против внутриклеточных микробов, особенно бактерий. Они могут вырабатывать и выделять молекулы, которые предупреждают и активируют другие иммунные клетки типа пожирающих бактерии макрофагов. Клетки Th2 участвуют в координации иммунных реакций против внеклеточных патогенов типа гельминтов (паразитических червей) путем оповещения В-клеток, гранулоцитов и тучных клеток. Клетки Th17 могут вырабатывать интерлейкин-17 (IL-17) - сигнальную молекулу, которая активирует иммунные и неиммунные клетки. Клетки Th17 важны для рекрутирования нейтрофилов.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены иммунные клетки, экспрессирующие рассматриваемые системы (например, по меньшей мере что-то одно из рецепторного полипептида, адаптерного полипептида, ген-модулирующего полипептида (GMP) и расщепляющего элемента, как описано здесь). В некоторых воплощениях иммунные клетки представлены лимфоцитами. Рассматриваемые системы, экспрессируемые в иммунных клетках, могут применяться для условной регуляции определенных видов активности иммунных клеток. Иммунные клетки типа лимфоцитов, экспрессирующих данную систему, могут участвовать в клеточном иммунитете для устранения пораженных клеток и/или патогенов.

В некоторых воплощениях лимфоциты настоящего изобретения характеризуются тем, что исполни-

тельный элемент высвобождается из GMP при расщеплении на сайте распознавания расщепления только тогда, когда химерный полипептид трансмембранного рецептора связан с антигеном. При высвобождении исполнительного элемента из GMP он может образовывать комплекс с полинуклеотидом-мишенью в лимфоцитах. Образование комплекса исполнительного элемента с полинуклеотидом-мишенью в лимфоцитах может приводить к усилению или повышению экспрессии полинуклеотида-мишени (например, гена) в лимфоцитах. В некоторых воплощениях исполнительный элемент регулирует экспрессию и/или активность полинуклеотида-мишени, содержащего эндогенный ген или генный продукт. Эндогенный ген или генный продукт может участвовать в иммунном ответе. Например, исполнительный элемент может вызывать повышение экспрессии эндогенного гена типа цитокина. Повышение экспрессии цитокинов может способствовать эффективности иммунного ответа и/или уменьшать отрицательные терапевтические эффекты, связанные с иммунным ответом.

В некоторых воплощениях исполнительный элемент регулирует экспрессию и/или активность цитокина. Способы изменения экспрессии цитокинов могут быть применимы при регуляции иммунных клеток и/или модуляции иммунного ответа, к примеру, для изменения активации Т-клеток, изменения уровня активации NK-клеток и различных других активностей иммунных клеток при иммунотерапии. Регуляция экспрессии цитокина может осуществляться различными механизмами. В некоторых воплощениях исполнительный элемент регулирует экспрессию и/или активность цитокина из полинуклеотида-мишени или редактирует последовательность нуклеиновой кислоты, к примеру, последовательность нуклеиновой кислоты геномной ДНК, кодирующей цитокин. В некоторых воплощениях исполнительный элемент регулирует экспрессию и/или активность рецептора цитокина из полинуклеотида-мишени или редактирует последовательность нуклеиновой кислоты, к примеру, последовательности нуклеиновой кислоты геномной ДНК, кодирующей рецептор цитокина. Полинуклеотид-мишень, регулируемый и/или редактируемый исполнительным элементом, может содержать эндогенный ген или продукт гена, к примеру, эндогенный ген цитокина или рецептора цитокина (например, ДНК) или продукт гена (например, РНК). В некоторых воплощениях исполнительный элемент изменяет экспрессию цитокина или рецептора цитокина (например, усиливает и/или ослабляет). В некоторых воплощениях исполнительный элемент редактирует последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей цитокин или рецептор цитокина. При редактировании последовательности нуклеиновой кислоты можно получить нефункциональные генные продукты, например, белковые продукты, которые укорочены и/или не в той рамке считывания.

Цитокинами называют белки (например, хемокины, интерфероны, лимфокины, интерлейкины и факторы некроза опухолей), которые высвобождаются из клетки и могут влиять на поведение клеток. Цитокины вырабатываются целым рядом клеток, включая иммунные клетки, к примеру, макрофаги, В-лимфоциты, Т-лимфоциты и тучные клетки, а также эндотелиальные клетки, фибробласты и различные стромальные клетки. Одинаковый цитокин может вырабатываться более чем одним типом клеток. Цитокины могут участвовать в оказании системных или локальных иммуномодулирующих эффектов.

Некоторые цитокины могут функционировать в качестве провоспалительных цитокинов. Провоспалительными цитокинами называют цитокины, участвующие в запуске или усилении воспалительных реакций. Провоспалительные цитокины могут работать с различными клетками иммунной системы типа нейтрофилов и лейкоцитов для вырабатывания иммунного ответа. Некоторые цитокины могут функционировать в качестве противовоспалительных цитокинов. Противовоспалительными цитокинами называют цитокины, участвующие в ослаблении воспалительных реакций. В некоторых случаях противовоспалительные цитокины могут регулировать действие провоспалительного цитокина. Некоторые цитокины могут функционировать и как про-, и как противовоспалительные цитокины.

В некоторых воплощениях экспрессия цитокина с провоспалительными функциями может подвергаться повышающей регуляции в иммунных клетках. Повышающая регуляция экспрессии цитокина с провоспалительными функциями может быть полезной, к примеру, для стимуляции иммунного ответа против клеток мишени при иммунотерапии. Однако чрезмерное количество провоспалительных цитокинов в некоторых случаях может вызывать отрицательные эффекты типа хронического системного воздействия на организм. В некоторых воплощениях экспрессия цитокина с провоспалительными функциями подвергается понижающей регуляции. Такая понижающая регуляция может уменьшить и/или минимизировать отрицательные эффекты.

В некоторых воплощениях повышающей регуляции может подвергаться экспрессия цитокина с противовоспалительными функциями в иммунных клетках. Повышающая регуляция экспрессии цитокина с противовоспалительными функциями может быть полезной, к примеру, для уменьшения и/или минимизации иммунного ответа, если иммунная реакция вызывает отрицательные эффекты. В некоторых воплощениях экспрессия цитокина с противовоспалительными функциями может подвергаться понижающей регуляции. Такая понижающая регуляция может повысить и/или усилить воспалительную реакцию, если нужно.

Примеры цитокинов, которые регулируются системами и композициями настоящего изобретения, включают, без ограничения, лимфокины, монокины и традиционные полипептидные гормоны. К цитокинам относятся такие гормоны роста, как гормон роста человека, N-метгониловый гормон роста человека и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; проре-

лаксин; такие гликопротеидные гормоны, как фолликулостимулирующий гормон (FSH), тиреотропный гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); печеночный фактор роста; фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; α -фактор некроза опухолей; антимюллеров гормон; гонадотропный пептид мыши; ингибин; активин; фактор роста сосудистого эндотелия; интегрин; тромбopoэтин (TPO); факторы роста нервов типа NGF- α ; тромбоцитарный фактор роста; трансформирующие факторы роста (TGF) типа TGF- α , TGF- β , TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3; инсулиноподобный фактор роста I и II; эритропоэтин (EPO); FLT-3L; фактор стволовых клеток (SCF); остеоиндуктивные факторы; интерфероны (IFN) типа IFN- α , IFN- β , IFN- γ ; колониестимулирующие факторы (CSF) типа CSF макрофагов (M-CSF); CSF гранулоцитов-макрофагов (GM-CSF); CSF гранулоцитов (G-CSF); стимулирующий макрофаги фактор (MSP); интерлейкины (IL) типа IL-1, IL-1a, IL-1b, IL-1RA, IL-18, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-20; факторы некроза опухолей типа CD154, LT- β , TNF- α , TNF- β , 4-1BBL, APRIL, CD70, CD153, CD178, GITRL, LIGHT, OX40L, TALL-1, TRAIL, TWEAK, TRANCE; и другие полипептидные факторы, включая LIF, онкостатин M (OSM) и KIT-лиганд (KL). Рецепторы цитокинов относятся к рецепторным белкам, которые связывают цитокины. Рецепторы цитокинов могут быть и мембраносвязанными, и растворимыми.

В некоторых воплощениях исполнительный элемент регулирует экспрессию и/или активность представителя (например, лиганда) семейства интерлейкинов (IL), представителя семейства рецептора IL-1, представителя (например, лиганда) семейства интерлейкина-6 (IL-6), представителя семейства рецептора IL-6, представителя (например, лиганда) семейства интерлейкина-10 (IL-10), рецептора IL-10, представителя (например, лиганда) семейства интерлейкина-12 (IL-12), рецептора IL-12, представителя (например, лиганда) семейства интерлейкина-17 (IL-17) или рецептора IL-17.

В некоторых воплощениях исполнительный элемент регулирует экспрессию и/или активность цитокина, в том числе, без ограничения, представителя семейства интерлейкина-1 (IL-1) или родственного белка; представителя семейства фактора некроза опухолей (TNF) или родственного белка; представителя семейства интерферона (IFN) или родственного белка; представителя семейства интерлейкина-6 (IL-6) или родственного белка; и хемокина или родственного белка. В некоторых воплощениях исполнительный элемент регулирует экспрессию и/или активность цитокина, выбранного из IL-18, IL-18BP, IL-1A, IL-1B, IL-1F10, IL-1F3/IL-1RA, IL-1F5, IL-1F6, IL-1F7, IL-1F8, IL-1RL2, IL-1F9, IL-33, BAFF/BLyS/TNFSF138, 4-1BBL, CD153/CD30L/TNFSF8, CD40LG, CD70, лиганда Fas/FASLG/CD95L/CD178, EDA-A1, TNFSF14/LIGHT/CD258, TNFA, LTA/TNFB/TNFSF1, LTB/TNFC, CD70/CD27L/TNFSF7, TNFSF10/TRAIL/APO-2L (CD253), RANKL/OPGL/TNFSF11 (CD254), TNFSF12, TNF- α /TNFA, TNFSF13, TL1A/TNFSF15, OX-40L/TNFSF4/CD252, CD40L/CD154/TNFSF5, IFNA1, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA2, IFNA4, IFNA7, IFNB1, IFNE, IFNG, IFNZ, IFNA8, IFNA5/IFNaG, IFN ω /IFNW1, CLCF1, CNTF, IL11, IL31, IL6, лептина, LIF, OSM, CCL1/TCA3, CCL11, CCL12/MCP-5, CCL13/MCP-4, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17/TARC, CCL18, CCL19, CCL2/MCP-1, CCL20, CCL21, CCL22/MDC, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL3L3, CCL4, CCL4L1/LAG-1, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, CX3CL1, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL 15, CXCL16, CXCL17, CXCL2/MIP-2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7/Ppbb, CXCL9, IL8/CXCL8, XCL1, XCL2, FAM19A1, FAM19A2, FAM19A3, FAM19A4 и FAM19A5.

В некоторых воплощениях исполнительный элемент регулирует экспрессию и/или активность рецептора цитокина, в том числе, без ограничения, представителя семейства рецептора интерлейкина-1 (IL-1) или родственного белка; представителя семейства рецептора фактора некроза опухолей (TNF) или родственного белка; представителя семейства рецептора интерферона (IFN) или родственного белка; представителя семейства рецептора интерлейкина-6 (IL-6) или родственного белка; и рецептора хемокина или родственного белка. В некоторых воплощениях исполнительный элемент регулирует экспрессию и/или активность рецептора цитокина, выбранного из IL18R1, IL18RAP, IL1R1, IL1R2, IL1R3, IL1R8, IL1R9, IL1RL1, SIGIRR, 4-1BB, BAFFR, TNFRSF7, CD40, CD95, DcR3, TNFRSF21, EDA2R, EDAR, PGLYRP1, TNFRSF19L, TNFR1, TNFR2, TNFRSF11A, TNFRSF11B, TNFRSF12A, TNFRSF13B, TNFRSF14, TNFRSF17, TNFRSF18, TNFRSF19, TNFRSF25, LTBR, TNFRSF4, TNFRSF8, TRAILR1, TRAILR2, TRAILR3, TRAILR4, IFNAR1, IFNAR2, IFNGR1, IFNGR2, CNTFR, IL11RA, IL6R, LEPK, LIFR, OSMR, IL31RA, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCRL1, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR7, CXCR1, CXCR2, ARMCX, BCA-1/CXCL1, CCL1, CCL12/MCP, CCL13/MCP, CCL15/MIP-5/MIP-1 δ , CCL16/HCC-4/NCC, CCL17/TAR, CCL18/PARC/MIP, CCL19/MIP-3, CCL2/MCP, CCL20/MIP-3a/MIP3, CCL21/6Ckin, CCL22/MD, CCL23/MIP, CCL24/эотаксина-2/MPIF, CCL25, CCL26/эотаксина, CCL27, CCL3, CCL4, CCL4L1/LAG, CCL5, CCL6, CCL8/MCP, CXCLIO/Crg, CXCL12/SDF-1, CXCL14, CXCL15, CXCL16/SR, CXCL2/MIP, CXCL3/GRO, CXCL4, CXCL6/GCP, CXCL9, FAM19A4, фракталкина, I-309/CCL1/TCA, IL-8, MCP-3, NAP-2/PPBP, XCL2, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCRL1, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR7/RDC-1, IL8Ra/CXCR1 и IL8Rb/CXCR2.

В некоторых воплощениях исполнительный элемент регулирует экспрессию и/или активность активина (например, активина β A, активина β B, активина β C и активина β E); ингибина (например, ингиби-

на-А и ингибина-В); рецептора активина (например, рецептора активина 1 типа, рецептора активина 2 типа); костного морфогенетического белка (например, BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP10 и BMP15); рецептора BMP; фактора роста и дифференцировки (например, GDF1, GDF2, GDF3, GDF4, GDF5, GDF6, GDF7, GDF8, GDF9, GDF10, GDF11 и GDF15); лиганда из семейства глиоцитарного нейротрофического фактора (например, глиоцитарного нейротрофического фактора (GDNF), нейртурина (NRTN), артемина (ARTN) и персефина (PSPN)); рецептора семейства GDNF; и c-MPL/CD110/TPOR.

Производство цитокинов можно определять различными методами. Производство цитокинов можно определять путем анализа культуральной жидкости (например, производство *in vitro*), в которой выращиваются модифицированные иммунные клетки, или сыворотки (например, *in vivo*), взятой у субъекта с модифицированными иммунными клетками, на наличие одного или нескольких цитокинов. Уровень цитокинов можно определять в различных подходящих единицах, включая концентрацию, любым подходящим методом. В некоторых воплощениях определяются белки цитокинов. В некоторых воплощениях определяются мРНК-транскрипты цитокинов. Примеры методов анализа цитокинов включают иммуноферментные методы (ELISA), иммуноблоттинг, иммунофлуоресцентные методы, радиоиммуноанализ, матрицы антител, которые позволяют одновременно определять различные цитокины в образце, матрицы на основе гранул, методы количественной ПЦР, микроматрицы и пр. Другие подходящие методы могут включать протеомные подходы (2-D гели, MS-анализ и др.).

В некоторых воплощениях эндогенный ген или продукт гена кодирует иммунорегуляторный белок. Иммунорегуляторные белки включают такие белки, как рецепторы контрольных точек иммунитета, которые при связывании со своими лигандами могут усиливать и/или подавлять сигналы иммунных клеток, включая, без ограничения, сигналы активации и сигналы ингибирования иммунных клеток. Исполнительный элемент в некоторых случаях может изменять экспрессию регуляторного белка (например, регулировать на повышение и/или регулировать на понижение). В некоторых воплощениях исполнительный элемент редактирует последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей регуляторный белок. В некоторых воплощениях эндогенный ген или продукт гена кодирует молекулу типа A2AR, B7.1, B7-H3/CD276, B7-H4/B7S1/B7x/Vtcn1, B7-H6, BTLA/CD272, CCR4, CD122, 4-1BB/CD137, CD27, CD28, CD40, CD47, CD70, CISH, CTLA-4/CD152, DR3, GITR, ICOS/CD278, IDO, KIR, LAG-3, OX40/CD134, PD-1/CD279, PD2, PD-L1, PD-L2, TIM-3 и VISTA/Dies1/Gi24/PD-1H (C10orf54).

В некоторых воплощениях полинуклеотид-мишень содержит гетерологичный ген или генный продукт. Гетерологичный ген или генный продукт может кодировать белок типа дополнительного химерного полипептида трансмембранного рецептора. В некоторых воплощениях дополнительный химерный полипептид трансмембранного рецептора включает: (а) внеклеточную область, содержащую дополнительный взаимодействующий с антигеном домен, который специфически связывает дополнительный антиген; и (б) костимулирующий домен. Дополнительный взаимодействующий с антигеном домен может связывать любой подходящий антиген. Дополнительный взаимодействующий с антигеном домен может связывать тот же антиген, что и химерный рецепторный полипептид, или другой антиген. Дополнительный взаимодействующий с антигеном домен может включать любой подходящий взаимодействующий с антигеном домен. Дополнительный взаимодействующий с антигеном домен может представлять собой любой взаимодействующий с антигеном домен, описанный здесь. Например, дополнительный взаимодействующий с антигеном домен может включать и моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело, человеческое антитело, гуманизованное антитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, однопочечное антитело (например, scFv), минитело, диатело, однодоменное антитело ("sdAb" или "нанотело" или "верблюжье") либо Fc-связывающий домен. В некоторых воплощениях дополнительный взаимодействующий с антигеном домен содержит миметик антитела.

Дополнительный химерный полипептид трансмембранного рецептора может содержать костимулирующий домен. Костимулирующий домен может представлять собой любой описанный ранее костимулирующий домен. Костимулирующий домен может обеспечивать костимулирующие сигналы. Такие костимулирующие сигналы в некоторых случаях могут обеспечивать пролиферативные сигналы и/или сигналы выживания в иммунных клетках, экспрессирующих рассматриваемую систему. В некоторых воплощениях сигнальный домен иммунной клетки и у химерного полипептида трансмембранного рецептора, и у дополнительного химерного полипептида трансмембранного рецептора содержит по меньшей мере один костимулирующий домен. Экспрессия дополнительного химерного трансмембранного рецептора, содержащего костимулирующий домен, может обеспечить достаточную клеточную сигнализацию для выработки стойкого и/или адекватного иммунного ответа.

В некоторых воплощениях сигнальный домен иммунной клетки у химерного полипептида трансмембранного рецептора не содержит костимулирующего домена, тогда как дополнительный химерный полипептид трансмембранного рецептора содержит костимулирующий домен. Связывание первого антигена со внеклеточным участком химерного полипептида трансмембранного рецептора может приводить к расщеплению сайта распознавания расщепления с высвобождением исполнительного элемента. После этого исполнительный элемент может образовывать комплекс с полинуклеотидом-мишенью, к примеру,

полинуклеотидом, кодирующим дополнительный химерный полипептид трансмембранного рецептора, и регулировать экспрессию дополнительного химерного полипептида трансмембранного рецептора. Дополнительный химерный полипептид трансмембранного рецептора включает: (i) дополнительный взаимодействующий с антигеном домен, который специфически связывает антиген, отличный от первого антигена, и (ii) костимулирующий домен, который может способствовать эффективному иммунному ответу иммунных клеток. Поскольку костимулирующий домен расположен на дополнительном химерном полипептиде трансмембранного рецептора, то эффективный иммунный ответ не может вырабатываться до тех пор, пока оба рецептора не будут связаны с антигеном. При этом регуляция иммунных клеток зависит от присутствия двух антигенов, тем самым повышается специфичность регуляции (например, активации и/или деактивации) иммунных клеток. В некоторых воплощениях расположение костимулирующих доменов (например, на химерном полипептиде трансмембранного рецептора, на дополнительном химерном полипептиде трансмембранного рецептора и/или на обоих рецепторах) влияет на специфичность условной регуляции иммунных клеток. Например, иммунная клетка может экспрессировать систему, включающую химерный полипептид трансмембранного рецептора, имеющий внеклеточную область, содержащую взаимодействующий с антигеном домен, и внутриклеточную область, содержащую сигнальный домен иммунной клетки, связанный с исполнительным элементом через сайт расщепления. Поскольку многие типы клеток экспрессируют перекрывающиеся антигены (например, белки клеточной поверхности и пр.), то условная активация, зависящая от присутствия по меньшей мере двух антигенов, может повышать порог для активации иммунных клеток.

В одном аспекте изобретения предусмотрен способ условной регуляции лимфоцитов. В некоторых воплощениях способ включает контактирование или обработку описанных здесь лимфоцитов с антигеном, который специфически связывается со взаимодействующим с антигеном доменом рецептора. Контактное взаимодействие вызывает активацию или деактивацию активности иммунных клеток, тем самым условно регулируя лимфоциты. В некоторых воплощениях активность иммунных клеток выбрана из группы, состоящей из: клональной экспансии лимфоцитов; выделения цитокинов лимфоцитами; цитотоксичности лимфоцитов; пролиферации лимфоцитов; дифференцировки, дедифференцировки или трансдифференцировки лимфоцитов; передвижения и/или транспортировки лимфоцитов; истощения и/или реактивации лимфоцитов; и высвобождения лимфоцитами других межклеточных молекул, метаболитов, химических соединений или их комбинаций.

В некоторых примерах системы и композиции настоящего изобретения, экспрессируемые в иммунных клетках, могут применяться для уничтожения клеток мишени. В одном аспекте иммунные клетки или популяции иммунных клеток, экспрессирующие рассматриваемую систему, могут вызывать гибель клеток мишени. Уничтожение клеток мишени может быть полезным для различных применений, включая, без ограничения, лечение заболеваний или расстройств, при которых нужно устранить популяцию клеток или ингибировать их пролиферацию. В некоторых воплощениях способ индуцирования гибели клеток мишени включает обработку клеток мишени иммунными клетками или популяцией иммунных клеток, экспрессирующих изложенную здесь систему. В некоторых воплощениях иммунные клетки представлены лимфоцитами типа Т-клеток или NK-клеток. При обработке клеток мишени лимфоцитами экспрессируемый лимфоцитами рецептор может связывать мембраносвязанный антиген клеток мишени или не мембраносвязанный антиген клеток мишени, и обработка вызывает активацию цитотоксичности лимфоцитов, тем самым вызывая гибель клеток мишени.

Лимфоциты типа цитотоксических Т-клеток, экспрессирующие рассматриваемую систему, могут вызывать апоптоз клеток мишени. Данная система при экспрессировании в иммунных клетках типа Т-клеток может применяться для регуляции клональной экспансии Т-клеток, экспрессии маркеров активации на клеточной поверхности, дифференцировки в эффекторные клетки, индуцирования цитотоксичности или секреции цитокинов, индуцирования апоптоза и их комбинаций. Данная система при экспрессировании в цитотоксических Т-клетках, может изменять (i) высвобождение таких цитотоксинов, как перфорин, гранзимы и гранулизин, и/или (ii) индуцирование апоптоза через взаимодействие лигандов Fas-Fas между Т-клетками и клетками мишени, тем самым запуская разрушение клеток мишени. Данная система при экспрессировании в клетках естественных киллеров (NK) может опосредовать уничтожение клеток мишени NK-клетками. При активации клеток естественных киллеров (NK) они могут прицельно уничтожать aberrantные клетки типа инфицированных вирусом и онкогенных клеток. Рассматриваемая система может регулировать выработку и/или высвобождение цитотоксических молекул, хранящихся в секреторных лизосомах NK-клеток, что может привести к специфическому уничтожению клеток мишени. В некоторых воплощениях (i) антиген-специфичные цитотоксические Т-клетки (например, лимфоциты), экспрессирующие данную систему, могут индуцировать апоптоз в клетках, презентующих эпитопы чужеродного антигена на своей поверхности, как-то в инфицированных вирусом клетках, клетках с внутриклеточными бактериями и раковых клетках, презентующих опухолевые антигены; (ii) макрофаги и клетки естественных киллеров (NK-клетки), экспрессирующие данную систему, могут уничтожать патогены; и/или (iii) другие иммунные клетки, экспрессирующие данную систему, могут секретировать различные цитокины для содействия дополнительным иммунным реакциям.

Активация цитотоксичности иммунных клеток типа Т-клеток и NK-клеток означает индуцирование

таких изменений в биологическом состоянии, при которых клетки становятся цитотоксическими. Такие изменения включают изменение экспрессии активационных маркеров, выработки цитокинов и пролиферации. Эти изменения могут быть вызваны первичными сигналами стимуляции. Костимулирующие сигналы могут усиливать величину первичных сигналов и подавлять гибель клеток после первоначальной стимуляции, что приводит к более долговременному состоянию активации и тем самым к большей цитотоксической способности. Цитотоксичность может означать антительную клеточную цитотоксичность.

В иммунных клетках, экспрессирующих изложенную здесь систему, рецептор может подвергаться модификации в ответ на связывание антигена. Модификация рецептора может включать конформационное изменение и/или химическую модификацию. Химическая модификация может включать, к примеру, фосфорилирование или дефосфорилирование по меньшей мере одного аминокислотного остатка рецептора. В некоторых воплощениях, модификация рецептора включает модификацию по нескольким сайтам модификации, причем каждая модификация эффективна для связывания белка-адаптера. При связывании взаимодействующего с антигеном домена химерного полипептида трансмембранного рецептора на иммунных клетках с антигеном (мембраносвязанным или не мембраносвязанным) клеток мишени из GMP высвобождается исполнительный элемент для активации или деактивации активности иммунных клеток, к примеру, цитотоксичности лимфоцитов.

Исполнительный элемент, высвобожденный из GMP, может осуществлять активацию цитотоксичности лимфоцитов путем регуляции экспрессии полинуклеотида-мишени типа ДНК (например, геномной ДНК и/или кДНК) и РНК (например, мРНК). В некоторых воплощениях исполнительный элемент регулирует экспрессию полинуклеотида-мишени путем физического преграждения полинуклеотида-мишени или рекрутирования дополнительных факторов, эффективно подавляющих или усиливающих экспрессию с полинуклеотида-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит активатор транскрипции для эффективного усиления экспрессии полинуклеотида-мишени. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит репрессор транскрипции для эффективного подавления экспрессии полинуклеотида-мишени.

В некоторых воплощениях полинуклеотид-мишень включает геномную ДНК типа участка генома. В некоторых воплощениях полинуклеотид-мишень включает участок плазмиды, к примеру, плазмиды, несущей экзогенный ген. В некоторых воплощениях полинуклеотид-мишень включает РНК. Исполнительный элемент может содержать одну или несколько копий последовательности сигнала ядерной локализации, что позволяет домену транслоцироваться в ядро при отщеплении от GMP.

С использованием систем и способов раскрытия настоящего изобретения можно уничтожать различные клетки-мишени. Клетки-мишени, к которым может применяться этот способ, включают широкий спектр типов клеток. Клетки-мишени могут быть *in vitro*. Клетки-мишени могут быть *in vivo*. Клетки-мишени могут быть *ex vivo*. Клетки-мишени могут быть выделенными клетками. Клетки-мишени могут быть клетками внутри организма. Клетки-мишени могут быть самим организмом. Клетки-мишени могут быть клетками в клеточной культуре. Клетки-мишени могут быть клетками из коллекции клеток. Клетки-мишени могут быть клетками млекопитающих или они могут быть получены из клеток млекопитающих. Клетки-мишени могут быть клетками грызунов или они могут быть получены из клеток грызунов. Клетки-мишени могут быть клетками человека или они могут быть получены из клеток человека. Клетки-мишени могут быть прокариотическими клетками или они могут быть получены из прокариотических клеток. Клетки-мишени могут быть бактериальными клетками или они могут быть получены из бактериальных клеток. Клетки-мишени могут быть клетками архей или они могут быть получены из клеток архей. Клетки-мишени могут быть эукариотическими клетками или они могут быть получены из эукариотических клеток. Клетки-мишени могут быть плюрипотентными стволовыми клетками. Клетки-мишени могут быть клетками растений или они могут быть получены из клеток растений. Клетки-мишени могут быть клетками животных или они могут быть получены из клеток животных. Клетки-мишени могут быть клетками беспозвоночных или они могут быть получены из клеток беспозвоночных. Клетки-мишени могут быть клетками позвоночных или они могут быть получены из клеток позвоночных. Клетки-мишени могут быть клетками микробов или они могут быть получены из клеток микробов. Клетки-мишени могут быть клетками грибов или они могут быть получены из клеток грибов. Клетки-мишени могут быть клетками из определенного органа или ткани.

Клетки-мишени могут быть стволовыми клетками или клетками-предшественниками. Клетки-мишени могут включать стволовые клетки (например, взрослые стволовые клетки, эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS)) и клетки-предшественники (например, сердечные клетки-предшественники, нервные клетки-предшественники и т.п.). Клетки-мишени могут включать стволовые клетки и клетки-предшественники млекопитающих, включая стволовые клетки грызунов, клетки-предшественники грызунов, стволовые клетки человека, клетки-предшественники человека и т.д. Клональные клетки могут включать потомство клетки. Клетки-мишени могут содержать нуклеиновую кислоту-мишень. Клетки-мишени могут находиться в живом организме. Клетки-мишени могут быть генетически модифицированные клетки. Клетки-мишени могут быть так называемые клетки-хозяева.

Клетки-мишени могут быть тотипотентными стволовыми клетками, однако, хотя в некоторых воплощениях настоящего изобретения может применяться термин "клетка", но он может не относиться к тотипотентным стволовым клеткам. Клетки-мишени могут быть клетками растений, но, хотя в некоторых воплощениях настоящего изобретения может применяться термин "клетка", он может не относиться к растительным клеткам. Клетки-мишени могут быть плюрипотентными клетками. Например, клетки-мишени могут быть плюрипотентными гемопоэтическими клетками, которые могут дифференцироваться в другие клетки в линии гемопоэтических клеток, но не могут дифференцироваться в какие-либо другие негемопоэтические клетки. Клетки-мишени могут быть способны развиваться в целый организм. Клетки-мишени могут либо не могут развиваться в целый организм. Клетки-мишени могут быть целым организмом.

Клетки-мишени могут быть первичными клетками. Например, культуры первичных клеток можно пассировать 0 раз, 1 раз, 2 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 15 и более раз. Клетки могут быть одноклеточными организмами. Клетки могут выращиваться в культуре.

Клетки-мишени могут быть пораженными болезнью клетками. Больные клетки могут иметь измененный метаболизм, экспрессию генов и/или морфологические признаки. Больными клетками могут быть раковые клетки, диабетические клетки и апоптотические клетки. Больными клетками могут быть клетки от больного субъекта. Типичные заболевания могут включать гематологические заболевания, раковые заболевания, метаболические заболевания, глазные заболевания, заболевания органов, заболевания опорно-двигательного аппарата, сердечные заболевания и др.

Если клетки-мишени являются первичными клетками, то их можно получать от людей любым способом. Например, лейкоциты можно получать методом афереза, лейкоцитарэфеза, разделения в градиенте плотности и т.п. Клетки из таких тканей, как кожа, мышцы, костный мозг, селезенка, печень, поджелудочная железа, легкие, кишечник, желудок и т.п. можно получать при помощи биопсии. Для диспергирования или суспендирования полученных клеток можно использовать соответствующий раствор. Обычно подходящим раствором может служить сбалансированный солевой раствор (например, физраствор, физраствор с фосфатным буфером (PBS), сбалансированный солевой раствор Хэнка и др.), для удобства дополненный фетальной телячьей сывороткой или другими природными факторами в сочетании с приемлемым буфером при низкой концентрации. Буферы могут включать HEPES, фосфатные буферы, лактатные буферы и т.п. Клетки можно использовать немедленно или же их можно хранить (например, путем замораживания). Замороженные клетки можно разморозить и их можно использовать повторно. Клетки можно замораживать в DMSO, сыворотке, буферной среде (например, в 10% DMSO, 50% сыворотке, 40% буферной среде) и/или в каком-либо другом распространенном растворе, который применяется для хранения клеток при температуре заморозания.

Неограничительные примеры клеток, которые могут быть клетками мишени, включают, без ограничения, такие лимфоидные клетки, как В-клетки, Т-клетки (цитотоксические Т-клетки, Т-клетки естественных киллеров, регуляторные Т-клетки, Т-хелперные клетки), клетки естественных киллеров, индуцированные цитокинами клетки (CIK) (например, см. US 2008/0241194); такие миелоидные клетки, как гранулоциты (базофильные гранулоциты, эозинофильные гранулоциты, нейтрофильные гранулоциты/гиперсегментированные нейтрофилы), моноциты/макрофаги, эритроциты (ретикулоциты), тучные клетки, тромбоциты/мегакарициты, дендритные клетки; клетки эндокринной системы, включая щитовидную железу (эпителиальные, парафолликулярные клетки щитовидной железы), парашитовидную железу (главные клетки, оксифильные клетки парашитовидной железы), надпочечники (хромаффинные клетки), клетки шишковидной железы (пинеалоциты); клетки нервной системы, включая глиальные клетки (астроциты, микроглия), магнотеллюлярные нейросекреторные клетки, звездчатые клетки, клетки Бёттхера и клетки гипофиза (гонадотропы, кортикотропы, тиротропы, соматотропы, лактотропы); клетки дыхательной системы, включая пневмоциты (пневмоциты I типа, пневмоциты II типа), клетки Клара, бокаловидные клетки, пылевые клетки; клетки системы кровообращения, включая кардиомиоциты, перициты; клетки пищеварительной системы, включая клетки желудка (главные клетки желудка, париетальные клетки), бокаловидные клетки, клетки Панета, G-клетки, D-клетки, ECL-клетки, I-клетки, K-клетки, S-клетки; энтероэндокринные клетки, включая энтерохромаффинные клетки, клетки APUD, печеночные (гепатоциты, клетки Купфера), хрящевые/костные/мышечные; костные клетки, включая остеобласты, остеониты, остеокласты, зубные (цементобласты, амелобласты); клетки хрящей, включая хондробласты, хондроциты; клетки кожи, включая трихоциты, кератиноциты, меланоциты (невоциты); мышечные клетки, включая миоциты; клетки мочевой системы, включая подоциты, юкстагломерулярные клетки, интрагломерулярные мезангиальные клетки/экстрагломерулярные мезангиальные клетки, клетки щеточной каемки проксимальных почечных канальцев, клетки macula densa; клетки репродуктивной системы, включая сперматозоиды, клетки Сертоли, клетки Лейдига, яйцеклетки; и другие клетки, включая адипоциты, фибробласты, клетки сухожилий, эпидермальные кератиноциты (дифференцирующиеся эпидермальные клетки), эпидермальные базальные клетки (стволовые клетки), ногтевые кератиноциты, базальные клетки ногтевого ложа (стволовые клетки), медуллярные клетки стержня волос, кортикальные клетки стержня волос, кутикулярные клетки стержня волос, кутикулярные клетки влагалища корня волос, клетки слоя Хаксли влагалища корня волос, клетки слоя Хенле влагалища корня волос, клетки на-

ружного влагалища корня волос, клетки матрикса волос (стволовые клетки), клетки влажного многослойного барьерного эпителия, поверхностные эпителиальные клетки многослойного плоского эпителия роговицы, ротовой полости, пищевода, анального канала, дистальной уретры и влагалища, клетки мочевого эпителия (выстилающего мочевой пузырь и мочевые протоки), экзокринные клетки секреторного эпителия, мукоидные клетки слюнной железы (секреция полисахаридов), серозные клетки слюнной железы (секреция гликопротеиновых ферментов), клетки железы фон Эбнера на языке (омывают вкусовые сосочки), клетки молочной железы (секреция молока), клетки слезных желез (секреция слез), клетки церуминозных желез в ухе (секреция ушной серы), темные эккринные клетки потовых желез (секреция гликопротеинов), светлые эккринные клетки потовых желез (секреция небольших молекул), апокринные клетки потовых желез (секреция пахучих веществ, чувствительная к половым гормонам), клетки желез Молла в веках (специализированных потовых желез), клетки сальных желез (секреция богатого липидами кожного сала), клетки желез Боумана в носу (омывают обонятельный эпителий), клетки желез Бруннера в двенадцатиперстной кишке (ферменты и щелочная слизь), клетки семенных пузырьков (выделяют компоненты семенной жидкости, включая фруктозу для плавающей спермы), клетки предстательной железы (выделяют компоненты семенной жидкости), клетки бульбоуретральных желез (секреция слизи), клетки желез Бартолина (секреция вагинальной смазки), клетки желез Литтре (секреция слизи), клетки эндометрия матки (секреция углеводов), изолированные бокаловидные клетки дыхательного и пищеварительного тракта (секреция слизи), мукоидные клетки выстилки желудка (секреция слизи), зимогенные клетки желудочных желез (секреция пепсиногена), обкладочные клетки желудочных желез (секреция соляной кислоты), ацинарные клетки поджелудочной железы (секреция бикарбоната и пищеварительных ферментов), клетки Панета тонкой кишки (секреция лизоцима), пневмоциты II типа (секреция сурфактанта), клетки Клара в легких, секретирующие гормоны клетки, клетки передней доли гипофиза, соматотропы, лактотропы, тиротропы, гонадотропы, кортикотропы, клетки промежуточной доли гипофиза, магноцеллюлярные нейросекреторные клетки, клетки кишечника и дыхательных путей, клетки щитовидной железы, эпителиальные клетки, парафолликулярные клетки щитовидной железы, клетки парациотовидной железы, главные клетки, оксифильные клетки парациотовидной железы, клетки надпочечников, хромоаффинные клетки, клетки Лейдига в яичках, клетки theca interim фолликул яичников, клетки желтого тела лопнувших фолликул яичников, лютеиновые клетки гранулозы, лютеиновые клетки теки, юкстагломерулярные клетки (секреция ренина), клетки macula densa почек, клетки метаболизма и отложения, клетки с барьерной функцией (легкие, кишечник, экзокринные железы и урогенитальный тракт), почечные клетки, пневмоциты I типа (выстилающие воздушные просветы легких), клетки протоков поджелудочной железы (центроацинарные клетки), клетки гладких мышц протоков (потовых желез, слюнных желез, молочных желез и т.д.), клетки протоков (семявыносящих, предстательной железы и т.д.), эпителиальные клетки, выстилающие закрытые внутренние полости тела, ресничные клетки с пропульсивной функцией, клетки секреции внеклеточного матрикса, сократительные клетки, клетки скелетных мышц, стволовые клетки скелетных мышц, клетки сердечных мышц, клетки крови и иммунной системы, эритроциты, мегакарициты (предшественники тромбоцитов), моноциты, макрофаги соединительной ткани (различного типа), эпидермальные клетки Лангерганса, остеокласты (в костях), дендритные клетки (в лимфоидных тканях), клетки микроглии (в центральной нервной системе), нейтрофильные гранулоциты, эозинофильные гранулоциты, базофильные гранулоциты, тучные клетки, Т-хелперные клетки, Т-супрессорные клетки, цитотоксические Т-клетки, НКТ-клетки, В-клетки, естественные клетки-киллеры, ретикулоциты, стволовые клетки и коммитированные предшественники клеток крови и иммунной системы (различного типа), плюрипотентные стволовые клетки, тотипотентные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, взрослые стволовые клетки, сенсорные клетки-преобразователи, клетки вегетативной нервной системы, клетки органов чувств и периферических нервов, нейроны и глиальные клетки центральной нервной системы, клетки хрусталика, пигментные клетки, меланоциты, клетки пигментного эпителия сетчатки, зародышевые клетки, оогонии/ооциты, сперматиды, сперматоциты, клетки-сперматогонии (стволовые клетки для сперматоцитов), сперматозоиды, поддерживающие клетки ("няньки"), клетки фолликул яичников, клетки Сертоли (в яичках), эпителиальные клетки тимуса, интерстициальные клетки и интерстициальные почечные клетки.

Особый интерес представляют раковые клетки. В некоторых воплощениях клетки мишени представлены раковыми клетками. Неограничительные примеры раковых клеток включают клетки таких видов рака, как акантома, ациноклеточная карцинома, акусическая неврома, акральная-лентицинозная меланома, акроспирома, острая эозинофильная лейкопения, острая лимфобластная лейкопения, острая мегакариобластная лейкопения, острая моноцитарная лейкопения, острая миелобластная лейкопения с созреванием, острая миелоидная дендритноклеточная лейкопения, острая миелоидная лейкопения, острая промиелоцитарная лейкопения, аденокарцинома, аденоидная кистозная карцинома, аденома, аденоматоидная одонтогенная опухоль, адреноренальная карцинома, Т-клеточная лейкопения взрослых, агрессивная НК-клеточная лейкопения, связанный со СПИД рак, связанная со СПИД лимфома, альвеолярная саркома мягких тканей, амелобластная фиброма, анальный рак, анапластическая крупноклеточная лимфома, анапластический рак щитовидной железы, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, ангиомиолипома, ангиосаркома, рак аппендикса, астроцитомы, атипичная тератоидная/рабдоидная опухоль, базальнокле-

точная карцинома, карцинома базального типа, В-клеточная лейкемия, В-клеточная лимфома, карцинома канальцев Беллини, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, бластома, рак костей, костная опухоль, глиома ствола мозга, опухоль головного мозга, рак молочной железы, опухоль Бреннера, бронхиальная опухоль, бронхоалоальвеолярная карцинома, коричневая опухоль, лимфома Беркитта, рак с неизвестным первичным очагом, карциноидная опухоль, карцинома, карцинома *in situ*, карцинома полового члена, карцинома с неизвестным первичным очагом, карциносаркома, болезнь Кастрмана, эмбриональная опухоль центральной нервной системы, астроцитома мозжечка, церебральная астроцитома, рак шейки матки, холангиокарцинома, хондрома, хондросаркома, хордома, хориокарцинома, папиллома сосудистого сплетения, хроническая лимфоцитарная лейкемия, хроническая моноцитарная лейкемия, хроническая миелогенная лейкемия, хронические миелолиферативные заболевания, хроническая нейтрофильная лейкемия, светлоклеточная опухоль, рак толстой кишки, колоректальный рак, краниофарингиома, кожная Т-клеточная лимфома, болезнь Дегоса, возвышающаяся дерматофибросаркома, дермоидная опухоль, десмопластическая мелкокруглоклеточная опухоль, диффузная крупно-В-клеточная лимфома, дисэмбриопластическая нейроэпителиальная опухоль, эмбриональная карцинома, эндодермальная опухоль пазухи (придатка яичка), рак эндометрия, рак эндометрия матки, эндометриоидная опухоль, связанная с энтеропатией Т-клеточная лимфома, эпендимобластома, эпендимома, эпителиоидная саркома, эритролейкемия, рак пищевода, эстезионеробластома, семейство опухолей Юинга, семейство сарком Юинга, саркома Юинга, экстракраниальная опухоль зародышевых клеток, экстрагонадаальная опухоль зародышевых клеток, рак внепеченочных желчных протоков, экстраамиллярная болезнь Педжета, рак фаллопиевых труб, включенный плод (*fetus in fetu*), фиброма, фибросаркома, фолликулярная лимфома, фолликулярный рак щитовидной железы, рак желчного пузыря, ганглиоглиома, ганглионерома, рак желудка, лимфома желудка, желудочно-кишечный рак, желудочно-кишечная карциноидная опухоль, желудочно-кишечная стромальная опухоль, опухоль зародышевых клеток, герминома, гестационная хориокарцинома, гестационная трофобластическая опухоль, гигантоклеточная опухоль кости, мультиформная глиобластома, глиома, гломусная опухоль, глюкогома, гонадобластома, гранулезоклеточная опухоль, волосяноклеточная лейкемия, трихолькемия, рак головы и шеи, рак сердца, гемангиобластома, гемангиоперицитомы, гемангиосаркома, гематологический рак, гепатоцеллюлярная карцинома, гепатоспленическая Т-клеточная лимфома, наследственный синдром рака молочной железы и яичников, лимфома Ходжкина, гипофарингеальный рак, гипоталамическая глиома, воспалительный рак молочной железы, внутриглазная меланома, карцинома островковых клеток, опухоль островковых клеток, ювенильная миеломоноцитарная лейкемия, саркома Капоши, рак почек, опухоль Клатскина, опухоль Крукенберга, рак гортани, рак гортани, меланома *lentigo maligna*, лейкемия, лейкоз, рак губ и полости рта, липосаркома, рак легких, лютеома, лимфангиома, лимфангиосаркома, лимфоэпителиома, лимфоидная лейкемия, лимфома, макроглобулинемия, злокачественная фиброзная гистиоцитома, злокачественная фиброзная гистиоцитома костей, злокачественная глиома, злокачественная мезотелиома, злокачественная опухоль оболочки периферических нервов, злокачественная рабдоидная опухоль, злокачественная опухоль "тритон", лимфома MALT, лимфома клеток мантии, лейкемия тучных клеток, опухоль зародышевых клеток средостения, опухоль средостения, медуллярный рак щитовидной железы, медуллобластома, медуллоэпителиома, меланома, менингиома, карцинома клеток Меркеля, мезотелиома, метастатический плоскоклеточный рак шеи с неизвестным первичным очагом, метастатическая уротелиальная карцинома, смешанная мюллеровская опухоль, моноцитарная лейкемия, рак ротовой полости, мукоидная опухоль, синдром множественной эндокринной неоплазии, множественная миелома, грибовидный микоз, фунгоидная гранулема, миелодиспластические заболевания, миелодиспластические синдромы, миелоидная лейкемия, миелоидная саркома, миелолиферативные заболевания, миксома, рак носовой полости, рак носоглотки, карцинома носоглотки, неоплазия, нейринома, нейробластома, нейрофиброма, неврома, узелковая меланома, неходжкинская лимфома, немеланомный рак кожи, немелкоклеточный рак легких, глазная онкология, олигоастроцитома, олигодендроглиома, онкоцитома, менингиома оболочки оптического нерва, рак ротовой полости, ротоглоточный рак, остеосаркома, рак яичников, рак эпителия яичников, опухоль зародышевых клеток яичников, опухоль яичников с низким злокачественным потенциалом, болезнь Педжета молочной железы, опухоль Панкоста, рак поджелудочной железы, папиллярный рак щитовидной железы, папилломатоз, парагангиома, рак околоносовых пазух, рак парашитовидной железы, рак полового члена, опухоль периваскулярных эпителиоидных клеток, рак гортани, феохромоцитомы, опухоль паренхимы эпифиза с промежуточной дифференцировкой, пинеобластома, питуцитомы, аденома гипофиза, опухоль гипофиза, неоплазия плазматических клеток, плеврорегочная бластома, полиэмбриома, лимфома предшественников Т-лимфоцитов, первичная лимфома центральной нервной системы, первичная эффузионная лимфома, первичный гепатоцеллюлярный рак, первичный рак печени, первичный рак брюшины, опухоль первичной нейроэктодермы, рак простаты, псевдомиксома брюшины, рак прямой кишки, почечноклеточная карцинома, карцинома дыхательных путей с участием гена NUT на хромосоме 15, ретинобластома, рабдомиома, рабдомиосаркома, синдром Рихтера, крестцово-копчиковая тератома, рак слюнных желез, саркома, шванноматоз, карцинома салюных желез, вторичная неоплазия, серинома, серозная опухоль, опухоль клеток Сертоли-Лейдига, опухоль стромы зародышевых тяжей, синдром Сезари, перстневидноклеточная карцинома, рак кожи, мелкокруглоклеточная синяя опухоль, мелкоклеточная карцинома,

мелкоклеточный рак легких, мелкоклеточная лимфома, мелкоклеточный рак кишечника, саркома мягких тканей, соматостатинома, рак трубчистов, опухоль спинного мозга, опухоль позвоночника, лимфома краевой зоны селезенки, плоскоклеточная карцинома, рак желудка, меланома с поверхностным распространением, супратенториальная опухоль первичной нейроэктодермы, опухоль поверхностного эпителия и стромы, синовиальная саркома, Т-клеточная острая лимфобластная лейкемия, Т-клеточная лейкемия с крупными гранулярными лимфоцитами, Т-клеточная лейкемия, Т-клеточная лимфома, Т-клеточная пролимфоцитарная лейкемия, тератома, терминальный лимфатический рак, рак яичек, текома, рак горла, карцинома тимуса, тимома, рак щитовидной железы, переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточников, переходно-клеточная карцинома, рак мочевых протоков, рак уретры, мочеполювая неоплазия, саркома матки, увеальная меланома, рак влагалища, синдром Вернера-Моррисона, веррукозная карцинома, глиома зрительных путей, рак вульвы, макроглобулинемия Вальденстрёма, опухоль Уортина, опухоль Вильмса и их комбинации. В некоторых воплощениях раковые клетки-мишени представляют собой субпопуляцию в популяции раковых клеток типа раковых стволовых клеток. В некоторых воплощениях рак имеет гемопоэтическое происхождение типа лимфомы. Антиген может быть ассоциированным с опухолью антигеном.

В некоторых воплощениях клетки мишени образуют опухоль. Лечение опухолей приведенными здесь способами может привести к стабилизации роста опухолей (например, одна или несколько опухолей увеличиваются не более чем на 1%, 5%, 10%, 15% или 20% по размеру и/или не дают метастазов). В некоторых воплощениях опухоль стабилизируется по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше недель. В некоторых воплощениях опухоль стабилизируется по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше месяцев. В некоторых воплощениях опухоль стабилизируется по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше лет. В некоторых воплощениях размер опухоли или количество опухолевых клеток снижается по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% и более. В некоторых воплощениях опухоль полностью устраняется или уменьшается ниже уровня обнаружения. В некоторых воплощениях субъект остается свободным от опухолей (например, в состоянии ремиссии) по меньшей мере в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше недель после лечения. В некоторых воплощениях субъект остается свободным от опухолей по меньшей мере в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше месяцев после лечения. В некоторых воплощениях субъект свободный от опухолей по меньшей мере в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше лет после лечения.

Гибель клеток-мишей можно определять любым подходящим способом, включая, без ограничения, подсчет клеток до и после лечения или измерение уровня маркера, связанного с живыми или мертвыми клетками (например, живыми или мертвыми клетками-мишенями). Степень гибели клеток можно определять любым подходящим способом. В некоторых воплощениях степень гибели клеток определяется относительно исходного состояния. Например, у человека может быть известно исходное количество клеток-мишеней типа исходной массы клеток известного размера или циркулирующих клеток-мишеней с известной концентрацией. В таких случаях степень гибели клеток можно выражать в виде отношения выживших клеток после лечения к исходной популяции клеток. В некоторых воплощениях степень гибели клеток можно определять подходящим методом анализа гибели клеток. Существует множество методов анализа гибели клеток, и можно использовать различные методы обнаружения. Примеры методов обнаружения включают, без ограничения, методы окрашивания клеток, микроскопии, проточной цитометрии, сортировки клеток и их сочетания.

Когда опухоль подвергается хирургической резекции по завершении периода терапии, то эффективность уменьшения размера опухоли при лечении можно определять путем измерения процента некротической (то есть мертвой) ткани в резецированной ткани. В некоторых воплощениях лечение терапевтически эффективно, если процент некроза в резецированной ткани составляет более 20% (например, по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%). В некоторых воплощениях процент некроза в резецированной ткани составляет 100%, т.е. живая опухолевая ткань совсем не присутствует или не обнаруживается.

Воздействие на клетки-мишени приведенными здесь иммунными клетками или популяцией иммунных клеток может проводиться либо *in vitro*, либо *in vivo*. Воздействие на клетки-мишени иммунными клетками или популяцией иммунных клеток обычно означает приведение клеток мишени в контакт с иммунными клетками и/или в достаточную близость с тем, чтобы антиген клеток мишени (например, мембраносвязанный или не мембраносвязанный) мог связаться со взаимодействующим с антигеном доменом химерного полипептида трансмембранного рецептора, экспрессируемого в иммунных клетках. Воздействие на клетки-мишени иммунными клетками или популяцией иммунных клеток *in vitro* может осуществляться путем совместного культивирования клеток-мишеней и иммунных клеток. Клетки-мишени и иммунные клетки можно культивировать совместно, к примеру, в виде адгезированных клеток или же в суспензии. Клетки-мишени и иммунные клетки можно культивировать совместно в подходящих клеточных культуральных средах различного типа, например, с добавками, факторами роста, ионами и т.п. Воздействие на клетки-мишени иммунными клетками или популяцией иммунных клеток *in vivo* может осуществляться, в некоторых случаях, путем введения иммунных клеток субъекту, например чело-

веку, что позволит иммунным клеткам сближаться с клетками мишени через систему кровообращения. В некоторых случаях иммунные клетки могут быть доставлены непосредственно в тот участок, где располагаются клетки-мишени, к примеру, путем прямой инъекции.

Воздействие может проводиться в течение любого подходящего периода времени, к примеру, в течение по меньшей мере 1 мин, по меньшей мере 5 мин, по меньшей мере 10 мин, по меньшей мере 30 мин, по меньшей мере 1 ч, по меньшей мере 2 ч, по меньшей мере 3 ч, по меньшей мере 4 ч, по меньшей мере 5 ч, по меньшей мере 6 ч, по меньшей мере 7 ч, по меньшей мере 8 ч, по меньшей мере 12 ч, по меньшей мере 16 ч, по меньшей мере 20 ч, по меньшей мере 24 ч, по меньшей мере 2 дня, по меньшей мере 3 дня, по меньшей мере 4 дня, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 1 неделю, по меньшей мере 2 недели, по меньшей мере 3 недели, по меньшей мере 1 месяц или дольше.

В различных воплощениях изложенных здесь аспектов используются одновременно несколько исполнительных элементов в одних и тех же клетках. В некоторых воплощениях исполнительный элемент, содержащий Cas-белок, может использоваться одновременно со вторым исполнительным элементом, содержащим нуклеазу с "цинковым пальцем" (ZFN), эффекторную нуклеазу типа активатора транскрипции (TALEN), мегануклеазу, РНК-связывающий белок (RBP), CRISPR-ассоциированный РНК-связывающий белок, рекомбиназу, флиппазу, транспозазу или белок Argonaute. В некоторых воплощениях исполнительный элемент, содержащий ZFN, может использоваться одновременно со вторым исполнительным элементом, содержащим Cas-белок, нуклеазу с "цинковым пальцем" (ZFN), эффекторную нуклеазу типа активатора транскрипции (TALEN), мегануклеазу, РНК-связывающий белок (RBP), CRISPR-ассоциированный РНК-связывающий белок, рекомбиназу, флиппазу, транспозазу или белок Argonaute. В некоторых воплощениях исполнительный элемент, содержащий TALEN, может использоваться одновременно со вторым исполнительным элементом, содержащим Cas-белок, нуклеазу с "цинковым пальцем" (ZFN), мегануклеазу, РНК-связывающий белок (RBP), CRISPR-ассоциированный РНК-связывающий белок, рекомбиназу, флиппазу, транспозазу или белок Argonaute. В некоторых воплощениях исполнительный элемент, содержащий TALEN, может использоваться одновременно со вторым исполнительным элементом, содержащим Cas-белок, нуклеазу с "цинковым пальцем" (ZFN), эффекторную нуклеазу типа активатора транскрипции (TALEN), РНК-связывающий белок (RBP), CRISPR-ассоциированный РНК-связывающий белок, рекомбиназу, флиппазу, транспозазу или белок Argonaute. В некоторых воплощениях исполнительный элемент, содержащий мегануклеазу, может использоваться одновременно со вторым исполнительным элементом, содержащим Cas-белок, нуклеазу с "цинковым пальцем" (ZFN), эффекторную нуклеазу типа активатора транскрипции (TALEN), РНК-связывающий белок (RBP), CRISPR-ассоциированный РНК-связывающий белок, рекомбиназу, флиппазу, транспозазу или белок Argonaute. В некоторых воплощениях исполнительный элемент, содержащий РНК-связывающий белок (RBP), может использоваться одновременно со вторым исполнительным элементом, содержащим Cas-белок, нуклеазу с "цинковым пальцем" (ZFN), эффекторную нуклеазу типа активатора транскрипции (TALEN), мегануклеазу, CRISPR-ассоциированный РНК-связывающий белок, рекомбиназу, флиппазу, транспозазу или белок Argonaute. В некоторых воплощениях исполнительный элемент, содержащий CRISPR-ассоциированный РНК-связывающий белок, может использоваться одновременно со вторым исполнительным элементом, содержащим Cas-белок, нуклеазу с "цинковым пальцем" (ZFN), эффекторную нуклеазу типа активатора транскрипции (TALEN), мегануклеазу, РНК-связывающий белок (RBP), рекомбиназу, флиппазу, транспозазу или белок Argonaute. В некоторых воплощениях исполнительный элемент, содержащий РНК-связывающий белок, может использоваться одновременно со вторым исполнительным элементом, содержащим Cas-белок, нуклеазу с "цинковым пальцем" (ZFN), эффекторную нуклеазу типа активатора транскрипции (TALEN), мегануклеазу, РНК-связывающий белок (RBP), CRISPR-ассоциированный РНК-связывающий белок, рекомбиназу, флиппазу, транспозазу или белок Argonaute. В некоторых воплощениях исполнительный элемент, содержащий флиппазу, может использоваться одновременно со вторым исполнительным элементом, содержащим Cas-белок, нуклеазу с "цинковым пальцем" (ZFN), эффекторную нуклеазу типа активатора транскрипции (TALEN), мегануклеазу, РНК-связывающий белок (RBP), CRISPR-ассоциированный РНК-связывающий белок, рекомбиназу, транспозазу или белок Argonaute. В некоторых воплощениях исполнительный элемент, содержащий транспозазу, может использоваться одновременно со вторым исполнительным элементом, содержащим Cas-белок, нуклеазу с "цинковым пальцем" (ZFN), эффекторную нуклеазу типа активатора транскрипции (TALEN), мегануклеазу, РНК-связывающий белок (RBP), CRISPR-ассоциированный РНК-связывающий белок, рекомбиназу, флиппазу, или белок Argonaute. В некоторых воплощениях исполнительный элемент, содержащий белок Argonaute, может использоваться одновременно со вторым исполнительным элементом, содержащим Cas-белок, нуклеазу с "цинковым пальцем" (ZFN), эффекторную нуклеазу типа активатора транскрипции (TALEN), мегануклеазу, РНК-связывающий белок (RBP), CRISPR-ассоциированный РНК-связывающий белок, рекомбиназу, флиппазу или транспозазу.

В некоторых воплощениях несколько исполнительных элементов используются одновременно в одних и тех же клетках, чтобы одновременно модулировать транскрипцию в разных местах на одной и той же ДНК-мишени или на разных ДНК-мишенях. В некоторых воплощениях исполнительный элемент содержит Cas-нуклеазу. Для наводки на различные нуклеиновые кислоты в нескольких комплексах CRISPR/Cas может использоваться Cas-белок из одного источника или одного типа с несколькими направляющими нуклеиновыми кислотами. С другой стороны, для наводки на несколько нуклеиновых кислот в нескольких комплексах CRISPR/Cas могут использоваться ортологические Cas-белки (например, мертвые белки Cas9 из различных организмов типа *S. pyogenes*, *S. aureus*, *S. thermophilus*, *L. innocua* и *N.*

meningitides).

В некоторых воплощениях используется несколько исполнительных элементов для регуляции экспрессии и/или активности по меньшей мере двух полинуклеотидов-мишеней или для редактирования последовательности нуклеиновой кислоты у по меньшей мере двух полинуклеотидов-мишеней. Эти по меньшей мере два полинуклеотида-мишени могут содержать одни и те же или разные гены или генные продукты. В некоторых воплощениях подвергается повышающей, понижающей регуляции либо их комбинации экспрессия по меньшей мере двух цитокинов. В некоторых воплощениях подвергается повышающей, понижающей регуляции или их комбинации экспрессия по меньшей мере двух иммунорегуляторных белков. В некоторых воплощениях подвергается изменению экспрессия цитокина и иммунорегуляторного белка. Например, усиливается экспрессия и цитокина, и иммунорегуляторного белка.

Экспрессия цитокина и иммунорегуляторного белка может уменьшаться. Экспрессия цитокина может усиливаться, а экспрессия иммунорегуляторного белка может уменьшаться или наоборот.

В некоторых воплощениях подвергается изменению экспрессия эндогенного гена и экзогенного гена. Например, может изменяться экспрессия эндогенного гена типа цитокина или иммунорегуляторного белка наряду с изменением экспрессии экзогенного гена, содержащего дополнительный химерный рецептор. Регуляция экспрессии рассматриваемых здесь полинуклеотидов-мишеней может мультиплексироваться в самых разных желательных комбинациях.

В некоторых воплощениях можно одновременно использовать несколько направляющих нуклеиновых кислот в одних и тех же клетках, чтобы одновременно модулировать транскрипцию в разных местах на одной и той же ДНК-мишени или на разных ДНК-мишенях. В некоторых воплощениях две или несколько направляющих нуклеиновых кислот нацелены на один и тот же ген или транскрипт или локус. В некоторых воплощениях две или несколько направляющих нуклеиновых кислот нацелены на разные несвязанные локусы. В некоторых воплощениях две или несколько направляющих нуклеиновых кислот нацелены на разные, но связанные локусы.

Две или несколько направляющих нуклеиновых кислот могут одновременно присутствовать на одном и том же экспрессирующем векторе. Две или несколько направляющих нуклеиновых кислот могут находиться под одним и тем же транскрипционным контролем. В некоторых воплощениях в клетках мишени одновременно экспрессируются две или несколько (например, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 10 или более, 15 или более, 20 или более, 25 или более, 30 или более, 35 или более, 40 или более, 45 или более или 50 или более) направляющих нуклеиновых кислот (из одного или из разных векторов). Экспрессируемые направляющие нуклеиновые кислоты могут по-разному распознаваться мертвыми Cas-белками (например, белками dCas9 из различных бактерий типа *S. pyogenes*, *S. aureus*, *S. thermophilus*, *L. innocua* и *N. meningitides*).

Для экспрессирования нескольких направляющих нуклеиновых кислот можно использовать искусственную систему процессинга направляющих нуклеиновых кислот при помощи эндонуклеазы (например, для обработки направляющих нуклеиновых кислот может использоваться эндорибонуклеаза Csy4). Например, несколько направляющих РНК могут быть соединены в tandemном порядке на транскрипте-предшественнике (например, экспрессируемом из промотора U6) и разделены Csy4-специфичной последовательностью РНК. Экспрессируемый совместно белок Csy4 может расщеплять транскрипт-предшественник на несколько направляющих РНК. Поскольку все направляющие РНК процессируются из транскрипта-предшественника, то их концентрации будут нормализованы для одинакового связывания dCas9.

Промоторы, которые можно использовать со способами и композициями изобретения, включают, к примеру, промоторы, активные в эукариотических клетках, клетках млекопитающих или человека. Промотор может быть индуцибельным или конститутивно активным промотором. С другой стороны, промотор может быть специфичным для ткани или клетки.

Неограничительные примеры подходящих эукариотических промоторов (то есть промоторов, функционирующих в эукариотических клетках) могут включать такие промоторы, как самый ранний промотор цитомегаловируса (CMV), промотор тимидинкиназы вируса Herpes simplex (HSV), ранний и поздний промотор SV40, длинные концевые повторы (LTRs) из ретровирусов, промотор фактора-1 элонгации человека (EF1), гибридные конструкции, содержащие энхансер цитомегаловируса (CMV), слитый с промотором β -актина курицы (CAG), промотор вируса стволовых клеток мыши (MSCV), промотор локуса фосфоглицераткиназы-1 (PGK) и металлотриона-1 мыши. Промотором может быть промотор грибов. Промотором может быть промотор растений. Имеются базы данных по промоторам растений (например, PlantProm). Экспрессирующий вектор также может содержать сайт связывания рибосом для инициации трансляции и терминатор транскрипции. Экспрессирующий вектор также может содержать соответствующие последовательности для усиления экспрессии.

В некоторых воплощениях полинуклеотид-мишень может содержать один или несколько связанных с заболеваниями генов и полинуклеотидов, а также гены и полинуклеотиды, связанные с сигнализацией биохимических путей. Примеры полинуклеотидов-мишеней включают последовательности, связанные с сигнализацией биохимических путей, например, гены или полинуклеотиды, связанные с сигнализацией биохимических путей. Примеры полинуклеотидов-мишеней включают связанные с заболеваниями гены

или полинуклеотиды. "Связанный с заболеванием" ген или полинуклеотид означает такой ген или полинуклеотид, который дает продукты транскрипции или трансляции на аномальном уровне или в аномальном виде в клетках из пораженной болезнью ткани по сравнению с тканями или клетками в контроле без болезни. В некоторых воплощениях это ген, который экспрессируется на аномально высоком уровне. В некоторых воплощениях это ген, который экспрессируется на аномально низком уровне. Изменение экспрессии может коррелировать с возникновением и/или прогрессированием заболевания. Связанный с заболеванием ген также означает ген, содержащий мутации или генетические вариации, который непосредственно ответственен или находится в неравновесном сцеплении с генами, которые ответственны за этиологию заболевания. Продукты транскрипции или трансляции могут быть известны или неизвестны и могут быть на нормальном или аномальном уровне.

Примеры связанных с заболеваниями генов и полинуклеотидов можно получить из McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, Md.) и National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, Md.), которые доступны на World Wide Web. Типичные гены, связанные с определенными заболеваниями и расстройствами, представлены в табл. 4 и 5. Примеры генов и полинуклеотидов, связанных с сигнализацией биохимических путей, приведены в табл. 6.

Мутации в этих генах и путях могут привести к выработыванию неправильных белков или белков в ненадлежащем количестве, что влияет на функцию.

Таблица 4

Заболевание/расстройство	Гены
Неоплазия	PTEN; ATM; ATR; EGFR; ERBB2; ERBB3; ERBB4; Notch1; Notch2; Notch3; Notch4; AKT; AKT2; AKT3; HIF; HIF1a; HIF3a; Met; HRG; Bcl2; PPAR- α ; PPAR- γ ; WT1 (опухоль Вильмса); гены семейства рецепторов FGF (5 представителей: 1, 2, 3, 4, 5); CDKN2a; APC; RB (ретинобластома); MEN1; VHL; BRCA1; BRCA2; AR (андрогеновый рецептор); TSG101; IGF; рецептор IGF; Igf1 (4 варианта); Igf2 (3 варианта); рецептор Igf 1; рецептор Igf 2; Vax; Bcl2; семейство каспаз (9 представителей: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12); Kras; Apc
Возрастная дегенерация желтого пятна	Abcr; Ccl2; Cc2; cr (церулоплазмин); Timpr3; катепсинD; Vldlr; Cer2
Шизофрения	нейрегулин1 (Nrg1); Erb4 (рецептор нейрегулина); комплексин 1 (Cplx1); триптофангидроксилаза Trp1; триптофангидроксилаза Trp2; нейрексин 1; GSK3; GSK3a; GSK3b
Расстройства	5-HTT (Slc6a4); COMT; DRD (Drd1a); SLC6A3; DAOA; DTNBP1; Dao (Dao1)
Заболевания с повторами тринуклеотидов	HTT (болезнь Хантингтона); SBMA/SMAX1/AR (болезнь Кеннеди); FXN/X25 (атаксия Фридриха); ATX3 (болезнь Мачадо-Джозефа); ATXN1 и ATXN2 (спиноцеребеллярная атаксия); DMPK (миотоническая дистрофия); атрофин-1 и Atn1 (болезнь DRPLA); CBP (Creb-BP – глобальная нестабильность); VLDLR (болезнь Альцгеймера); Atxn7; Atxn10
Синдром ломкой X-хромосомы	FMR2; FXR1; FXR2; mGLUR5
Нарушения секреции	APH-1 (α и β); пресенилин (Psen1); никастрин (Ncstn); PEN-2
Другие	Nos1; Parp1; Nat1; Nat2
Прионные заболевания	Prp
ALS	SOD1; ALS2; STEX; FUS; TARDBP; VEGF (VEGF-a; VEGF-b; VEGF-c)
Наркотическая зависимость	Prkce (алкоголь); Drd2; Drd4; ABAT (алкоголь); GRIA2; Grm5; Grin1; Htr1b; Grin2a; Drd3; Pdyn; Gria1 (алкоголь)
Аутизм	Mecp2; BZRAP1; MDGA2; Sema5A; нейрексин 1; ломкая X-хромосома (FMR2 (AFF2); FXR1; FXR2; Mglur5)
Болезнь Альцгеймера	E1; CHIP; UCH; UBB; Tau; LRP; PICALM; кластерин; PS1; SORL1; CR1; Vldlr; Uba1; Uba3; CHIP28 (Aqp1, аквапорин 1); Uchl1; Uchl3; APP
Воспаление	IL-10; IL-1 (IL-1a; IL-1b); IL-13; IL-17 (IL-17a (CTLA8); IL-17b; IL-17c; IL-17d; IL-17f); IL-23; Cx3cr1; ptpn22; TNFa; NOD2/CARD15 для IBD; IL-6; IL-12 (IL-12a; IL-12b); CTLA4; Cx3cl1
Болезнь Паркинсона	х-синуклеин; DJ-1; LRRK2; паркин; PINK1

Таблица 5

Гематологические заболевания и расстройства и коагулопатии	Анемия (CDAN1, CDA1, RPS19, DBA, PKLR, PK1, NT5C3, UMPH1, PSN1, RHAG, RH50A, NRAMP2, SPTB, ALAS2, ANH1, ASB, ABCB7, ABC7, ASAT); синдром голых лимфоцитов (TAPBP, TPN2, TAP2, ABCB3, PSF2, RING11, MHC2TA, C2TA, RFX5, RFXAP, RFX5); коагулопатии (TBXA2R, P2RX1, P2X1); фактор Н и фактор-1 типа Н (HF1, CFH, HUS); фактор V и фактор VIII (MCFD2); недостаточность фактора VII (F7); недостаточность фактора X (F10); недостаточность фактора XI (F11); недостаточность фактора XII (F12, HAF); недостаточность фактора XIIIА (F13A1, F13A); недостаточность фактора XIIIВ (F13B); анемия Фанкони (FANCA, FACA, FA1, FA, FAA, FAAP95, FAAP90, FLJ34064, FANCB, FANCC, FACC, BRCA2, FANCD1, FANCD2, FANCD, FACD, FAD, FANCE, FACE, FANCF, XRCC9, FANCG, BRIP1, BACH1, FANCI, PHF9, FANCL, FANCM, KIAA1596); гемофагоцитарные лимфогистиоцитозы (PRF1, HPLH2, UNC13D, MUNC13-4, HPLH3, HLH3, FHL3); гемофилия А (F8, F8C, HEMA); гемофилия В (F9, HEMВ); геморрагические заболевания (PI, АТТ, F5); лейкоцитарные дефекты и нарушения (ITGB2, CD18, LCAMB, LAD, EIF2B1, EIF2BA, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B5, LVWM, CACH, CLE, EIF2B4); серповидноклеточная анемия (HBB); талассемия (HBA2, HBB, HBD, LCRB, HBA1)
Нарушения клеточной регуляции и онкологические заболевания и расстройства	В-клеточная неходжкинская лимфома (BCL7A, BCL7); лейкомия (TAL1, TCL5, SCL, TAL2, FLT3, NBS1, NBS, ZNFN1A1, IK1, LYF1, HOXD4, HOX4B, BCR, CML, PHL, ALL, ARNT, KRAS2, RASK2, GMPS, AF10, ARHGEF12, LARG, KIAA0382, CALM, CLTH, CEBPA, CEBP, CHIC2, BTL, FLT3, KIT, PBT, LPP, NPM1, NUP214, D9S46E, CAN, CAIN, RUNX1, CBFA2, AML1, WHSC1L1, NSD3, FLT3, AF1Q, NPM1, NUMA1, ZNF145, PLZF, PML, MYL, STAT5B, AF10, CALM, CLTH, ARL11, ARLTS1, P2RX7, P2X7, BCR, CML, PHL, ALL, GRAF, NF1, VRNF, WSS, NFNS, PTPN11, PTP2C, SHP2, NS1, BCL2, CCND1, PRAD1, BCL1, TCRA, GATA1, GF1, ERYF1, NFE1, ABL1, NQO1, DIA4, NMOR1, NUP214, D9S46E, CAN, CAIN)
Воспалительные и иммунологические заболевания и расстройства	СПИД (KIR3DL1, NKAT3, NKВ1, AMB11, KIR3DS1, IFNG, CXCL12, SDF1); аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (TNFRSF6, APT1, FAS, CD95, ALPS1A); комбинированный иммунодефицит (IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4); HIV-1 (CCL5, SCYA5, D17S136E, TCP228), восприимчивость к ВИЧ или ВИЧ-инфекция (IL10, CSIF, CMKBR2, CCR2, CMKBR5, CCCR5 (CCR5)); иммунодефициты (CD3E, CD3G, AICDA, AID, HIGM2, TNFRSF5, CD40, UNG, DGU, HIGM4, TNFSF5, CD40LG, HIGM1, IGM, FOXP3, IPEX, AID, XPID, PIDX, TNFRSF14B, TACI); воспаление (IL-10, IL-1 (IL-1a, IL-1b), IL-13, IL-17 (IL-17a (CTLA8), IL-17b, IL-17c, IL-17d, IL-17f), IL-23, Cx3cr1, ptpn22, TNFa, NOD2/CARD15 для IBD, IL-6, IL-12 (IL-12a, IL-12b), CTLA4, Cx3cl1); тяжелые комбинированные иммунодефициты (SCIDs) (JAK3, JAKL, DCLRE1C, ARTEMIS, SCIDA, RAG1,

	RAG2, ADA, PTPRC, CD45, LCA, IL7R, CD3D, T3D, IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4)
Метаболические, печеночные, почечные и белковые заболевания и расстройства	Амилоидная невропатия (TTR, PALB); амилоидоз (APOA1, APP, AAA, CVAP, AD1, GSN, FGA, LYZ, TTR, PALB); цирроз (KRT18, KRT8, CIRH1A, NAIC, TEX292, KIAA1988); кистозный фиброз (CFTR, ABCC7, CF, MRP7); болезни накопления гликогена (SLC2A2, GLUT2, G6PC, G6PT, G6PT1, GAA, LAMP2, LAMPB, AGL, GDE, GBE1, GYS2, PYGL, PFKM); аденома печени 142330 (TCF1, HNF1A, MODY3), печеночная недостаточность, ранняя форма, и неврологические расстройства (SCOD1, SCO1), недостаточность печеночной липазы (LIPC), гепатобластома, рак и карцинома печени (CTNNB1, PDGFRL, PDGRL, PRLTS, AXIN1, AXIN, CTNNB1, TP53, P53, LFS1, IGF2R, MPRI, MET, CASP8, MCH5; медуллярная кистозная болезнь почек (UMOD, HNFJ, FJHN, MCKD2, ADMCKD2); фенилкетонурия (PAH, PKU1, QDPR, DHPR, PTS); поликистозная болезнь почек и печени (FCYT, PKHD1, ARPKD, PKD1, PKD2, PKD4, PKDTS, PRKCSH, G19P1, PCLD, SEC63)
Мышечные и скелетные заболевания	Мышечная дистрофия Беккера (DMD, BMD, MYF6), мышечная дистрофия Дюшенна (DMD, BMD); мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса (LMNA, LMN1, EMD2, FPLD, CMD1A, HGPS, LGMD1B, LMNA, LMN1, EMD2, FPLD, CMD1A); фациоскапулогумеральная мышечная дистрофия (FSHMD1A, FSHD1A); мышечная дистрофия (FKRP, MDC1C, LGMD2I, LAMA2, LAMM, LARGE, KIAA0609, MDC1D, FCMD, TTID, MYOT, CAPN3, CANP3, DYSF, LGMD2B, SGCG, LGMD2C, DMDA1, SCG3, SGCA, ADL, DAG2, LGMD2D, DMDA2, SGCB, LGMD2E, SGCD, SGD, LGMD2F, CMD1L, TCAP, LGMD2G, CMD1N, TRIM32, HT2A, LGMD2H, FKRP, MDC1C, LGMD2I, TTN, CMD1G, TMD, LGMD2J, POMT1, CAV3, LGMD1C, SEPNI, SELN, RSMD1, PLEC1, PLTN, EBS1); остеопетроз (LRP5, BMND1, LRP7, LR3, OPPG, VBCH2, CLCN7, CLC7, OPTA2, OSTM1, GL, TCIRG1, TIRC7, OC116, OPTB1); мышечная атрофия (VAPB, VAPC, ALS8, SMN1, SMA1, SMA2, SMA3, SMA4, BSCL2, SPG17, GARS, SMAD1, CMT2D, HEXB, IGHMBP2, SMUBP2, CATF1, SMARD1)
Неврологические и нейронные заболевания и расстройства	ALS (SOD1, ALS2, STEX, FUS, TARDBP, VEGF (VEGF-a, VEGF-b, VEGF-c); болезнь Альцгеймера (APP, AAA, CVAP, AD1, APOE, AD2, PSEN2, AD4, STM2, APBB2, FE65L1, NOS3, PLAUI, URK, ACE, DCP1, ACE1, MPO, PACIP1, PAXIP1L, PTIP, A2M, BLMH, BMH, PSEN1, AD3); аутизм (MECP2, BZRAP1, MDGA2, Sema5A, нейрексин 1, GLO1, MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, NLGN3, NLGN4, KIAA1260, AUTSX2); синдром ломкой X-хромосомы (FMR2, FXR1, FXR2, mGLUR5); болезнь Хантингтона и сходные заболевания (HD, IT15, PRNP, PRIP, JPH3, JP3, HDL2, TBP, SCA17); болезнь Паркинсона (NR4A2, NURR1, NOT, TINUR, SNCAIP, TBP, SCA17, SNCA, NACP, PARK1, PARK4, DJ1, PARK7, LRRK2, PARK8, PINK1, PARK6, UCHL1, PARK5, SNCA, NACP, PARK1, PARK4, PRKN, PARK2, PDJ, DBH, NDUFV2); синдром Ретта (MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, CDKL5, STK9, MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, х-синуклеин, DJ-1); шизофрения (нейрегулин 1 (Nrg1), Erb4 (рецептор нейрегулина), комплексин I (Cplx1), триптофангидроксилаза Tph1, триптофангидроксилаза Tph2, нейрексин 1, GSK3, GSK3a, GSK3b, 5-HTT (Slc6a4), COMT, DRD (Drd1a), SLC6A3, DAOA, DTNBP1, Dao (Dao1)); нарушения секреции (APH-1 (α и β), пресенилин (Psen1), никастрин (Ncstn), PEN-2, Nos1, Parp1, Nat1, Nat2);

	заболевания с повторами тринуклеотидов (HTT (болезнь Хантингтона), SBMA/SMAХ1/AR (болезнь Кеннеди), FXN/X25 (атаксия Фридриха), АТХ3 (болезнь Мачадо-Джозефа), АТХN1 и АТХN2 (спиноцеребеллярная атаксия), DMPK (миотоническая дистрофия), атрофин-1 и Atn1 (болезнь DRPLA), CBP (Creb-BP – глобальная нестабильность), VLDLR (болезнь Альцгеймера), Atxn7, Atxn10)
Глазные заболевания и расстройства	возрастная дегенерация желтого пятна (Abcr, Ccl2, Cc2, ср (церулоплазмин), Timр3, катепсин D, Vldlr, Cer2); катаракта (CRYAA, CRYA1, CRYBB2, CRYB2, PITX3, BFSP2, CP49, CP47, CRYAA, CRYA1, PAX6, AN2, MGDA, CRYBA1, CRYB1, CRYGC, CRYG3, CCL, LIM2, MP19, CRYGD, CRYG4, BFSP2, CP49, CP47, HSF4, CTM, HSF4, CTM, MIP, AQP0, CRYAB, CRYA2, CTRP2, CRYBB1, CRYGD, CRYG4, CRYBB2, CRYB2, CRYGC, CRYG3, CCL, CRYAA, CRYA1, GJA8, CX50, CAE1, GJA3, CX46, CZP3, CAE3, CCM1, CAM, KRIT1); помутнение и дистрофия роговицы (APOA1, TGFBI, CSD2, CDGG1, CSD, BIGH3, CDG2, TACSTD2, TROP2, M1S1, VSX1, RINX, PPCD, PPD, KTCN, COL8A2, FECD, PPCD2, PIP5K3, CFD); врожденная плоская роговица (KERA, CNA2); глаукома (MYOC, TIGR, GLC1A, JOAG, GPOA, OPTN, GLC1E, FIP2, HYPL, NRP, CYP1B1, GLC3A, OPA1, NTG, NPG, CYP1B1, GLC3A); врожденный амавроз Лебера (CRB1, RP12, CRX, CORD2, CRD, RPGRIP1, LCA6, CORD9, RPE65, RP20, AIPL1, LCA4, GUCY2D, GUC2D, LCA1, CORD6, RDH12, LCA3); дистрофия желтого пятна (ELOVL4, ADMD, STGD2, STGD3, RDS, RP7, PRPH2, PRPH, AVMD, AOFMD, VMD2)

Таблица 6

Клеточная функция	Гены
Сигнализация PI3K/AKT	PRKCE; ITGAM; ITGA5; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; PTEN; EIF4E; PRKCZ; GRK6; MAPK1; TSC1; PLK1; AKT2; IKBKB; PIK3CA; CDK8; CDKN1B; NFKB2; BCL2; PIK3CB; PPP2R1A; MAPK8; BCL2L1; MAPK3; TSC2; ITGA1; KRAS; EIF4EBP1; RELA; PRKCD; NOS3; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PPP2CA; PIM1; ITGB7; YWHAZ; ILK; TP53; RAF1; IKBKG; RELB; DYRK1A; CDKN1A; ITGB1; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; CHUK; PDPK1; PPP2R5C; CTNNB1; MAP2K1; NFKB1; PAK3; ITGB3; CCND1; GSK3A; FRAP1; SFN; ITGA2; TTK; CSNK1A1; BRAF; GSK3B; AKT3; FOXO1; SGK; HSP90AA1; RPS6KB1
Сигнализация ERK/MAPK	PRKCE; ITGAM; ITGA5; HSPB1; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; RAPIA; TLN1; EIF4E; ELK1; GRK6; MAPK1; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; CREB1; PRKCI; PTK2; FOS; RPS6KA4; PIK3CB; PPP2R1A; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; ITGA1; ETS1; KRAS; MYCN; EIF4EBP1; PPARC; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC; CDK2; PPP2CA; PIM1; PIK3C2A; ITGB7; YWHAZ; PPP1CC; KSR1; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1; MAP2K2; PAK4; PIK3R1; STAT3; PPP2R5C; MAP2K1; PAK3; ITGB3; ESR1; ITGA2; MYC; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; ATF4; PRKCA; SRF; STAT1; SGK
Сигнализация рецепторов глюкокортикоидов	RAC1; TAF4B; EP300; SMAD2; TRAF6; PCAF; ELK1; MAPK1; SMAD3; AKT2; IKBKB; NCOR2; UBE2I; PIK3CA; CREB1; FOS; HSPA5; NFKB2; BCL2; MAP3K14; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1; MAPK3; TSC22D3; MAPK10; NRIP1; KRAS; MAPK13; RELA; STAT5A; MAPK9; NOS2A; PBX1; NR3C1; PIK3C2A; CDKN1C; TRAF2;

	SERPINE1; NCOA3; MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG; MAP3K7; CREBBP; CDKN1A; MAP2K2; JAK1; IL8; NCOA2; AKT1; JAK2; PIK3R1; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; TGFB1; ESR1; SMAD4; CEBPB; JUN; AR; AKT3; CCL2; MMP1; STAT1; IL6; HSP90AA1
Сигнализация наведения аксонов	PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; ADAM12; IGF1; RAC1; RAPIA; EIF4E; PRKCZ; NRPI; NTRK2; ARHGEF7; SMO; ROCK2; MAPK1; PGF; RAC2; PTPN11; GNAS; AKT2; PIK3CA; ERBB2; PRKCI; PTK2; CFL1; GNAQ; PIK3CB; CXCL12; PIK3C3; WNT11; PRKDI; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD; PIK3C2A; ITGB7; GLI2; PXN; VASP; RAF1; FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; ADAM17; AKT1; PIK3R1; GLI1; WNT5A; ADAM10; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; VEGFA; ITGA2; EPHA8; CRKL; RND1; GSK3B; AKT3; PRKCA
Сигнализация эфриновых рецепторов	PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; RAPIA; GRK6; ROCK2; MAPK1; PGF; RAC2; PTPN11; GNAS; PLK1; AKT2; DOK1; CDK8; CREB1; PTK2; CFL1; GNAQ; MAP3K14; CXCL12; MAPK8; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC; CDK2; PIM1; ITGB7; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1; MAP2K2; PAK4; AKT1; JAK2; STAT3; ADAM10; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; VEGFA; ITGA2; EPHA8; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; PTPN13; ATF4; AKT3; SGK
Сигнализация актинового цитоскелета	ACTN4; PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; INS; ARHGEF7; GRK6; ROCK2; MAPK1; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; PTK2; CFL1; PIK3CB; MYH9; DIAPH1; PIK3C3; MAPK8; F2R; MAPK3; SLC9A1; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; ITGB7; PPP1CC; PXN; VIL2; RAF1; GSN; DYRK1A; ITGB1; MAP2K2; PAK4; PIP5K1A; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; APC; ITGA2; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; VAV3; SGK
Сигнализация болезни Хантингтона	PRKCE; IGF1; EP300; RCOR1; PRKCZ; HDAC4; TGM2; MAPK1; CAPNS1; AKT2; EGFR; NCOR2; SP1; CAPN2; PIK3CA; HDAC5; CREB1; PRKCI; HSPA5; REST; GNAQ; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IGF1R; PRKDI; GNB2L1; BCL2L1; CAPN1; MAPK3; CASP8; HDAC2; HDAC7A; PRKCD; HDAC11; MAPK9; HDAC9; PIK3C2A; HDAC3; TP53; CASP9; CREBBP; AKT1; PIK3R1; PDPK1; CASP1; APAF1; FRAP1; CASP2; JUN; BAX; ATF4; AKT3; PRKCA; CLTC; SGK; HDAC6; CASP3
Сигнализация апоптоза	PRKCE; ROCK1; BID; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; BAK1; BIRC4; GRK6; MAPK1; CAPNS1; PLK1; AKT2; IKBKB; CAPN2; CDK8; FAS; NFKB2; BCL2; MAP3K14; MAPK8; BCL2L1; CAPN1; MAPK3; CASP8; KRAS; RELA; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; TP53; TNF; RAF1; IKBKG; RELB; CASP9; DYRK1A; MAP2K2; CHUK; APAF1; MAP2K1; NFKB1; PAK3; LMNA; CASP2; BIRC2; TTK; CSNK1A1; BRAF; BAX; PRKCA; SGK; CASP3; BIRC3; PARP1
Сигнализация В-клеточных рецепторов	RAC1; PTEN; LYN; ELK1; MAPK1; RAC2; PTPN11; AKT2; IKBKB; PIK3CA; CREB1; SYK; NFKB2; CAMK2A; MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1; ABL1; MAPK3; ETS1; KRAS; MAPK13; RELA; PTPN6; MAPK9; EGR1; PIK3C2A; BTK; MAPK14; RAF1; IKBKG; RELB;

	MAP3K7; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; MAP2K1; NFKB1; CDC42; GSK3A; FRAP1; BCL6; BCL10; JUN; GSK3B; ATF4; AKT3; VAV3; RPS6KB1
Сигнализация экстравазации лейкоцитов	ACTN4; CD44; PRKCE; ITGAM; ROCK1; CXCR4; CYBA; RAC1; RAP1A; PRKCZ; ROCK2; RAC2; PTPN11; MMP14; PIK3CA; PRKCI; PTK2; PIK3CB; CXCL12; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; ABL1; MAPK10; CYBB; MAPK13; RHOA; PRKCD; MAPK9; SRC; PIK3C2A; BTK; MAPK14; NOX1; PXN; VIL2; VASP; ITGB1; MAP2K2; CTNND1; PIK3R1; CTNNB1; CLDN1; CDC42; F11R; ITK; CRKL; VAV3; CTTN; PRKCA; MMP1; MMP9
Сигнализация интегринов	ACTN4; ITGAM; ROCK1; ITGA5; RAC1; PTEN; RAP1A; TLN1; ARHGEF7; MAPK1; RAC2; CAPNS1; AKT2; CAPN2; PIK3CA; PTK2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; CAV1; CAPN1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA; SRC; PIK3C2A; ITGB7; PPP1CC; ILK; PXN; VASP; RAF1; FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; AKT1; PIK3R1; TNK2; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; RND3; ITGA2; CRKL; BRAF; GSK3B; AKT3
Сигнализация острой фазы	IRAK1; SOD2; MYD88; TRAF6; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; IKBKB; PIK3CA; FOS; NFKB2; MAP3K14; PIK3CB; MAPK8; RIPK1; MAPK3; IL6ST; KRAS; MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1; MAPK9; FTL; NR3C1; TRAF2; SERPINE1; MAPK14; TNF; RAF1; PDK1; IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; AKT1; JAK2; PIK3R1; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; FRAP1; CEBPB; JUN; AKT3; IL1R1; IL6
Сигнализация PTEN	ITGAM; ITGA5; RAC1; PTEN; PRKCZ; BCL2L11; MAPK1; RAC2; AKT2; EGFR; IKBKB; CBL; PIK3CA; CDKN1B; PTK2; NFKB2; BCL2; PIK3CB; BCL2L1; MAPK3; ITGA1; KRAS; ITGB7; ILK; PDGFRB; INSR; RAF1; IKBKG; CASP9; CDKN1A; ITGB1; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; PDGFRA; PDPK1; MAP2K1; NFKB1; ITGB3; CDC42; CCND1; GSK3A; ITGA2; GSK3B; AKT3; FOXO1; CASP3; RPS6KB1
Сигнализация p53	PTEN; EP300; BBC3; PCAF; FASN; BRCA1; GADD45A; BIRC5; AKT2; PIK3CA; CHEK1; TP53INP1; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; THBS1; ATR; BCL2L1; E2F1; PMAIP1; CHEK2; TNFRSF10B; TP73; RB1; HDAC9; CDK2; PIK3C2A; MAPK14; TP53; LRDD; CDKN1A; HIPK2; AKT1; PIK3R1; RRM2B; APAF1; CTNNB1; SIRT1; CCND1; PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A; JUN; SNAI2; GSK3B; BAX; AKT3
Сигнализация рецепторов арилуглеводородов	HSPB1; EP300; FASN; TGM2; RXRA; MAPK1; NQO1; NCOR2; SP1; ARNT; CDKN1B; FOS; CHEK1; SMARCA4; NFKB2; MAPK8; ALDH1A1; ATR; E2F1; MAPK3; NRIP1; CHEK2; RELA; TP73; GSTP1; RB1; SRC; CDK2; AHR; NFE2L2; NCOA3; TP53; TNF; CDKN1A; NCOA2; APAF1; NFKB1; CCND1; ATM; ESR1; CDKN2A; MYC; JUN; ESR2; BAX; IL6; CYP1B1; HSP90AA1
Сигнализация метаболизма ксенобиотиков	PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; MAPK1; NQO1; NCOR2; PIK3CA; ARNT; PRKCI; NFKB2; CAMK2A; PIK3CB; PPP2R1A; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; ALDH1A1; MAPK3; NRIP1; KRAS; MAPK13; PRKCD; GSTP1; MAPK9; NOS2A; ABCB1; AHR; PPP2CA; FTL; NFE2L2; PIK3C2A; PPARGC1A; MAPK14; TNF; RAF1; CREBBP; MAP2K2; PIK3R1; PPP2R5C; MAP2K1; NFKB1; KEAP1; PRKCA; EIF2AK3; IL6; CYP1B1; HSP90AA1
Сигнализация SAPK/JNK	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; ELK1; GRK6; MAPK1; GADD45A; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; FADD;

	CDK8; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; RIPK1; GNB2L1; IRS1; MAPK3; MAPK10; DAXX; KRAS; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; TRAF2; TP53; LCK; MAP3K7; DYRK1A; MAP2K2; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; CDC42; JUN; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; SGK
Сигнализация PPAγ/RXR	PRKAA2; EP300; INS; SMAD2; TRAF6; PPARA; FASN; RXRA; MAPK1; SMAD3; GNAS; IKBKB; NCOR2; ABCA1; GNAQ; NFKB2; MAP3K14; STAT5B; MAPK8; IRS1; MAPK3; KRAS; RELA; PRKAA1; PPARGC1A; NCOA3; MAPK14; INSR; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; JAK2; CHUK; MAP2K1; NFKB1; TGFB1; SMAD4; JUN; IL1R1; PRKCA; IL6; HSP90AA1; ADIPOQ
Сигнализация NF-KB	IRAK1; EIF2AK2; EP300; INS; MYD88; PRKCZ; TRAF6; TBK1; AKT2; EGFR; IKBKB; PIK3CA; BTRC; NFKB2; MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; RIPK1; HDAC2; KRAS; RELA; PIK3C2A; TRAF2; TLR4; PDGFRB; TNF; INSR; LCK; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; AKT1; PIK3R1; CHUK; PDGFRA; NFKB1; TLR2; BCL10; GSK3B; AKT3; TNFAIP3; IL1R1
Сигнализация нейрорегулинов	ERBB4; PRKCE; ITGAM; ITGA5; PTEN; PRKCZ; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; EGFR; ERBB2; PRKCI; CDKN1B; STAT5B; PRKD1; MAPK3; ITGA1; KRAS; PRKCD; STAT5A; SRC; ITGB7; RAF1; ITGB1; MAP2K2; ADAM17; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; ITGB3; EREG; FRAP1; PSEN1; ITGA2; MYC; NRG1; CRKL; AKT3; PRKCA; HSP90AA1; RPS6KB1
Сигнализация Wnt и β-катенина	CD44; EP300; LRP6; DVL3; CSNK1E; GJA1; SMO; AKT2; PIN1; CDH1; BTRC; GNAQ; MARK2; PPP2R1A; WNT11; SRC; DKK1; PPP2CA; SOX6; SFRP2; ILK; LEF1; SOX9; TP53; MAP3K7; CREBBP; TCF7L2; AKT1; PPP2R5C; WNT5A; LRP5; CTNNB1; TGFB1; CCND1; GSK3A; DVL1; APC; CDKN2A; MYC; CSNK1A1; GSK3B; AKT3; SOX2
Инсулиновый рецептор	PTEN; INS; EIF4E; PTPN1; PRKCZ; MAPK1; TSC1; PTPN11; AKT2; CBL; PIK3CA; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IRS1; MAPK3; TSC2; KRAS; EIF4EBP1; SLC2A4; PIK3C2A; PPP1CC; INSR; RAF1; FYN; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; GSK3A; FRAP1; CRKL; GSK3B; AKT3; FOXO1; SGK; RPS6KB1
Сигнализация IL-6	HSPB1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; MAPK1; PTPN11; IKBKB; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK3; MAPK10; IL6ST; KRAS; MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1; MAPK9; ABCB1; TRAF2; MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; IL8; JAK2; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; CEBPB; JUN; IL1R1; SRF; IL6
Печеночный холестаза	PRKCE; IRAK1; INS; MYD88; PRKCZ; TRAF6; PPARA; RXRA; IKBKB; PRKCI; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; PRKD1; MAPK10; RELA; PRKCD; MAPK9; ABCB1; TRAF2; TLR4; TNF; INSR; IKBKG; RELB; MAP3K7; IL8; CHUK; NRIH2; TJP2; NFKB1; ESR1; SREBF1; FGFR4; JUN; IL1R1; PRKCA; IL6
Сигнализация IGF-1	IGF1; PRKCZ; ELK1; MAPK1; PTPN11; NEDD4; AKT2; PIK3CA; PRKCI; PTK2; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IGF1R; IRS1; MAPK3; IGFBP7; KRAS; PIK3C2A; YWHAZ; PXN; RAF1; CASP9; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; IGFBP2; SFN; JUN; CYR61; AKT3; FOXO1; SRF; CTGF; RPS6KB1
Опосредованная NRF2 реакция	PRKCE; EP300; SOD2; PRKCZ; MAPK1; SQSTM1; NQO1;

на окислительный стресс	PIK3CA; PRKCI; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; GSTP1; MAPK9; FTL; NFE2L2; PIK3C2A; MAPK14; RAF1; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; PPIB; JUN; KEAP1; GSK3B; ATF4; PRKCA; EIF2AK3; HSP90AA1
Активация фиброза печени/ звездчатых клеток печени	EDN1; IGF1; KDR; FLT1; SMAD2; FGFR1; MET; PGF; SMAD3; EGFR; FAS; CSF1; NFKB2; BCL2; MYH9; IGF1R; IL6R; RELA; TLR4; PDGFRB; TNF; RELB; IL8; PDGFRA; NFKB1; TGFBR1; SMAD4; VEGFA; BAX; IL1R1; CCL2; HGF; MMP1; STAT1; IL6; CTGF; MMP9
Сигнализация PPAR	EP300; INS; TRAF6; PPARA; RXRA; MAPK1; IKBKB; NCOR2; FOS; NFKB2; MAP3K14; STAT5B; MAPK3; NRIP1; KRAS; PPARG; RELA; STAT5A; TRAF2; PPARGC1A; PDGFRB; TNF; INSR; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; CHUK; PDGFRA; MAP2K1; NFKB1; JUN; IL1R1; HSP90AA1
Сигнализация Fce-RI	PRKCE; RAC1; PRKCZ; LYN; MAPK1; RAC2; PTPN11; AKT2; PIK3CA; SYK; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; MAPK3; MAPK10; KRAS; MAPK13; PRKCD; MAPK9; PIK3C2A; BTK; MAPK14; TNF; RAF1; FYN; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; AKT3; VAV3; PRKCA
Сигнализация рецепторов, сопряженных с G-белком	PRKCE; RAP1A; RGS16; MAPK1; GNAS; AKT2; IKBKB; PIK3CA; CREB1; GNAQ; NFKB2; CAMK2A; PIK3CB; PIK3C3; MAPK3; KRAS; RELA; SRC; PIK3C2A; RAF1; IKBKG; RELB; FYN; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; PDPK1; STAT3; MAP2K1; NFKB1; BRAF; ATF4; AKT3; PRKCA
Метаболизм инозитолфосфата	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; PTEN; GRK6; MAPK1; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; DYRK1A; MAP2K2; PIP5K1A; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; ATM; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK
Сигнализация PDGF	EIF2AK2; ELK1; ABL2; MAPK1; PIK3CA; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; CAV1; ABL1; MAPK3; KRAS; SRC; PIK3C2A; PDGFRB; RAF1; MAP2K2; JAK1; JAK2; PIK3R1; PDGFRA; STAT3; SPHK1; MAP2K1; MYC; JUN; CRKL; PRKCA; SRF; STAT1; SPHK2
Сигнализация VEGF	ACTN4; ROCK1; KDR; FLT1; ROCK2; MAPK1; PGF; AKT2; PIK3CA; ARNT; PTK2; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; BCL2L1; MAPK3; KRAS; HIF1A; NOS3; PIK3C2A; PXN; RAF1; MAP2K2; ELAVL1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; SFN; VEGFA; AKT3; FOXO1; PRKCA
Сигнализация клеток естественных киллеров	PRKCE; RAC1; PRKCZ; MAPK1; RAC2; PTPN11; KIR2DL3; AKT2; PIK3CA; SYK; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; PTPN6; PIK3C2A; LCK; RAF1; FYN; MAP2K2; PAK4; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; AKT3; VAV3; PRKCA
Регуляция клеточного цикла: контрольная точка G1/S	HDAC4; SMAD3; SUV39H1; HDAC5; CDKN1B; BTRC; ATR; ABL1; E2F1; HDAC2; HDAC7A; RB1; HDAC11; HDAC9; CDK2; E2F2; HDAC3; TP53; CDKN1A; CCND1; E2F4; ATM; RBL2; SMAD4; CDKN2A; MYC; NRG1; GSK3B; RBL1; HDAC6
Сигнализация T-клеточных рецепторов	RAC1; ELK1; MAPK1; IKBKB; CBL; PIK3CA; FOS; NFKB2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; RELA; PIK3C2A; BTK; LCK; RAF1; IKBKG; RELB; FYN; MAP2K2; PIK3R1; CHUK; MAP2K1; NFKB1; ITK; BCL10; JUN; VAV3

Сигнализация рецепторов смерти	CRADD; HSPB1; BID; BIRC4; TBK1; IKBKB; FADD; FAS; NFKB2; BCL2; MAP3K14; MAPK8; RIPK1; CASP8; DAXX; TNFRSF10B; RELA; TRAF2; TNF; IKBKG; RELB; CASP9; CHUK; APAF1; NFKB1; CASP2; BIRC2; CASP3; BIRC3
Сигнализация FGF	RAC1; FGFR1; MET; MAPKAPK2; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; CREB1; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; MAPK13; PTPN6; PIK3C2A; MAPK14; RAF1; AKT1; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; FGFR4; CRKL; ATF4; AKT3; PRKCA; HGF
Сигнализация GM-CSF	LYN; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; CAMK2A; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; GNB2L1; BCL2L1; MAPK3; ETS1; KRAS; RUNX1; PIM1; PIK3C2A; RAF1; MAP2K2; AKT1; JAK2; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; CCND1; AKT3; STAT1
Сигнализация бокового амиотрофического склероза	BID; IGF1; RAC1; BIRC4; PGF; CAPNS1; CAPN2; PIK3CA; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; BCL2L1; CAPN1; PIK3C2A; TP53; CASP9; PIK3R1; RAB5A; CASP1; APAF1; VEGFA; BIRC2; BAX; AKT3; CASP3; BIRC3
Сигнализация JAK/Stat	PTPN1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK3; KRAS; SOCS1; STAT5A; PTPN6; PIK3C2A; RAF1; CDKN1A; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; FRAP1; AKT3; STAT1
Метаболизм никотината и никотинамида	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; GRK6; MAPK1; PLK1; AKT2; CDK8; MAPK8; MAPK3; PRKCD; PRKAA1; PBEF1; MAPK9; CDK2; PIM1; DYRK1A; MAP2K2; MAP2K1; PAK3; NT5E; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK
Сигнализация хемокинов	CXCR4; ROCK2; MAPK1; PTK2; FOS; CFL1; GNAQ; CAMK2A; CXCL12; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK13; RHOA; CCR3; SRC; PPP1CC; MAPK14; NOX1; RAF1; MAP2K2; MAP2K1; JUN; CCL2; PRKCA
Сигнализация IL-2	ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; SYK; FOS; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; SOCS1; STAT5A; PIK3C2A; LCK; RAF1; MAP2K2; JAK1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; JUN; AKT3
Долговременная синаптическая депрессия	PRKCE; IGF1; PRKCZ; PRDX6; LYN; MAPK1; GNAS; PRKCI; GNAQ; PPP2R1A; IGF1R; PRKD1; MAPK3; KRAS; GRN; PRKCD; NOS3; NOS2A; PPP2CA; YWHAZ; RAF1; MAP2K2; PPP2R5C; MAP2K1; PRKCA
Сигнализация эстрогеновых рецепторов	TAF4B; EP300; CARM1; PCAF; MAPK1; NCOR2; SMARCA4; MAPK3; NRIP1; KRAS; SRC; NR3C1; HDAC3; PPARGC1A; RBM9; NCOA3; RAF1; CREBBP; MAP2K2; NCOA2; MAP2K1; PRKDC; ESR1; ESR2
Путь убиквитинирования белков	TRAF6; SMURF1; BIRC4; BRCA1; UCHL1; NEDD4; CBL; UBE2I; BTRC; HSPA5; USP7; USP10; FBXW7; USP9X; STUB1; USP22; B2M; BIRC2; PARK2; USP8; USP1; VHL; HSP90AA1; BIRC3
Сигнализация IL-10	TRAF6; CCR1; ELK1; IKBKB; SP1; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK13; RELA; MAPK14; TNF; IKBKG; RELB; MAP3K7; JAK1; CHUK; STAT3; NFKB1; JUN; IL1R1; IL6
Активация VDR/RXR	PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; GADD45A; HES1; NCOR2; SP1; PRKC1; CDKN1B; PRKD1; PRKCD; RUNX2; KLF4; YY1; NCOA3; CDKN1A; NCOA2; SPP1; LRP5; CEBPB; FOXO1; PRKCA
Сигнализация TGF-β	EP300; SMAD2; SMURF1; MAPK1; SMAD3; SMAD1; FOS; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK9; RUNX2; SERPINE1; RAF1; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; MAP2K1; TGFBR1; SMAD4; JUN; SMAD5

Сигнализация Toll-подобных рецепторов	IRAK1; EIF2AK2; MYD88; TRAF6; PPARA; ELK1; IKBKB; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK13; RELA; TLR4; MAPK14; IKBKG; RELB; MAP3K7; CHUK; NFKB1; TLR2; JUN
Сигнализация MAPK p38	HSPB1; IRAK1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; FADD; FAS; CREB1; DDIT3; RPS6KA4; DAXX; MAPK13; TRAF2; MAPK14; TNF; MAP3K7; TGFB1; MYC; ATF4; IL1R1; SRF; STAT1
Сигнализация нейротрофина/TRK	NTRK2; MAPK1; PTPN11; PIK3CA; CREB1; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; PIK3C2A; RAF1; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; CDC42; JUN; ATF4
Активация FXR/RXR	INS; PPARA; FASN; RXRA; AKT2; SDC1; MAPK8; APOB; MAPK10; PPARG; MTPP; MAPK9; PPARGC1A; TNF; CREBBP; AKT1; SREBF1; FGFR4; AKT3; FOXO1
Долговременная синаптическая потенция	PRKCE; RAPIA; EP300; PRKCZ; MAPK1; CREB1; PRKCI; GNAQ; CAMK2A; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; PPP1CC; RAF1; CREBBP; MAP2K2; MAP2K1; ATF4; PRKCA
Кальциевая сигнализация	RAPIA; EP300; HDAC4; MAPK1; HDAC5; CREB1; CAMK2A; MYH9; MAPK3; HDAC2; HDAC7A; HDAC11; HDAC9; HDAC3; CREBBP; CALR; CAMKK2; ATF4; HDAC6
Сигнализация EGF	ELK1; MAPK1; EGFR; PIK3CA; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; PIK3C2A; RAF1; JAK1; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; JUN; PRKCA; SRF; STAT1
Сигнализация гипоксии в сердечно-сосудистой системе	EDN1; PTEN; EP300; NQO1; UBE2I; CREB1; ARNT; HIF1A; SLC2A4; NOS3; TP53; LDHA; AKT1; ATM; VEGFA; JUN; ATF4; VHL; HSP90AA1
Опосредованное ингибирование функции RXR	IRAK1; MYD88; TRAF6; PPARA; RXRA; ABCA1; MAPK8; ALDH1A1; GSTP1; MAPK9; ABCB1; TRAF2; TLR4; TNF; MAP3K7; NR1H2; SREBF1; JUN; IL1R1
Активация LXR/RXR	FASN; RXRA; NCOR2; ABCA1; NFKB2; IRF3; RELA; NOS2A; TLR4; TNF; RELB; LDLR; NR1H2; NFKB1; SREBF1; IL1R1; CCL2; IL6; MMP9
Процессинг амилоида	PRKCE; CSNK1E; MAPK1; CAPNS1; AKT2; CAPN2; CAPN1; MAPK3; MAPK13; MAPT; MAPK14; AKT1; PSEN1; CSNK1A1; GSK3B; AKT3; APP
Сигнализация IL-4	AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3; IRS1; KRAS; SOCS1; PTPN6; NR3C1; PIK3C2A; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; FRAP1; AKT3; RPS6KB1
Регуляция клеточного цикла: контрольная точка повреждения ДНК в G2/M	EP300; PCAF; BRCA1; GADD45A; PLK1; BTRC; CHEK1; ATR; CHEK2; YWHAZ; TP53; CDKN1A; PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A
Сигнализация оксида азота в сердечно-сосудистой системе	KDR; FLT1; PGF; AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3; CAV1; PRKCD; NOS3; PIK3C2A; AKT1; PIK3R1; VEGFA; AKT3; HSP90AA1
Метаболизм пуринов	NME2; SMARCA4; MYH9; RRM2; ADAR; EIF2AK4; PKM2; ENTPD1; RAD51; RRM2B; TJP2; RAD51C; NT5E; POLD1; NME1
Опосредованная сигнализация cAMP	RAPIA; MAPK1; GNAS; CREB1; CAMK2A; MAPK3; SRC; RAF1; MAP2K2; STAT3; MAP2K1; BRAF; ATF4
Митохондриальная дисфункция	SOD2; MAPK8; CASP8; MAPK10; MAPK9; CASP9; PARK7; PSEN1; PARK2; APP; CASP3
Сигнализация Notch	HES1; JAG1; NUMB; NOTCH4; ADAM17; NOTCH2; PSEN1; NOTCH3; NOTCH1; DLL4
Стресс-путь эндоплазматического	HSPA5; MAPK8; XBP1; TRAF2; ATF6; CASP9; ATF4; EIF2AK3; CASP3

ретикулума	
Метаболизм пиримидинов	NME2; AICDA; RRM2; EIF2AK4; ENTPD1; RRM2B; NT5E; POLD1; NME1
Сигнализация болезни Паркинсона	UCHL1; MAPK8; MAPK13; MAPK14; CASP9; PARK7; PARK2; CASP3
Сердечная и β -адренергическая сигнализация	GNAS; GNAQ; PPP2R1A; GNB2L1; PPP2CA; PPP1CC; PPP2R5C
Гликолиз/глюконеогенез	HK2; GCK; GPI; ALDH1A1; PKM2; LDHA; HK1
Сигнализация интерферона	IRF1; SOCS1; JAK1; JAK2; IFITM1; STAT1; IFIT3
Сигнализация Sonic Hedgehog	ARRB2; SMO; GLI2; DYRK1A; GLI1; GSK3B; DYRK1B
Метаболизм глицерофосфолипидов	PLD1; GRN; GPAM; YWHAZ; SPHK1; SPHK2
Деградация фосфолипидов	PRDX6; PLD1; GRN; YWHAZ; SPHK1; SPHK2
Метаболизм триптофана	SIAH2; PRMT5; NEDD4; ALDH1A1; CYP1B1; SIAH1
Деградация лизина	SUV39H1; EHMT2; NSD1; SETD7; PPP2R5C
Путь эксцизионной репарации нуклеотидов	ERCC5; ERCC4; XPA; XPC; ERCC1
Метаболизм крахмала и сахарозы	UCHL1; HK2; GCK; GPI; HK1
Метаболизм аминсахаров	NQO1; HK2; GCK; HK1
Метаболизм арахидоновой кислоты	PRDX6; GRN; YWHAZ; CYP1B1
Сигнализация циркадного ритма	CSNK1E; CREB1; ATF4; NR1D1
Система свертывания крови	BDKRB1; F2R; SERPINE1; F3
Сигнализация дофаминовых рецепторов	PPP2R1A; PPP2CA; PPP1CC; PPP2R5C
Метаболизм глутатиона	IDH2; GSTP1; ANPEP; IDH1
Метаболизм глицеролипидов	ALDH1A1; GPAM; SPHK1; SPHK2
Метаболизм линолеиновой кислоты	PRDX6; GRN; YWHAZ; CYP1B1
Метаболизм метионина	DNMT1; DNMT3B; AHCY; DNMT3A
Метаболизм пирувата	GLO1; ALDH1A1; PKM2; LDHA
Метаболизм аргинина и пролина	ALDH1A1; NOS3; NOS2A
Эйкозаноидная сигнализация	PRDX6; GRN; YWHAZ
Метаболизм фруктозы и маннозы	HK2; GCK; HK1
Метаболизм галактозы	HK2; GCK; HK1
Биосинтез стильбена, кумарина и лигнина	PRDX6; PRDX1; TYR
Путь презентации антигенов	CALR; B2M
Биосинтез стероидов	NQO1; DHCR7
Метаболизм бутаноата	ALDH1A1; NLGN1
Цикл лимонной кислоты	IDH2; IDH1
Метаболизм жирных кислот	ALDH1A1; CYP1B1
Метаболизм глицерофосфолипидов	PRDX6; CHKA
Метаболизм гистидина	PRMT5; ALDH1A1
Метаболизм инозитола	ERO1L; APEX1
Метаболизм ксенобиотиков у цитохрома p450	GSTP1; CYP1B1
Метаболизм метана	PRDX6; PRDX1
Метаболизм фенилаланина	PRDX6; PRDX1
Метаболизм пропаноата	ALDH1A1; LDHA

Метаболизм селеноаминокислот	PRMT5; AHCY
Метаболизм сфинголипидов	SPHK1; SPHK2
Метаболизм аминифосфонатов	PRMT5
Метаболизм андрогенов и эстрогенов	PRMT5
Метаболизм аскорбата и альдаратов	ALDH1A1
Биосинтез желчных кислот	ALDH1A1
Метаболизм цистеина	LDHA
Биосинтез жирных кислот	FASN
Сигнализация глутаматных рецепторов	GNB2L1
Опосредованная NRF2 реакция на окислительный стресс	PRDX1
Пентозофосфатный путь	GPI
Взаимопревращения пентоз и глюкуроната	UCHL1
Метаболизм ретинола	ALDH1A1
Метаболизм рибофлавина	TYR
Метаболизм тирозина	PRMT5, TYR
Биосинтез убихинона	PRMT5
Деградация валина, лейцина и изолейцина	ALDH1A1
Метаболизм глицина, серина и треонина	CHKA
Деградация лизина	ALDH1A1
Боль/вкус	TRPM5; TRPA1
Боль	TRPM7; TRPC5; TRPC6; TRPC1; Cnr1; cnr2; Grk2; Trpa1; Pomc; Cgrp; Crf; Pka; Era; Nr2b; TRPM5; Prkaca; Prkacb; Prkar1a; Prkar2a
Митохондриальная функция	AIF; CytC; SMAC (Diablo); Aifm-1; Aifm-2
Возрастная неврология	BMP-4; хордин (Chrd); ноггин (Nog); WNT (Wnt2; Wnt2b; Wnt3a; Wnt4; Wnt5a; Wnt6; Wnt7b; Wnt8b; Wnt9a; Wnt9b; Wnt10a; Wnt10b; Wnt16); β -катенин; Dkk-1; белки типа Frizzled; Otx-2; Gbx2; FGF-8; рилин; Dab1; unc-86 (Pou4f1 или Brn3a); Numb; Reln

Полинуклеотидом-мишенью в различных воплощениях приведенных здесь аспектов может быть ДНК или РНК (например, мРНК). Полинуклеотид-мишень может быть одноцепочечным или двухцепочечным. Полинуклеотидом-мишенью может быть геномная ДНК. Полинуклеотидом-мишенью может быть любой полинуклеотид, эндогенный или экзогенный для данной клетки. Например, полинуклеотидом-мишенью может быть полинуклеотид, находящийся в ядре эукариотической клетки. Полинуклеотидом-мишенью может быть последовательность, кодирующая продукт гена (например, белок), или некодирующая последовательность (например, регуляторный полинуклеотид).

Последовательность полинуклеотида-мишени может содержать нуклеиновую кислоту-мишень или последовательность протоспейсера (то есть последовательность, распознаваемую спейсерным участком направляющей нуклеиновой кислоты) длиной примерно в 20 нуклеотидов. Длина протоспейсера может составлять менее 20 нуклеотидов. Длина протоспейсера может составлять по меньшей мере 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 и более нуклеотидов. Длина последовательности протоспейсера может составлять не более 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 и более нуклеотидов. Последовательность протоспейсера может отстоять на 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 основания непосредственно 5' от первого нуклеотида РАМ. Последовательность протоспейсера может отстоять на 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 основания непосредственно 3' от последнего нуклеотида последовательности РАМ. Последовательность протоспейсера может отстоять на 20 оснований непосредственно 5' от первого нуклеотида последовательности РАМ. Последовательность протоспейсера может отстоять на 20 оснований непосредственно 3' от последнего нуклеотида последовательности РАМ. Последовательность нуклеиновой кислоты-мишени может находиться с 5'- или 3'-стороны от РАМ.

Последовательность протоспейсера может включать в себя последовательность нуклеиновой кислоты, присутствующей в полинуклеотиде-мишени, с которой может связываться нацеливающий на нуклеиновую кислоту сегмент направляющей нуклеиновой кислоты. К примеру, последовательность протоспейсера может включать в себя последовательность, с которой направляющая нуклеиновая кислота должна быть комплементарной. Последовательность протоспейсера может содержать любой полинуклеотид, который может находиться, к примеру, в ядре или цитоплазме клетки или внутри органеллы клетки типа митохондрий или хлоропластов. Последовательность протоспейсера может содержать сайты расщепления для Cas-белков. Последовательность протоспейсера может примыкать к сайтам расщепления для Cas-белков.

Cas-белок может связывать полинуклеотид-мишень на сайте в пределах или за пределами последо-

вательности, с которой может связываться нацеливающая на нуклеиновую кислоту последовательность направляющей нуклеиновой кислоты. Участок связывания может включать положение той нуклеиновой кислоты, у которой Cas-белок может образовывать одноцепочечный разрыв или двуцепочечный разрыв.

Сайт-специфичное связывание нуклеиновой кислоты-мишени Cas-белком может происходить в местах, которые определяются комплементарностью спаривания оснований между направляющей нуклеиновой кислотой и нуклеиновой кислотой-мишенью. Сайт-специфичное связывание нуклеиновой кислоты-мишени Cas-белком может происходить в местах, определяемых коротким мотивом, который называют смежным с протоспейсером мотивом (РАМ), в нуклеиновой кислоте-мишени. РАМ может фланкировать протоспейсер, к примеру, на 3'-конце последовательности протоспейсера. Например, сайт связывания Cas9 может быть длиной от 1 до 25 или от 2 до 5 или от 19 до 23 пар оснований (например, 3 пар оснований) вверх или вниз от последовательности РАМ. Сайт связывания Cas (например, Cas9) может быть на 3 пары оснований выше последовательности РАМ. Сайт связывания Cas (например, Cpf1) может составлять 19 оснований на (+)-нити и 23 основания на (-)-нити.

Различные организмы могут содержать разные последовательности РАМ. Различные Cas-белки могут распознавать разные последовательности РАМ. Например, РАМ у *S. pyogenes* может содержать последовательность 5'-XRR-3', где R может означать A или G, а X - любой нуклеотид, причем X находится непосредственно 3' от последовательности нуклеиновой кислоты-мишени, на которую нацелена последовательность спейсера. Последовательность РАМ у Cas9 *S. pyogenes* (SpyCas9) может быть 5'-XGG-3', где X означает любой ДНК-нуклеотид, который находится непосредственно 3' от последовательности протоспейсера некомплементарной нити ДНК-мишени. РАМ Cpf1 может быть 5'-ГТХ-3', где X означает любой ДНК-нуклеотид, который находится непосредственно 3' от последовательности распознавания CRISPR.

Целевая последовательность для направляющей нуклеиновой кислоты может быть идентифицирована методами биоинформатики, к примеру, путем обнаружения последовательностей в последовательности-мишени, смежных с последовательностью РАМ. Оптимальная последовательность-мишень для направляющей нуклеиновой кислоты может быть идентифицирована экспериментальными методами, к примеру, путем тестирования ряда последовательностей направляющих нуклеиновых кислот для идентификации последовательности с наибольшей прицельной активностью и наименьшей неприцельной активностью. Местонахождение последовательности-мишени может определяться требуемым экспериментальным результатом. Например, протоспейсер-мишень может располагаться в промоторе с тем, чтобы активировать или репрессировать целевой ген. Протоспейсер-мишень может находиться в кодирующей последовательности типа 5'-концевого конститутивно экспрессируемого экзона или последовательности, кодирующей известный домен. Протоспейсер-мишень может представлять собой уникальную последовательность в геноме с тем, чтобы уменьшить неприцельные эффекты. Для определения и ранжирования потенциальных протоспейсеров-мишеней в данной области известны и могут применяться многие общедоступные алгоритмы.

В некоторых аспектах раскрыты здесь системы могут регулировать экспрессию по меньшей мере одного гена, связанного с генетическим заболеванием или медицинским состоянием. Широкий спектр генетических заболеваний подробно описан на веб-сайте National Institutes of Health в тематическом подпункте Genetic Disorders (веб-сайт по адресу health.nih.gov/topic/GeneticDisorders).

Как должно быть ясно, предполагается, что рассматриваемые системы могут применяться для нацеливания на любую представляющую интерес последовательность полинуклеотидов. Однако примеры генов не являются исчерпывающими.

В различных воплощениях приведенных здесь аспектов рассматриваемые системы могут применяться для избирательной модуляции (например, снижения или повышения) транскрипции нуклеиновой кислоты-мишени в клетках хозяина (например, в иммунных клетках). Избирательная модуляция транскрипции нуклеиновой кислоты-мишени может понижать или повышать транскрипцию нуклеиновой кислоты-мишени, но не может существенно модулировать транскрипцию нецелевой нуклеиновой кислоты или нуклеиновой кислоты, которая не является мишенью воздействия, например, транскрипция нецелевой нуклеиновой кислоты может модулироваться на менее 1%, менее 5%, менее 10%, менее 20%, менее 30%, менее 40% или менее 50% по сравнению с уровнем транскрипции нецелевой нуклеиновой кислоты в отсутствие исполнительного элемента типа комплекса направляющей нуклеиновой кислоты с ферментативно неактивным или ферментативно ослабленным Cas-белком. К примеру, избирательная модуляция (например, снижение или повышение) транскрипции нуклеиновой кислоты-мишени может понижать или повышать транскрипцию нуклеиновой кислоты-мишени по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или более 90% по сравнению с уровнем транскрипции нуклеиновой кислоты-мишени в отсутствие исполнительного элемента типа комплекса направляющей нуклеиновой кислоты с ферментативно неактивным или ферментативно ослабленным Cas-белком.

В некоторых воплощениях изобретения предусмотрены способы повышения транскрипции нуклеиновой кислоты-мишени. Транскрипция нуклеиновой кислоты-мишени может повышаться по меньшей

мере в 1,1 раз, по меньшей мере в 1,2 раза, по меньшей мере в 1,3 раза, по меньшей мере в 1,4 раза, по меньшей мере в 1,5 раз, по меньшей мере в 1,6 раз, по меньшей мере в 1,7 раз, по меньшей мере в 1,8 раз, по меньшей мере в 1,9 раз, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 2,5 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 3,5 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 4,5 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 12 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 70 раз или по меньшей мере в 100 раз по сравнению с уровнем транскрипции ДНК-мишени в отсутствие исполнительного элемента типа комплекса направляющей нуклеиновой кислоты с ферментативно неактивным или ферментативно ослабленным Cas-белком. При избирательном повышении транскрипции нуклеиновой кислоты-мишени повышается транскрипция нуклеиновой кислоты-мишени, но не может существенно повышаться транскрипция нецелевой ДНК. Например, транскрипция нецелевой нуклеиновой кислоты повышается, если вообще, менее чем в 5 раз, менее чем в 4 раза, менее чем в 3 раза, менее чем в 2 раза, менее чем в 1,8 раза, менее чем в 1,6 раза, менее чем в 1,4 раза, менее чем в 1,2 раза или менее чем в 1,1 раз по сравнению с уровнем транскрипции нецелевой ДНК в отсутствие исполнительного элемента типа комплекса направляющей нуклеиновой кислоты с ферментативно неактивным или ферментативно ослабленным Cas-белком.

В некоторых воплощениях изобретения предусмотрены способы снижения транскрипции нуклеиновой кислоты-мишени. Транскрипция нуклеиновой кислоты-мишени может снижаться по меньшей мере в 1,1 раз, по меньшей мере в 1,2 раза, по меньшей мере в 1,3 раза, по меньшей мере в 1,4 раза, по меньшей мере в 1,5 раз, по меньшей мере в 1,6 раз, по меньшей мере в 1,7 раз, по меньшей мере в 1,8 раз, по меньшей мере в 1,9 раз, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 2,5 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 3,5 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 4,5 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 12 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 70 раз или по меньшей мере в 100 раз по сравнению с уровнем транскрипции ДНК-мишени в отсутствие исполнительного элемента типа комплекса направляющей нуклеиновой кислоты с ферментативно неактивным или ферментативно ослабленным Cas-белком. При избирательном снижении транскрипции нуклеиновой кислоты-мишени снижается транскрипция нуклеиновой кислоты-мишени, но не может существенно снижаться транскрипция нецелевой ДНК, например, транскрипция ненуклеиновой кислоты-мишени снижается, если вообще, менее чем в 5 раз, менее чем в 4 раза, менее чем в 3 раза, менее чем в 2 раза, менее чем в 1,8 раза, менее чем в 1,6 раза, менее чем в 1,4 раза, менее чем в 1,2 раза или менее чем в 1,1 раз по сравнению с уровнем транскрипции нецелевой ДНК в отсутствие исполнительного элемента типа комплекса направляющей нуклеиновой кислоты с ферментативно неактивным или ферментативно ослабленным Cas-белком.

Модуляция транскрипции может осуществляться путем слияния исполнительного элемента типа ферментативно неактивного Cas-белка с гетерологичной последовательностью. Гетерологичной последовательностью может быть подходящий партнер по слиянию, например, полипептид, который обеспечивает активность, которая косвенным образом повышает, снижает или иным образом модулирует транскрипцию, действуя непосредственно на нуклеиновую кислоту-мишени или на полипептид (например, гистон или другой ДНК-связывающий белок), связанный с нуклеиновой кислотой-мишенью. Неограниченные примеры подходящих партнеров по слиянию включают полипептиды, которые обеспечивают метилтрансферазную активность, деметилазную активность, ацетилтрансферазную активность, деацетилазную активность, киназную активность, фосфатазную активность, убиквитин-лигазную активность, активность деубиквитинирования, активность аденилирования, активность деаденилирования, активность SUMO-илирования, активность де-SUMO-илирования, активность рибозилирования, активность дерибозилирования, активность миристоилирования или активность демиристоилирования.

Подходящий партнер по слиянию может включать в себя полипептид, который непосредственно обеспечивает повышение транскрипции нуклеиновой кислоты-мишени. Например, активатор транскрипции или его фрагмент, белок или его фрагмент, который рекрутирует активатор транскрипции, или реагирующий на небольшие молекулы или лекарства регулятор транскрипции. Подходящий партнер по слиянию может включать в себя полипептид, который непосредственно обеспечивает снижение транскрипции нуклеиновой кислоты-мишени. Например, репрессор транскрипции или его фрагмент, белок или его фрагмент, который рекрутирует репрессор транскрипции, или реагирующий на небольшие молекулы или лекарства регулятор транскрипции.

Гетерологичная последовательность или партнер по слиянию может быть слит с С-концом, N-концом или внутренней частью (то есть другой частью, чем N- или С-конец) исполнительного элемента, к примеру, мертвого Cas-белка. Неограниченные примеры партнеров по слиянию включают активаторы транскрипции, репрессоры транскрипции, гистон-лизинметилтрансферазы (КМТ), гистон-лизиндеметилазы, гистон-лизинацетилтрансферазы (КАТ), гистон-лизиндеацетилазы, ДНК-метилазы (модифицируют аденозин или цитозин), CTCF, периферийные рекрутинг-элементы (например, ламин А, ламин В) и докинг-элементы белков (например, FKBP/FRB).

Неограниченные примеры активаторов транскрипции включают GAL4, VP16, VP64 и субдомен

p65 (NF-κB).

Неограничительные примеры репрессоров транскрипции включают Krüppel-associated box (KRAB или SKD), домен взаимодействия Mad-mSIN3 (SID) и репрессорный домен ERF (ERD).

Неограничительные примеры гистон-лизинметилтрансфераз (KMT) включают представителей семейства KMT1 (например, SUV39H1, SUV39H2, G9A, ESET/SETDB1, Ctr4, Su(var)3-9), представителей семейства KMT2 (например, hSET1A, hSET1B, MLL1-MLL5, ASH1 и гомологи (Trx, Trg, Ash1)), семейства KMT3 (SYMD2, NSD1), KMT4 (DOT1L и гомологи), семейства KMT5 (Pr-SET7/8, SUV4-20H1 и гомологи), KMT6 (EZH2) и KMT8 (например, RIZ1).

Неограничительные примеры гистон-лизиндеметилаз (KDM) включают представителей семейства KDM1 (LSD1/BHC110, Splsd1/Swm1/Saf110, Su(var)3-3), семейства KDM3 (JHDM2a/b), семейства KDM4 (JMJD2A/JHDM3A, JMJD2B, JMJD2C/GASC1, JMJD2D и гомологи (Rph1)), семейства KDM5 (JARID1A/RBP2, JARID1B/PLU-1, JARID1C/SMCX, JARID1D/SMCY и гомологи (Lid, Jhn2, Jmj2)) и семейства KDM6 (например, UTX, JMJD3).

Неограничительные примеры KAT включают представителей семейства KAT2 (hGCN5, PCAF и гомологи (dGCN5/PCAF, Gcn5)), семейства KAT3 (CBP, p300 и гомологи (dCBP/NEJ)), KAT4, KAT5, KAT6, KAT7, KAT8 и KAT13.

В некоторых воплощениях исполнительный элемент, содержащий мертвый Cas-белок или мертвый слитый Cas-белок, направляется направляющей нуклеиновой кислотой в определенное место (т.е. последовательность) в нуклеиновой кислоте-мишени и осуществляет locus-специфичную регуляцию типа блокирования связывания РНК-полимеразы с промотором (например, это может избирательно ингибировать функцию активатора транскрипции) и/или модификации местного статуса хроматина (например, при использовании слитой последовательности, которая может модифицировать нуклеиновую кислоту-мишень или модифицировать полипептид, связанный с нуклеиновой кислотой-мишенью). В некоторых случаях эти изменения являются кратковременными (например, подавление транскрипции или активация). В некоторых случаях эти изменения наследуются (например, при проведении эпигенетических модификаций в ДНК-мишени или в белках, связанных с ДНК-мишенью, например, нуклеосомных гистонах).

В некоторых воплощениях направляющая нуклеиновая кислота может содержать белок-связывающий сегмент для рекрутинга гетерологичного полипептида к нуклеиновой кислоте-мишени для модуляции транскрипции нуклеиновой кислоты-мишени. Неограничительные примеры гетерологичных полипептидов включают полипептиды, которые обеспечивают метилтрансферазную активность, деметилазную активность, ацетилтрансферазную активность, деацетилазную активность, киназную активность, фосфатазную активность, убиквитин-лигазную активность, активность деубиквитинирования, активность аденилирования, активность деаденилирования, активность SUMO-илирования, активность де-SUMO-илирования, активность рибозилирования, активность дерибозилирования, активность миристоилирования или активность демиристоилирования. Направляющая нуклеиновая кислота может содержать белок-связывающий сегмент для рекрутинга активатора транскрипции, репрессора транскрипции или их фрагментов.

В некоторых воплощениях модуляция экспрессии гена достигается при помощи направляющей нуклеиновой кислоты, служащей для наводки на регуляторный элемент нуклеиновой кислоты-мишени, к примеру, транскрипционный элемент отклика (например, промоторы, энхансеры), вышележащие активирующие последовательности (UAS) и/или последовательности с неизвестной или известной функцией, которые предположительно способны контролировать экспрессию целевой ДНК.

В различных воплощениях приведенных здесь аспектов изобретения предусмотрена направляющая нуклеиновая кислота. Направляющая нуклеиновая кислота (например, направляющая РНК) может связываться с Cas-белком и направлять Cas-белок в определенное место в пределах полинуклеотида-мишени. Направляющая нуклеиновая кислота может содержать сегмент, нацеливающий на нуклеиновую кислоту, и сегмент связывания Cas-белка.

Направляющая нуклеиновая кислота может означать такую нуклеиновую кислоту, которая может гибридизироваться с другой нуклеиновой кислотой, например, полинуклеотидом-мишенью в геноме клетки. Направляющей нуклеиновой кислотой может быть РНК, к примеру, направляющая РНК. Направляющей нуклеиновой кислотой может быть ДНК. Направляющая нуклеиновая кислота может содержать ДНК и РНК. Направляющая нуклеиновая кислота может быть одноцепочечной. Направляющая нуклеиновая кислота может быть двухцепочечной. Направляющая нуклеиновая кислота может содержать аналоги нуклеотидов. Направляющая нуклеиновая кислота может содержать модифицированные нуклеотиды. Направляющая нуклеиновая кислота может быть запрограммирована или составлена для сайт-специфичного связывания с последовательностью нуклеиновой кислоты.

Направляющая нуклеиновая кислота может содержать одну или несколько модификаций для придания нуклеиновой кислоте новых или улучшенных характеристик. Направляющая нуклеиновая кислота может содержать аффинную метку нуклеиновой кислоты. Направляющая нуклеиновая кислота может содержать синтетические нуклеотиды, синтетические аналоги нуклеотидов, производные нуклеотидов и/или модифицированные нуклеотиды.

Направляющая нуклеиновая кислота может содержать нацеливающий на нуклеиновую кислоту участок (например, спейсерный участок), к примеру, на или возле 5'-конца или 3'-конца, который комплементарен последовательности протоспейсера в полинуклеотиде-мишени. Спейсер направляющей нуклеиновой кислоты может взаимодействовать с протоспейсером специфичным для последовательности образом посредством гибридизации (то есть спаривания оснований). Последовательность протоспейсера может располагаться с 5'- или 3'-стороны от смежного с протоспейсером мотива (РАМ) в полинуклеотиде-мишени. Нуклеотидная последовательность спейсерного участка может варьироваться и определяет то место в нуклеиновой кислоте-мишени, с которым может взаимодействовать направляющая нуклеиновая кислота. Спейсерный участок направляющей нуклеиновой кислоты можно составить или модифицировать так, чтобы он гибридизировался с любой желательной последовательностью в нуклеиновой кислоте-мишени.

Направляющая нуклеиновая кислота может содержать две отдельные молекулы нуклеиновой кислоты, что можно назвать двойной направляющей нуклеиновой кислотой. Направляющая нуклеиновая кислота может содержать одну молекулу нуклеиновой кислоты, что можно назвать одинарной направляющей нуклеиновой кислотой (например, sg-РНК). В некоторых воплощениях направляющая нуклеиновая кислота является одинарной направляющей нуклеиновой кислотой, содержащей слитую РНК CRISPR (cr-РНК) и транскрибируемую cr-РНК (tracr-РНК). В некоторых воплощениях направляющая нуклеиновая кислота представлена одиночной направляющей нуклеиновой кислотой, содержащей cr-РНК. В некоторых воплощениях направляющая нуклеиновая кислота представлена одиночной направляющей нуклеиновой кислотой, содержащей cr-РНК, но не содержащей tracr-РНК. В некоторых воплощениях направляющая нуклеиновая кислота представлена двойной направляющей нуклеиновой кислотой, содержащей неслитые cr-РНК и tracr-РНК. Типичная двойная направляющая нуклеиновая кислота может содержать молекулу типа cr-РНК и молекулу типа tracr-РНК. Типичная одиночная направляющая нуклеиновая кислота может содержать молекулу типа cr-РНК. Типичная одиночная направляющая нуклеиновая кислота может содержать слитые молекулы типа cr-РНК и типа tracr-РНК.

cr-РНК может содержать нацеливающий на нуклеиновую кислоту сегмент (например, спейсерный участок) направляющей нуклеиновой кислоты и цепочку нуклеотидов, которая может составлять половину двухцепочечного дуплекса связывающего Cas-белок сегмента направляющей нуклеиновой кислоты.

tracr-РНК может содержать цепочку нуклеотидов, которая составляет вторую половину двухцепочечного дуплекса связывающего Cas-белок сегмента gРНК. Цепочка нуклеотидов cr-РНК может быть комплементарна и может гибридизоваться с цепочкой нуклеотидов tracr-РНК с образованием двухцепочечного дуплекса связывающего Cas-белок сегмента направляющей нуклеиновой кислоты.

cr-РНК и tracr-РНК могут гибридизоваться с образованием направляющей нуклеиновой кислоты. cr-РНК также может обеспечивать одноцепочечный нацеливающий на нуклеиновую кислоту сегмент (например, спейсерный участок), который гибридизуется с распознавательной последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени (например, протоспейсера). Последовательность cr-РНК, включая спейсерный участок, или молекулу tracr-РНК можно составить так, чтобы она была специфичной для того вида, у которого будет использоваться направляющая нуклеиновая кислота.

В некоторых воплощениях нацеливающий на нуклеиновую кислоту участок направляющей нуклеиновой кислоты может составлять от 18 до 72 нуклеотидов в длину. Нацеливающий на нуклеиновую кислоту участок направляющей нуклеиновой кислоты (например, спейсерный участок) может иметь в длину от 12 нуклеотидов до 100 нуклеотидов. Например, нацеливающий на нуклеиновую кислоту участок направляющей нуклеиновой кислоты (например, спейсерный участок) может иметь в длину от 12 нуклеотидов (нт) до 80 нт, от 12 до 50 нт, от 12 до 40 нт, от 12 нт до 30 нт, от 12 нт до 25 нт, от 12 нт до 20 нт, от 12 нт до 19 нт, от 12 нт до 18 нт, от 12 нт до 17 нт, от 12 нт до 16 нт или от 12 нт до 15 нт. С другой стороны, нацеливающий на ДНК участок может иметь в длину от 18 до 20 нт, от 18 до 25 нт, от 18 до 30 нт, от 18 до 35 нт, от 18 до 40 нт, от 18 до 45 нт, от 18 до 50 нт, от 18 до 60 нт, от 18 до 70 нт, от 18 до 80 нт, от 18 до 90 нт, от 18 до 100 нт, от 20 до 25 нт, от 20 до 30 нт, от 20 до 35 нт, от 20 до 40 нт, от 20 до 45 нт, от 20 до 50 нт, от 20 до 60 нт, от 20 до 70 нт, от 20 до 80 нт, от 20 до 90 нт или от 20 до 100 нт. Длина нацеливающего на нуклеиновую кислоту участка может составлять по меньшей мере 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 и более нуклеотидов. Длина нацеливающего на нуклеиновую кислоту участка (например, спейсерной последовательности) может составлять не более 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 и более нуклеотидов.

В некоторых воплощениях нацеливающий на нуклеиновую кислоту участок направляющей нуклеиновой кислоты (например, спейсер) составляет 20 нуклеотидов в длину. В некоторых воплощениях нацеливающий на нуклеиновую кислоту участок направляющей нуклеиновой кислоты составляет 19 нуклеотидов в длину. В некоторых воплощениях нацеливающий на нуклеиновую кислоту участок направляющей нуклеиновой кислоты составляет 18 нуклеотидов в длину. В некоторых воплощениях нацеливающий на нуклеиновую кислоту участок направляющей нуклеиновой кислоты составляет 17 нуклеотидов в длину. В некоторых воплощениях нацеливающий на нуклеиновую кислоту участок направляющей нуклеиновой кислоты составляет 16 нуклеотидов в длину. В некоторых воплощениях нацеливающий на нуклеиновую кислоту участок направляющей нуклеиновой кислоты составляет 21 нуклеотид в

длину. В некоторых воплощениях нацеливающий на нуклеиновую кислоту участок направляющей нуклеиновой кислоты составляет 22 нуклеотида в длину.

Нуклеотидная последовательность направляющей нуклеиновой кислоты, которая комплементарна нуклеотидной последовательности (целевой последовательности) нуклеиновой кислоты-мишени, может иметь в длину, к примеру, по меньшей мере 12 нт, по меньшей мере 15 нт, по меньшей мере 18 нт, по меньшей мере 20 нт, по меньшей мере 25 нт, по меньшей мере 30 нт, по меньшей мере 35 нт или по меньшей мере 40 нт. Нуклеотидная последовательность направляющей нуклеиновой кислоты, которая комплементарна нуклеотидной последовательности (целевой последовательности) нуклеиновой кислоты-мишени, может иметь в длину от 12 нуклеотидов (нт) до 80 нт, от 12 до 50 нт, от 12 до 45 нт, от 12 до 40 нт, от 12 до 35 нт, от 12 до 30 нт, от 12 до 25 нт, от 12 до 20 нт, от 12 до 19 нт, от 19 до 20 нт, от 19 до 25 нт, от 19 до 30 нт, от 19 до 35 нт, от 19 до 40 нт, от 19 до 45 нт, от 19 до 50 нт, от 19 до 60 нт, от 20 до 25 нт, от 20 до 30 нт, от 20 до 35 нт, от 20 до 40 нт, от 20 до 45 нт, от 20 до 50 нт или от 20 до 60 нт.

Последовательность протоспейсера может быть идентифицирована путем идентификации РАМ в представляющем интерес участке и выбора участка требуемого размера выше или ниже от РАМ в качестве протоспейсера. Соответствующая последовательность спейсера может быть составлена путем определения комплементарной последовательности протоспейсерного участка.

Последовательность спейсера может быть идентифицирована с помощью компьютерной программы (например, машиночитаемого кода). Компьютерная программа может использовать такие переменные, как прогнозируемая температура плавления, образование вторичной структуры и прогнозируемая температура отжига, идентичность последовательности, геномный контекст, доступность хроматина, % GC, частота появления в геноме, статус метилирования, наличие SNP и т.д.

Степень комплементарности между нацеливающей на нуклеиновую кислоту последовательностью (например, спейсерной последовательностью) и нуклеиновой кислотой-мишенью (например, протоспейсером) может составлять по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%. Степень комплементарности между нацеливающей на нуклеиновую кислоту последовательностью и нуклеиновой кислотой-мишенью может составлять по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% на протяжении примерно 20 смежных нуклеотидов.

Связывающий Cas-белок сегмент направляющей нуклеиновой кислоты может содержать две цепочки нуклеотидов (например, cr-РНК и tracr-РНК), комплементарные друг другу. Две цепочки нуклеотидов (например, cr-РНК и tracr-РНК), которые комплементарны друг другу, могут ковалентно соединяться промежуточными нуклеотидами (например, линкером в случае одной направляющей нуклеиновой кислоты). Две цепочки нуклеотидов (например, cr-РНК и tracr-РНК), которые комплементарны друг другу, могут гибридизоваться с образованием двухцепочечного дуплекса или шпильки РНК связывающего Cas-белок сегмента, при этом образуется структура типа "стебель и петля". cr-РНК и tracr-РНК могут ковалентно соединяться через 3'-конец cr-РНК и 5'-конец tracr-РНК. С другой стороны, tracr-РНК и cr-РНК могут ковалентно соединяться через 5'-конец tracr-РНК и 3'-конец cr-РНК.

Связывающий Cas-белок сегмент направляющей нуклеиновой кислоты может иметь в длину от 10 нуклеотидов до 100 нуклеотидов, например, от 10 нуклеотидов (нт) до 20 нт, от 20 до 30 нт, от 30 до 40 нт, от 40 до 50 нт, от 50 до 60 нт, от 60 до 70 нт, от 70 до 80 нт, от 80 до 90 нт или от 90 до 100 нт. Например, связывающий Cas-белок сегмент направляющей нуклеиновой кислоты может иметь длину от 15 нуклеотидов (нт) до 80 нт, от 15 до 50 нт, от 15 до 40 нт, от 15 до 30 нт или от 15 до 25 нт.

Дуплекс дцРНК связывающего Cas-белок сегмента направляющей нуклеиновой кислоты может иметь в длину от 6 пар оснований (п.о.) до 50 п.о. Например, дуплекс дцРНК связывающего Cas-белок сегмента может иметь длину от 6 до 40 п.о., от 6 п.о. до 30 п.о., от 6 до 25 п.о., от 6 до 20 п.о., от 6 до 15 п.о., от 8 до 40 п.о., от 8 до 30 п.о., от 8 до 25 п.о., от 8 до 20 п.о. или от 8 до 15 п.о. Например, дуплекс дцРНК связывающего Cas-белок сегмента может иметь длину от 8 до 10 п.о., от 10 до 15 п.о., от 15 до 18 п.о., от 18 до 20 п.о., от 20 до 25 п.о., от 25 до 30 п.о., от 30 до 35 п.о., от 35 до 40 п.о. или от 40 до 50 п.о. В некоторых воплощениях дуплекс дцРНК связывающего Cas-белок сегмента может иметь длину в 36 пар оснований.

Степень комплементарности между нуклеотидными последовательностями, которые гибридизуются с образованием дуплекса дцРНК связывающего Cas-белок сегмента, может составлять по меньшей мере 60%. Например, степень комплементарности между нуклеотидными последовательностями, которые гибридизуются с образованием дуплекса дцРНК связывающего Cas-белок сегмента, может составлять по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%. В некоторых случаях степень комплементарности между нуклеотидными последовательностями, которые гибридизуются с образованием дуплекса дцРНК связывающего Cas-белок сегмента, составляет 100%.

Линкер (например, связывающий cr-РНК и tracr-РНК в одной направляющей нуклеиновой кислоте)

может иметь длину от 3 нуклеотидов до 100 нуклеотидов. Например, линкер может иметь длину от 3 нуклеотидов (нт) до 90 нт, от 3 до 80 нт, от 3 до 70 нт, от 3 до 60 нт, от 3 до 50 нт, от 3 до 40 нт, от 3 до 30 нт, от 3 до 20 нт или от 3 до 10 нт. Например, линкер может иметь длину от 3 до 5 нт, от 5 до 10 нт, от 10 до 15 нт, от 15 до 20 нт, от 20 до 25 нт, от 25 до 30 нт, от 30 до 35 нт, от 35 до 40 нт, от 40 до 50 нт, от 50 до 60 нт, от 60 до 70 нт, от 70 до 80 нт, от 80 до 90 нт или от 90 до 100 нт. В некоторых воплощениях линкер нацеливающей на ДНК РНК составляет 4 нт.

Направляющие нуклеиновые кислоты могут содержать модификации или последовательности, которые обеспечивают дополнительные желательные характеристики (например, модифицированную или регулируемую устойчивость, внутриклеточный таргетинг, отслеживание по флуоресцентной метке, сайты связывания для белков или белковых комплексов и т.п.). Примеры таких модификаций включают, к примеру, 5'-кэп (например, 7-метилгуанилатный кэп (m7G)); 3'-полиаденилированный хвост (т.е. хвост 3'-поли(А)); последовательность рибопереклювателя (например, для обеспечения регулируемой устойчивости и/или регулируемой доступности для белков и/или белковых комплексов); последовательность контроля устойчивости; последовательность, которая образует дуплекс дцРНК (т.е. шпильку); модификации или последовательности, которые направляют РНК во внутриклеточную локализацию (например, в ядро, митохондрии, хлоропласты и т.п.); модификации или последовательности, которые обеспечивают отслеживание (например, прямое конъюгирование с флуоресцентной молекулой, конъюгирование с молекулой, которая облегчает флуоресцентное детектирование, с последовательностью, которая способствует флуоресцентному детектированию и т.д.); модификации или последовательности, которые обеспечивают сайты связывания для белков (например, белков, которые действуют на ДНК, включая активаторы транскрипции, репрессоры транскрипции, ДНК-метилтрансферазы, ДНК-деметилазы, гистонацетилтрансферазы, гистондеацетилазы и их комбинации).

Направляющая нуклеиновая кислота может содержать одну или несколько модификаций (например, модификации оснований, модификации остова), чтобы придать нуклеиновой кислоте новые или улучшенные характеристики (например, большую устойчивость). Направляющая нуклеиновая кислота может содержать аффинную метку нуклеиновой кислоты. Нуклеозид - это сочетание основания и сахара. Основанием у нуклеозида может быть гетероциклическое основание. Два самых распространенных класса таких гетероциклических оснований - пурины и пиримидины. Нуклеотиды - это нуклеозиды, которые дополнительно содержат фосфатную группу, ковалентно связанную с сахарной частью нуклеозида. Для тех нуклеозидов, которые содержат пентофуранозильный сахар, фосфатная группа может соединяться с 2'-, 3'- или 5'-гидроксильной группой сахара. При формировании направляющих нуклеиновых кислот фосфатные группы могут ковалентно связывать соседние нуклеозиды друг с другом с образованием линейного полимерного соединения. В свою очередь, соответствующие концы этого линейного полимерного соединения могут дополнительно соединяться с образованием циклического соединения; однако обычно подходят линейные соединения. Кроме того, линейные соединения могут содержать внутренние комплементарные пары нуклеотидов, поэтому они могут укладываться таким образом, чтобы получился полностью или частично двухцепочечное соединение. У направляющих нуклеиновых кислот фосфатные группы обычно составляют межнуклеозидный остов направляющей нуклеиновой кислоты. Связи у остова направляющей нуклеиновой кислоты могут представлять собой 3'-5'-фосфодиэфирную связь.

Направляющая нуклеиновая кислота может содержать модифицированный остов и/или модифицированные межнуклеозидные связи. Модифицированные остовы могут включать в себя такие, у которых сохраняются атомы фосфора в остове, и такие, у которых нет атомов фосфора в остове.

Подходящие модифицированные остовы направляющих нуклеиновых кислот, содержащие атомы фосфора, могут включать, к примеру, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминокилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты типа 3'-алкиленфосфонатов и 5'-алкиленфосфонатов, хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, в том числе 3'-аминофосфорамидаты и аминокилфосфорамидаты, фосфородиамиидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры, селенофосфаты и боронофосфаты с нормальными 3'-5'-связями, аналоги с 2'-5'-связями и таковые с инвертированной полярностью, у которых одна или несколько межнуклеотидных связей представлены 3'-3'-, 5'-5'- и 2'-2'-связями. Подходящие направляющие нуклеиновые кислоты с инвертированной полярностью могут содержать одну 3'-3'-связь на самой 3'-концевой межнуклеотидной связи (т.е. один инвертированный остаток нуклеозида, в котором отсутствует основание нуклеозида или вместо него содержится гидроксильная группа). Также сюда входят различные соли (например, хлорида калия или хлорида натрия), смешанные соли и формы свободной кислоты.

Направляющая нуклеиновая кислота может содержать одну или несколько фосфоротиоатных и/или гетероатомных межнуклеотидных связей, в частности $-\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)\text{-O-CH}_2-$ (т.е. это метиленовый (метиляминный) остов или MMI), $-\text{CH}_2\text{-O-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)\text{-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2-$ и $-\text{O-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$ (при этом нативная фосфодиэфирная межнуклеотидная связь изображается как $-\text{O-P}(=\text{O})(\text{OH})\text{-O-CH}_2-$).

Направляющая нуклеиновая кислота может содержать морфолиновую (morpholino) структуру в остове. Например, нуклеиновая кислота может содержать 6-членное морфолиновое кольцо вместо кольца

рибозы. В некоторых из этих воплощений фосфородиамидатная или другая нефосфодиэфирная межнуклеозидная связь заменяет фосфодиэфирную связь.

Направляющая нуклеиновая кислота может содержать полинуклеотидный остов, который образован связями между короткоцепочечными алкил- или циклоалкилнуклеозидами, между смешанными гетероатомными и алкил- или циклоалкилнуклеозидами или одной или несколькими связями между короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими нуклеозидами. К таковым можно отнести морфолиновые остовы (частично образованные из сахарной части нуклеозидов); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленаформацетильные и метилентиоформацетильные остовы; рибоацетильные остовы; алкеносодержащие остовы; сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленигидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы; и другие, имеющие смешанные составные части N, O, S и CH₂.

Направляющая нуклеиновая кислота может содержать миметик нуклеиновой кислоты. Термин "миметик" служит для обозначения таких полинуклеотидов, у которых только фуранозное кольцо либо и фуранозное кольцо, и межнуклеотидная связь заменены на нефуранозные группы, причем замена только фуранозного кольца также может называться сахарным суррогатом. Гетероциклические основания нуклеотидов или модифицированные гетероциклические основания нуклеотидов могут сохраняться для гибридизации с подходящей нуклеиновой кислотой-мишенью. Одной из таких нуклеиновых кислот может быть пептидная нуклеиновая кислота (PNA). У PNA сахарный остов полинуклеотида может быть заменен на амидосодержащий остов, в частности, на аминоэтилглициновый остов. Нуклеотиды могут сохраняться и связываться прямо или косвенно с атомами азота в амидной части остова. У соединений PNA остов может содержать два или несколько соединенных аминоэтилглициновых звеньев, что даёт PNA амидосодержащий остов. Гетероциклические основания нуклеотидов могут прямо или косвенно связываться с атомами азота в амидной части остова.

Направляющая нуклеиновая кислота может содержать соединенные морфолиновые звенья (т.е. это морфолинонуклеиновая кислота) с гетероциклическими основаниями, присоединенными к морфолиновому кольцу. Соединительные группы могут связывать морфолиновые мономерные звенья в морфолинонуклеиновой кислоте. Неионные олигомерные соединения на основе морфолинов могут иметь меньше нежелательных взаимодействий с клеточными белками. Полинуклеотиды на основе морфолинов могут быть неионными миметиками направляющих нуклеиновых кислот. Различные соединения в пределах класса морфолинов могут соединяться с помощью различных соединительных групп. Следующий класс полинуклеотидных миметиков можно обозначить как циклогексенилнуклеиновые кислоты (CeNA). Фуранозное кольцо, обычно присутствующее в молекуле нуклеиновой кислоты, может быть заменено циклогексенильным кольцом. Можно получить защищенные DMT фосфорамидитные мономеры CeNA и использовать их для синтеза олигомерных соединений методами химии фосфорамидитов. Включение мономеров CeNA в цепь нуклеиновой кислоты может повысить стабильность гибридов ДНК/РНК. Олигоаденилаты CeNA могут образовывать комплексы с комплементарными нуклеиновыми кислотами с такой же стабильностью, как у нативных комплексов. Следующая модификация может включать блокированные нуклеиновые кислоты (LNAs), у которых 2'-гидроксильная группа соединяется с 4'-атомом углерода в сахарном кольце, при этом образуется 2'-С,4'-С-оксиметиленовая связь, причем образуется бициклическая молекула сахара. Связывание может представлять собой метиленовую (-CH₂-) группу, соединяющую 2'-атом кислорода и 4'-атом углерода, где n равно 1 или 2. LNA и аналоги LNA могут проявлять очень высокую термостабильность дуплекса с комплементарной нуклеиновой кислотой (T_m от +3 до +10°C), устойчивость к деградации 3'-экзонуклеазами и хорошие свойства растворимости.

Направляющая нуклеиновая кислота может содержать одну или несколько замещенных молекул сахара. Подходящие полинуклеотиды могут содержать заместители для Сахаров, выбранные из: OH; F; O-, S- или N-алкила; O-, S- или N-алкенила; O-, S- или N-алкинила; либо O-алкил-O-алкила, причем алкил, алкенил или алкинил может представлять собой замещенный или незамещенный C₁-C₁₀-алкил или C₂-C₁₀-алкенил или алкинил. Особенно подходят O((CH₂)_nO)_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ и O(CH₂)_nON((CH₂)_nCH₃)₂, где n и m равны от 1 до 10. Заместитель для сахара может быть выбран из низшего C₁-C₁₀-алкила, замещенного низшего алкила, алкенила, алкинила, алкарила, аралкила, O-алкарила или O-аралкила, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкила, гетероциклоалкарила, аминоалкиламино, полиалкиламино, замещенного силила, расщепляющей РНК группы, репортерной группы, интеркалятора, группы для улучшения фармакокинетических свойств направляющей нуклеиновой кислоты или группы для улучшения фармакодинамических свойств направляющей нуклеиновой кислоты и других заместителей, имеющих близкие свойства. Подходящая модификация может включать 2'-метоксиэтокси (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, также известна как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ, т.е. это алкоксиалкоксигруппа). Другие подходящие модификации могут включать 2'-диметиламинооксэтокси (т.е. это группа O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, также известна как 2'-DMAOE) и 2'-диметиламиноэтоксэтокси (также известна как 2'-O-диметиламиноэтоксэтил или 2'-DMAEOE), т.е. это 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂.

Другие подходящие заместители для сахаров включают метокси (-O-CH₃), аминпропокси

(-OCH₂CH₂CH₂NH₂), аллил (-CH₂-CH=CH₂), -О-аллил (-O-CH₂-CH=CH₂) и фтор (F). Заместители для 2'-сахаров могут находиться в положении арабинозы (вверху) или рибозы (внизу). Подходящая 2'-арабинозная модификация - 2'-F. Аналогичные модификации могут проводиться и по другим положениям в олигомерных соединениях, в частности, в 3'-положении сахара у 3'-концевого нуклеотида или у 2'-5'-связанных нуклеотидов и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. Олигомерные соединения также могут содержать миметики сахаров типа циклобутиловых вместо пентофуранозильных сахаров.

Направляющая нуклеиновая кислота также может включать модификации или замены нуклеиновых оснований (которые часто называют просто "основаниями"). В настоящем изобретении "немодифицированные" или "природные" нуклеотиды могут включать в себя пуриновые основания (например, аденин (A) и гуанин (G)) и пиримидиновые основания (например, тимин (T), цитозин (C) и урацил (U)). Модифицированные нуклеиновые основания могут включать и другие синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил- и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил- и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галоурацил и 5-галоцитозин, 5-пропинил- (-C≡C-CH₃) урацил и цитозин и другие алкильные производные пиримидиновых оснований, 6-азо-урацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-гало, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-гало, в частности 5-бром, 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 2-F-аденин, 2-аминоаденин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-дезааденин, 3-деазагуанин и 3-дезааденин. Модифицированные нуклеиновые основания могут включать такие трициклические пиримидины, как феноксазин-цитидин (1H-пиримида(5,4-b)(1,4)бензоксазин-2(3H)-он), фенотиазин-цитидин (1H-пиримида(5,4-b)(1,4)бензотиазин-2(3H)-он), такие "струбицины", как замещенный феноксазин-цитидин (например, 9-(2-аминоэтоксид)-H-пиримида(5,4-b)(1,4)бензоксазин-2(3H)-он), карбазол-цитидин (2H-пиримида(4,5-b)индол-2-он), пиридоиндол-цитидин (H-пиридо(3',2':4,5)пирроло(2,3-d)пиримидин-2-он).

Гетероциклические основания нуклеотидов могут включать такие, у которых пуриновое или пиримидиновое основание заменено на другой гетероцикл, к примеру, 7-дезааденин, 7-дезагуанозин, 2-аминопиридин или 2-пиридон. Нуклеиновые основания могут быть полезны для повышения сродства связывания полинуклеотидных соединений. Они могут включать 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6-замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Замены на 5-метилцитозин могут повысить стабильность дуплекса нуклеиновой кислоты на 0,6-1,2°C и могут быть подходящими заменами оснований (например, в сочетании с модификацией сахаров 2'-О-метоксиэтилом).

Модификация направляющей нуклеиновой кислоты может включать химическое присоединение к направляющей нуклеиновой кислоте одной или нескольких молекул или конъюгатов, которые могут усиливать активность, клеточное распределение или клеточное поглощение направляющей нуклеиновой кислоты. Эти молекулы или конъюгаты могут включать конъюгатные группы, ковалентно связанные с такими функциональными группами, как первичные или вторичные гидроксильные группы. Конъюгатные группы могут включать, без ограничения, интеркаляторы, репортерные молекулы, полиамины, полиамиды, полиэтиленгликоли, полиэфиры, группы, которые усиливают фармакодинамические свойства олигомеров, и группы, которые могут усиливать фармакокинетические свойства олигомеров. Конъюгатные группы могут включать, без ограничения, холестерин, липиды, фосфолипиды, биотин, феназин, фолат, фенантридин, антрахинон, акридин, флуоресцеины, родамины, кумарины и красители. Группы, которые усиливают фармакодинамические свойства, включают группы, которые улучшают поглощение (захват), повышают устойчивость к деградации и/или усиливают специфичную к последовательности гибридизацию с нуклеиновой кислотой-мишенью. Группы, которые могут усиливать фармакокинетические свойства, включают группы, которые улучшают поглощение (захват), распределение, метаболизм или выведение нуклеиновой кислоты. Конъюгатные молекулы могут включать, без ограничения, молекулы липидов типа холестерина, тиоэфиры (например, гексил-S-трилтиол) хлестероидной кислоты, тиохолестерин, алифатические цепи (например, додекадиол или ундецильные остатки), фосфолипиды (например, дигексадецил-гас-глицерин или триэтиламмоний-1,2-ди-О-гексадецил-гас-глицеро-3-Н-фосфонат), цепи полиаминов или полиэтиленгликолев или адамантануксусной кислоты, пальмитиловые молекулы или молекулы октадециламина или гексиламинокарбонил-оксихолестерина.

Модификация может включать "домен трансдукции белка" или РТД (т.е. это проникающий в клетки пептид (СРР)). РТД может означать полипептид, полинуклеотид, углевод либо органическое или неорганическое соединение, которое способствует пересечению липидного бислоя, мицелл, клеточных мембран, мембран органелл или мембран пузырьков. РТД может присоединяться к другой молекуле, которая может варьироваться от небольшой полярной молекулы до большой макромолекулы и/или наночастицы и может способствовать пересечению молекулой мембраны, к примеру, переходу из внеклеточного пространства во внутриклеточное пространство либо из цитозоля внутрь органеллы. РТД может быть ковалентно связан с N-концом полипептида. РТД может быть ковалентно связан с C-концом полипептида. РТД может быть ковалентно связан с нуклеиновой кислотой. Типичные РТД могут включать,

без ограничения, минимальный пептид домена трансдукции белка; полиаргининовую последовательность, содержащую ряд аргининов, достаточных для проникновения в клетку (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 10-50 аргининов), домен VP22, домен трансдукции белка Antennapedia дрозофилы, укороченный пептид кальцитонина человека, полилизин и транспортан, гомополимер аргинина из 3-50 остатков аргинина. РТD может представлять собой активируемый СРР (АСРР). АСРР может включать поликатионный СРР (например, Arg9 или "R9"), соединенный через расщепляемый линкер с соответствующим полианионом (например, Glu9 или "E9"), который может уменьшить общий заряд почти до нуля и тем самым подавлять адгезию и поглощение клетками. При расщеплении линкера полианион может высвободиться, локально демаскируя полиаргинин и присущую ему адгезивность, тем самым "активируя" АСРР для пересечения мембраны.

Направляющая нуклеиновая кислота может быть представлена в любой форме. К примеру, направляющая нуклеиновая кислота может быть представлена в виде РНК, как в виде двух молекул (например, отдельно *cr*-РНК и *tracr*-РНК), так и в виде одной молекулы (например, *sg*-РНК). Направляющая нуклеиновая кислота также может быть представлена в виде комплекса с Cas-белком. Направляющая нуклеиновая кислота также может быть представлена в виде ДНК, кодирующей РНК. ДНК, кодирующая направляющую нуклеиновую кислоту, может кодировать единую направляющую нуклеиновую кислоту (например, *sg*-РНК) или отдельные молекулы РНК (например, отдельно *cr*-РНК и *tracr*-РНК). В последнем случае ДНК, кодирующая направляющую нуклеиновую кислоту, может быть представлена в виде отдельных молекул ДНК, кодирующих *cr*-РНК и *tracr*-РНК соответственно.

ДНК, кодирующая направляющую нуклеиновую кислоту, может быть стабильно встроена в геном клетки и, необязательно, функционально связана с промотором, активным в этой клетке. ДНК, кодирующая направляющую нуклеиновую кислоту, может быть функционально связана с промотором в экспрессирующей конструкции.

Направляющая нуклеиновая кислота может быть получена любым подходящим способом. Например, направляющая нуклеиновая кислота может быть получена путем транскрипции *in vitro*, к примеру, с помощью РНК-полимеразы T7. Направляющая нуклеиновая кислота также может быть получена синтетически методами химического синтеза.

Направляющая нуклеиновая кислота может содержать последовательность для повышения стабильности. Например, направляющая нуклеиновая кислота может содержать сегмент терминатора транскрипции (т.е. последовательность терминации транскрипции). Сегмент терминатора транскрипции может иметь общую длину от 10 нуклеотидов до 100 нуклеотидов, например, от 10 нуклеотидов (нт) до 20 нт, от 20 до 30 нт, от 30 до 40 нт, от 40 до 50 нт, от 50 до 60 нт, от 60 до 70 нт, от 70 до 80 нт, от 80 до 90 нт или от 90 до 100 нт. Например, сегмент терминатора транскрипции может иметь длину от 15 нуклеотидов (нт) до 80 нт, от 15 до 50 нт, от 15 до 40 нт, от 15 до 30 нт или от 15 до 25 нт. Последовательность терминации транскрипции может функционировать в эукариотических клетках или прокариотических клетках.

Различные домены химерных рецепторных полипептидов и адаптерных полипептидов, описанных здесь (например, взаимодействующие с антигеном домены, домены сигнализации иммунных клеток (например, первичные сигнальные домены и костимулирующие домены), участок рецепторного связывания, исполнительный элемент, расщепляющий элемент и т.д.) могут соединяться при помощи химической связи, например, амидной связи или дисульфидной связи; небольшой органической молекулы (например, углеводородной цепи); аминокислотной последовательности типа пептидного линкера (например, аминокислотной последовательности длиной в 3-200 аминокислот) или комбинации небольшой органической молекулы и пептидного линкера. Пептидные линкеры могут обеспечить требуемую гибкость для получения требуемой экспрессии, активности и/или конформационного расположения химерного полипептида. Пептидный линкер может быть любой подходящей длины для соединения по меньшей мере двух доменов, представляющих интерес, и предпочтительно должен быть достаточно гибким для того, чтобы обеспечить надлежащую укладку и/или функцию и/или активность одного или обоих доменов, которые он соединяет. Пептидный линкер может иметь длину по меньшей мере в 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 аминокислот. В некоторых воплощениях пептидный линкер имеет длину от 0 до 200 аминокислот, от 10 до 190 аминокислот, от 20 до 180 аминокислот, от 30 до 170 аминокислот, от 40 до 160 аминокислот, от 50 до 150 аминокислот, от 60 до 140 аминокислот, от 70 до 130 аминокислот, от 80 до 120 аминокислот, от 90 до 110 аминокислот. В некоторых воплощениях последовательность линкера может содержать последовательность эндогенного белка. В некоторых воплощениях последовательность линкера содержит остатки аминокислоты глицина, аланина и/или серина. В некоторых воплощениях линкер может содержать мотивы, например, множественные или повторяющиеся мотивы GS, GGS, GGGGS, GGSG или SGGG. Последовательность линкера может включать любые встречающиеся в природе аминокислоты, неприродные аминокислоты либо их комбинации.

В различных воплощениях приведенных здесь аспектов рассматриваемая система экспрессируется в клетках или популяции клеток. Клетки, к примеру иммунные клетки (например, лимфоциты, включая Т-клетки и НК-клетки), могут быть получены от субъекта. Неограничительные примеры субъектов включают людей, собак, кошек, мышей, крыс и их трансгенные виды. Примеры образцов от субъекта, из

которых могут быть получены клетки, включают, без ограничения, кожу, сердце, легкие, почки, костный мозг, молочную железу, поджелудочную железу, печень, мышцы, гладкие мышцы, мочевой пузырь, желчный пузырь, толстую кишку, кишечник, мозг, предстательную железу, пищевод, щитовидную железу, сыворотку, слюну, мочу, желудочную и пищеварительную жидкость, слезы, кал, семенную жидкость, вагинальную жидкость, интерстициальные жидкости из опухолевой ткани, глазные жидкости, пот, слезы, ушную серу, масло, железистые выделения, спинномозговую жидкость, волосы, ногти, плазму, назальный мазок или носоглоточный смыв, ликвор, спинномозговую жидкость, ткань, мазок из горла, биопсию, плацентарную жидкость, амниотическую жидкость, пуповинную кровь, эмфатические жидкости, полостные жидкости, мокроту, гной, микробиоту, меконий, грудное молоко и/или другие выделения или ткани организма.

В различных воплощениях приведенных здесь аспектов иммунные клетки включают лимфоциты. В некоторых воплощениях лимфоциты представлены клетками естественных киллеров (НК-клетками). В некоторых воплощениях лимфоциты представлены Т-клетками. Т-клетки могут быть получены из целого ряда источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, ткань селезенки, пуповину и опухоли. В некоторых воплощениях можно использовать любые доступные линии Т-клеток. Иммунные клетки типа лимфоцитов (например, цитотоксические лимфоциты) предпочтительно могут быть аутологичными клетками, хотя можно использовать и гетерологичные клетки. Т-клетки могут быть получены из единицы крови, собранной у субъекта, используя любые методы типа разделения в фиколле. Клетки из циркулирующей крови человека могут быть получены путем афереза или лейкоафереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие содержащие ядро лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. Клетки, собранные путем афереза, можно промыть для удаления фракции плазмы и поместить клетки в соответствующий буфер или среду типа забуференного фосфатом физраствора (PBS) для последующих стадий обработки. После промывки клетки можно ресуспендировать в различных биосовместимых буферах типа лишенного Са и Mg PBS. С другой стороны, нежелательные компоненты образца афереза можно удалить, а клетки ресуспендировать непосредственно в культуральной среде. Образцы могут быть предоставлены непосредственно субъектом или косвенно через одного или нескольких посредников типа поставщика услуг по сбору проб или медицинского провайдера (например, врача или медсестры). В некоторых воплощениях выделение Т-клеток из лейкоцитов периферической крови может включать лизис эритроцитов и отделение лейкоцитов периферической крови от моноцитов, к примеру, путем центрифугирования, например, в градиенте PERCOL™.

Далее можно выделить особые субпопуляции Т-клеток типа Т-клеток CD4⁺ или CD8⁺ методами положительного или отрицательного отбора. Отрицательный отбор популяции Т-клеток может осуществляться, к примеру, с помощью комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для клеток, подвергаемых отрицательному отбору. Один подходящий метод включает сортировку клеток методом отрицательной магнитной иммуноадагезии, в котором используется коктейль из моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на клетках, подвергаемых отрицательному отбору. Например, для выделения клеток CD4⁺ коктейль из моноклональных антител может включать антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. Процесс отрицательного отбора может применяться для получения требуемой популяции Т-клеток, которая по большей части однородна. В некоторых воплощениях композиция содержит смесь из двух или нескольких (например, 2, 3, 4, 5 или больше) различных типов Т-клеток.

В некоторых воплощениях иммунные клетки представлены обогащенной популяцией клеток. Обогащение одного или нескольких нужных типов клеток можно проводить любым подходящим способом, неограниченные примеры которых включают обработку популяции клеток для запуска экспансии и/или дифференцировки до нужного типа клеток, обработку для прекращения роста нежелательных типов клеток, обработку для уничтожения или лизиса нежелательных типов клеток, очистку нужного типа клеток (например, очистку на аффинной колонке для удержания нужных или нежелательных типов клеток по одному или нескольким маркерам клеточной поверхности). В некоторых воплощениях обогащенная популяция клеток представляет собой популяцию клеток, обогащенную цитотоксическими лимфоцитами из числа цитотоксических Т-клеток (также по-разному известных как цитотоксические Т-лимфоциты, CTLs, Т-киллеры, цитолитические Т-клетки, Т-клетки CD8⁺ и ЦТЛ), клеток естественных киллеров (НК) и активированных лимфокинами клеток-киллеров (LAK).

Для выделения нужной популяции клеток методом положительного или отрицательного отбора можно варьировать концентрации клеток и поверхностей (например, частиц типа шариков). В некоторых воплощениях может потребоваться значительно уменьшить объем, в котором шарики и клетки смешиваются вместе (т.е. повысить концентрацию клеток), чтобы обеспечить максимальный контакт клеток и шариков. К примеру, можно использовать концентрацию в 2 млрд клеток/мл. В некоторых воплощениях используется концентрация в 1 млрд клеток/мл. В некоторых воплощениях используется более 100 млн клеток/мл. Можно использовать концентрацию клеток в 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 млн клеток/мл. В другом воплощении можно использовать концентрацию клеток в 75, 80, 85, 90, 95 или 100 млн клеток на мл. В следующих воплощениях можно использовать концентрации в 125 или 150 млн клеток

на мл. Использование высоких концентраций может привести к повышению выхода клеток, активации клеток и экспансии клеток.

Клетки, например, иммунные клетки, могут подвергаться кратковременной или некротической трансфекции одним или несколькими векторами, описанными здесь. Клетки можно трансфецировать в том виде, в котором они естественным образом встречаются у субъекта. Клетки можно взять или получить от субъекта и трансфецировать. Клетки могут происходить из клеток, взятых у субъекта, типа линии клеток. В некоторых воплощениях клетки, трансфецированные одним или несколькими векторами, описанными здесь, используются для установления новой линии клеток, содержащих одну или несколько полученных из вектора последовательностей. В некоторых воплощениях клетки, подвергнутые кратковременной трансфекции различными компонентами рассматриваемой системы (типа кратковременной трансфекции одним или несколькими векторами или трансфекции РНК) и модифицированные под действием комплекса CRISPR, применяются для создания новой линии клеток, содержащей клетки с модификацией, но без каких-либо других экзогенных последовательностей.

Для введения композиций и молекул (например, полипептидов и/или кодирующих полипептиды нуклеиновых кислот) изобретения в клетки хозяина типа иммунных клеток можно использовать любой подходящий способ доставки. Различные компоненты рассматриваемой системы могут вводиться одновременно или раздельно по времени. В некоторых воплощениях в клетки, например, иммунные клетки, вводится исполнительный элемент, содержащий Cas-белок и/или химерный рецептор и/или адаптер, в сочетании и необязательно в комплексе с направляющей последовательностью. Выбор метода может зависеть от типа клеток, подлежащих трансформации, и/или обстоятельств, при которых происходит трансформация (например, *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*).

Способ доставки может включать контактирование полинуклеотида-мишени или введение в клетки (или популяцию клеток типа иммунных клеток) одной или нескольких нуклеиновых кислот, содержащих последовательности нуклеотидов, кодирующие композиции по изобретению (например, исполнительный элемент типа Cas-белка или Cas-химеры, химерный рецептор, химерный адаптер, направляющую нуклеиновую кислоту и т.д.). Подходящие нуклеиновые кислоты, содержащие последовательности нуклеотидов, кодирующие композиции по изобретению, могут включать экспрессирующие векторы, причем экспрессирующий вектор, содержащий последовательность нуклеотидов, кодирующую одну или несколько композиций по изобретению (например, исполнительный элемент типа Cas-белка или Cas-химеры, химерный рецептор, химерный адаптер, направляющую нуклеиновую кислоту и т.д.) является рекомбинантным экспрессирующим вектором.

Неограничительные примеры способов доставки или трансформации включают, к примеру, инфицирование вирусом или бактериофагом, трансфекцию, конъюгацию, слияние протопластов, липофекцию, электропорацию, осаждение фосфатом кальция, трансфекцию с помощью полиэтиленимина (PEI), трансфекцию с помощью DEAE-декстрана, трансфекцию при помощи липосом, технологию пушки для частиц, осаждение фосфатом кальция, прямые микроинъекции и доставку нуклеиновой кислоты при помощи наночастиц.

В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрены способы, включающие доставку одного или нескольких полинуклеотидов либо одного или нескольких описанных здесь векторов либо одного или нескольких их транскриптов и/или одного или нескольких белков, транскрибируемых из них, в клетки-хозяева. В некоторых аспектах изобретения также предусмотрены клетки, полученные такими способами, и организмы (как-то животные, растения или грибы), содержащие или полученные из таких клеток. В некоторых воплощениях в клетки вводится Cas-белок и/или химерный рецептор и/или адаптер, в сочетании и необязательно в комплексе с направляющей последовательностью.

Для введения нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих или в ткани мишени могут применяться стандартные методы переноса генов на основе вирусов и не вирусов. Такие методы могут применяться для введения нуклеиновых кислот, кодирующих композиции по изобретению, в культуры клеток или в организм хозяина. Системы доставки типа невирусных векторов могут включать ДНК-плазмиды, РНК (например, транскрипты описанных здесь векторов), голые нуклеиновые кислоты и нуклеиновые кислоты в комплексе с носителем типа липосом. Системы доставки типа вирусных векторов могут включать ДНК- и РНК-вирусы, которые могут быть эписомальными либо встраиваться в геном после введения в клетку.

Методы невирусной доставки нуклеиновых кислот могут включать липофекцию, нуклеофекцию, микроинъекцию, биолистику, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, поликатионы или конъюгаты липид:нуклеиновая кислота, голую ДНК, искусственные вирионы и усиленный агентом захват ДНК. Можно использовать катионные и нейтральные липиды, которые подходят для эффективной липофекции полинуклеотидов. Введение может быть в клетки (например, *in vitro* или *ex vivo*) или в ткани мишени (например, *in vivo*). Можно использовать препараты комплексов липид:нуклеиновая кислота, включая прицельные липосомы типа иммунолипидных комплексов.

Для наводки на определенные клетки в организме и транспортировки полезного груза вируса в ядро клетки можно использовать системы на основе РНК- или ДНК-вирусов. Вирусные векторы можно вводить непосредственно (*in vivo*) или же их можно использовать для обработки клеток *in vitro* и обяза-

тельно вводить модифицированные клетки (*ex vivo*). Вирусные системы могут включать ретровирусные, лентивирусные, аденовирусные, аденоассоциированные и векторы из вируса *Herpes simplex* для переноса генов. При переносе генов с помощью ретровирусов, лентивирусов и аденоассоциированных вирусов может происходить встраивание в геном хозяина, что может привести к долговременной экспрессии встроеного трансгена. Высокая эффективность трансдукции может наблюдаться во многих различных типах клеток и тканях-мишенях.

Тропизм ретровирусов может изменяться при включении чужеродных белков оболочки, что расширяет потенциальную целевую популяцию клеток-мишеней. Лентивирусные векторы - это ретровирусные векторы, которые могут трансдуцировать или инфицировать неделящиеся клетки и давать высокие титры вируса. Выбор ретровирусной системы переноса генов может зависеть от ткани-мишени. Ретровирусные векторы могут содержать *cis*-действующие длинные концевые повторы (LTR) с упаковочной емкостью до 6-10 т.о. чужеродной последовательности. Минимальные *cis*-действующие LTR могут быть достаточными для репликации и упаковки векторов, что можно использовать для встраивания терапевтического гена в клетки мишени для обеспечения постоянной экспрессии трансгена. Ретровирусные векторы могут включать векторы на основе вируса лейкемии мыши (MuLV), вируса лейкемии гиббона (GaLV), вируса иммунодефицита обезьян (SIV), вируса иммунодефицита человека (HIV) и их комбинаций.

Можно использовать системы на основе аденовирусов. Аденовирусные системы могут привести к кратковременной экспрессии трансгена. Аденовирусные векторы могут иметь высокую эффективность трансдукции в клетках и не требуют деления клеток. С аденовирусными векторами можно получать высокие титры и уровни экспрессии. Для трансдукции клеток можно использовать векторы из аденоассоциированных вирусов ("AAV") с нуклеиновыми кислотами-мишенями, например, при получении нуклеиновых кислот и пептидов *in vitro*, а также для процедур генной терапии *in vivo* и *ex vivo*.

Для формирования вирусных частиц, способных инфицировать клетки хозяина, можно использовать пакующие линии клеток. Такие клетки могут включать клетки 293 (например, для упаковки аденовируса) и клетки Psi2 или клетки PA317 (например, для упаковки ретровируса). Вирусные векторы можно получать путем продуцирования клеточной линии, которая упаковывает нуклеиновую кислоту вектора в вирусные частицы. Векторы могут содержать минимальные вирусные последовательности, необходимые для упаковки и последующего встраивания у хозяина. Векторы могут содержать и другие вирусные последовательности, которые заменяются на экспрессирующую кассету для экспрессируемых полинуклеотидов. Недостающие вирусные функции могут возмещаться клетками упаковочной линии. Например, векторы из AAV могут содержать последовательности ITR из генома AAV, которые необходимы для упаковки и встраивания в геном хозяина. Вирусную ДНК можно упаковывать в такой линии клеток, которая содержит вспомогательную плазмиду, кодирующую другие гены AAV, а именно *тер* и *сар*, но без последовательности ITR. Линия клеток также может быть инфицирована аденовирусом в качестве вспомогательного. Вспомогательный вирус может способствовать репликации AAV-вектора и экспрессии генов AAV из вспомогательной плазмиды. Загрязнение аденовирусом можно уменьшить, например, термической обработкой, к которой аденовирус более чувствителен, чем AAV. Можно использовать и другие способы доставки нуклеиновых кислот в клетки, к примеру, как описано в US 2003/0087817, включенном сюда путем ссылки.

Клетки-хозяева могут подвергаться кратковременной или некротической трансфекции одним или несколькими векторами, описанными здесь. Клетки можно трансфецировать в том виде, в каком они естественным образом встречаются у субъекта. Клетки можно взять или получить от субъекта и трансфецировать. Клетки могут происходить из клеток, взятых у субъекта, типа линии клеток. В некоторых воплощениях клетки, трансфецированные одним или несколькими векторами, описанными здесь, используются для создания новой линии клеток, содержащих одну или несколько полученных из вектора последовательностей. В некоторых воплощениях клетки, подвергнутые кратковременной трансфекции композициями по изобретению (типа кратковременной трансфекции одним или несколькими векторами или трансфекции РНК) и модифицированные под действием исполнительного элемента типа комплекса CRISPR, применяются для создания новой линии клеток, содержащей клетки с модификацией, но без каких-либо других экзогенных последовательностей.

В способах по изобретению может использоваться любой подходящий вектор, совместимый с клетками-хозяевами. Неограничительные примеры векторов для эукариотических клеток-хозяев включают pXT1, pSG5 (Stratagene™), pSVK3, pBPV, pMSG и pSVLSV40 (Pharmacia™).

В некоторых воплощениях последовательность нуклеотидов, кодирующая направляющую нуклеиновую кислоту и/или Cas-белок или химеру, функционально связана с контрольным элементом, например, контрольным элементом транскрипции типа промотора. Контрольный элемент транскрипции может функционировать как в эукариотических клетках, например, клетках млекопитающих, так и в прокариотических клетках (например, клетках бактерий или архей). В некоторых воплощениях последовательность нуклеотидов, кодирующая направляющую нуклеиновую кислоту и/или Cas-белок или химеру, функционально связана с несколькими контрольными элементами, которые способствуют экспрессированию последовательности нуклеотидов, кодирующей направляющую нуклеиновую кислоту и/или Cas-белок или химеру, в прокариотических и/или эукариотических клетках.

В зависимости от используемой системы хозяин/вектор, в экспрессирующем векторе может использоваться любой из целого ряда подходящих контрольных элементов транскрипции и трансляции, включая конститутивные и индуцибельные промоторы, элементы-энхансеры транскрипции, терминаторы транскрипции и т.д. (например, промотор U6, промотор H1 и т.п., см. выше) (например, см. Bitter et al. (1987) *Methods in Enzymology*, 153: 516-544).

В некоторых воплощениях композиции по изобретению (например, исполнительный элемент типа Cas-белка или Cas-химеры, химерный рецептор, химерный адаптер, направляющая нуклеиновая кислота и т.п.) могут быть представлены в виде РНК. В таких случаях композиции по изобретению (например, исполнительный элемент типа Cas-белка или Cas-химеры, химерный рецептор, химерный адаптер, направляющая нуклеиновая кислота и т.п.) могут быть получены прямым химическим синтезом или могут транскрибироваться *in vitro* из ДНК. Композиции по изобретению (например, исполнительный элемент типа Cas-белка или Cas-химеры, химерный рецептор, химерный адаптер, направляющая нуклеиновая кислота и т.п.) можно синтезировать *in vitro* с помощью фермента РНК-полимеразы (например, полимеразы T7, полимеразы T3, полимеразы SP6 и т.д.). После синтеза РНК может непосредственно контактировать с ДНК-мишенью или может быть введена в клетки любым подходящим методом введения нуклеиновых кислот в клетки (например, микроинъекции, электропорации, трансфекции и др.).

Нуклеотиды, кодирующие направляющую нуклеиновую кислоту (вводится в виде ДНК либо РНК) и/или Cas-белок или химеру (вводятся в виде ДНК либо РНК), можно вводить в клетки, используя подходящий метод трансфекции; например, см. Angel and Yanik (2010) *PLOS ONE* 5 (7): e11756; и коммерчески доступные реагенты TransMessenger® фирмы Qiagen, набор Stemfect™ для трансфекции РНК фирмы Stement или набор TransIT® для трансфекции мРНК фирмы Minis Bio LLC. Также см. Beumer et al. (2008) *Efficient gene targeting in Drosophila by direct embryo injection with zinc-finger nucleases*. *PNAS* 105(50): 19821-19826. Нуклеиновые кислоты, кодирующие композиции по изобретению (например, исполнительный элемент типа Cas-белка или Cas-химеры, химерный рецептор, адаптер, направляющую нуклеиновую кислоту и т.п.), можно предоставлять на ДНК-векторах. Имеется много векторов, например, плазмиды, космиды, миникольца, фаги, вирусы и т.д., пригодных для введения нуклеиновых кислот в клетки мишени. Векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, могут содержаться в виде эписом, например, в виде плазмид, космид, миникольцевой ДНК, вирусов типа цитомегаловируса, аденовируса и др., или же они могут встраиваться в геном клеток мишени посредством гомологической рекомбинации или случайного встраивания, например, ретровирусные векторы типа MMLV, HIV-1 и ALV.

Исполнительный элемент типа Cas-белка или химеры, химерный рецептор и/или адаптер можно вводить в клетки в виде полипептида. Такой белок необязательно может быть слит с полипептидным доменом, повышающим растворимость продукта. Домен может быть связан с полипептидом через сайт расщепления определенной протеазы, например, последовательность TEV, которая расщепляется протеазой TEV. Линкер также может включать одну или несколько гибких последовательностей, например, от 1 до 10 остатков глицина. В некоторых воплощениях расщепление слитого белка проводится в буфере, который поддерживает растворимость продукта, например, в присутствии от 0,5 до 2 М мочевины, в присутствии полипептидов и/или полинуклеотидов, повышающих растворимость, и т.п. Представляющие интерес домены включают эндосомолитические домены, например, домен HA вируса гриппа; и другие полипептиды, которые способствуют получению, например, домен IF2, домен GST, домен GRPE и др. Полипептид может быть сформирован для улучшения стабильности. Например, пептиды можно ПЭ-Гилировать, при этом полиэтиленоксигруппа обеспечивает повышение срока жизни в кровотоке.

Композиции по изобретению (например, исполнительный элемент типа Cas-белка или Cas-химеры, химерный рецептор, химерный адаптер, направляющая нуклеиновая кислота и т.п.) можно сливать с проникающим доменом полипептида, чтобы усилить захват клетками. В неинтегрирующих полипептидах настоящего изобретения могут использоваться многие проникающие домены, включая пептиды, пептидомиметики и непептидные носители. К примеру, проникающий пептид может происходить из третьей α -спирали фактора транскрипции Antennapedia из *Drosophila melanogaster*, называемого пенетратинном, который содержит аминокислотную последовательность RQIKIWFQNRRMKWKK. В качестве другого примера проникающий пептид может содержать аминокислотную последовательность основного участка tat HIV-1, которая может включать, к примеру, аминокислоты 49-57 природного белка tat. Другие проникающие домены включают полиаргининовые мотивы, к примеру, участок аминокислот 34-56 белка rev HIV-1, нонааргинин, октааргинин и т.п. (например, см. Futaki et al. (2003) *Curr Protein Pept*, 2003 April, 4(2): 87-9 and 446; Wender et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000 Nov. 21, 97(24): 13003-8; Published U.S. Patent Applications 2003/0220334; 2003/0083256; 2003/0032593, специально включенные сюда путем, насчет сведений о транслокации пептидов и пептоидов). Можно использовать последовательность нонааргинина (R9) (Wender et al., 2000; Uemura et al., 2002). Участок, на котором проводится слияние, может быть выбран так, чтобы оптимизировать биологическую активность, секрецию или характеристики связывания полипептида.

Композиции по изобретению (например, исполнительный элемент типа Cas-белка или Cas-химеры, химерный рецептор, адаптер, направляющая нуклеиновая кислота и т.п.) могут вырабатываться *in vitro*

либо эукариотическими клетками или прокариотическими клетками, и они могут подвергаться дополнительной обработке путем разворачивания, например, тепловой денатурацией, восстановлением DTT и т.п., а также могут быть свернуты опять.

Композиции по изобретению (например, исполнительный элемент типа Cas-белка или Cas-химеры, химерный рецептор, адаптер, направляющая нуклеиновая кислота и т.п.) могут быть получены путем синтеза *in vitro*. Можно использовать различные коммерческие установки для синтеза, например, автоматизированные синтезаторы фирмы Applied Biosystems, Inc., Beckman и др. При помощи синтезаторов можно заменять природные аминокислоты на неприродные аминокислоты. Конкретную последовательность и способ получения можно определить по удобству, экономичности, требуемой чистоте и пр.

Композиции по изобретению (например, исполнительный элемент типа Cas-белка или Cas-химеры, химерный рецептор, адаптер, направляющую нуклеиновую кислоту и т.п.) также можно выделять и очищать стандартными методами рекомбинантного синтеза. Можно приготовить лизат из экспрессирующего хозяина и очистить его методом HPLC, эксклюзионной хроматографии, гель-электрофореза, аффинной хроматографии или иным методом очистки. Композиции могут содержать, к примеру, по меньшей мере 20 мас.% требуемого продукта, по меньшей мере 75 мас.%, меньшей мере 95 мас.%, а в терапевтических целях, к примеру, по меньшей мере 99,5 мас.% по отношению к примесям, связанным с методом получения продукта и его очисткой. Проценты могут основываться на общем белке.

Композиции по изобретению (например, исполнительный элемент типа Cas-белка или Cas-химеры, химерный рецептор, адаптер, направляющую нуклеиновую кислоту и т.п.) при введении в виде нуклеиновых кислот или полипептидов можно предоставлять клеткам на время от 30 мин до 24 ч, например 1 ч, 1,5 ч, 2 ч, 2,5 ч, 3 ч, 3,5 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 7 ч, 8 ч, 12 ч, 16 ч, 18 ч, 20 ч или на любой другой период от 30 мин до 24 ч, который можно повторять с частотой от каждого дня до каждых 4 дней, например, каждые 1,5 дня, каждые 2 дня, каждые 3 дня или с любой другой частотой от каждого дня до 4 дней. Композиции можно предоставлять данным клеткам один или несколько раз, например, один раз, два раза, три раза или более трех раз, а клетки можно инкубировать с агентами в течение некоторого промежутка времени после каждого контакта, например, 16-24 ч, после чего можно заменить среду свежей средой и культивировать клетки дальше.

В тех случаях, когда клеткам предоставляется два или несколько различных нацеливающих комплексов (например, две разные направляющие нуклеиновые кислоты, которые комплементарны различным последовательностям в одной и той же или в разных ДНК-мишенях), комплексы можно предоставлять одновременно (например, в виде двух полипептидов и/или нуклеиновых кислот) или добавлять одновременно. С другой стороны, их можно добавлять последовательно, например, сначала добавить первый нацеливающий комплекс, а затем второй нацеливающий комплекс и т.д. или наоборот.

К ДНК-мишеням или клеткам-мишеням можно подавать эффективное количество композиций по изобретению (например, исполнительного элемента типа Cas-белка или Cas-химеры, химерного рецептора, адаптера, направляющей нуклеиновой кислоты и т.п.). Эффективным количеством может быть такое количество, которое вызывает, к примеру, по меньшей мере, 2-кратное или большее изменение (повышение или уменьшение) степени регуляции мишени, отмечаемое между двумя гомологичными последовательностями относительно отрицательного контроля, например, клеток, обработанных пустым вектором или посторонним полипептидом. Эффективное количество или доза могут вызывать, к примеру, 2-кратное изменение, 3-кратное изменение, 4-кратное изменение, 7-кратное, 8-кратное, 10-кратное, 50-кратное, 100-кратное, 200-кратное, 500-кратное, 700-кратное, 1000-кратное, 5000-кратное или 10000-кратное изменение регуляции гена-мишени. Степень регуляции гена-мишени можно измерить любым подходящим способом.

Контакт клеток с композицией по изобретению может происходить в любой среде для культивирования и при любых условиях культивирования, которые способствуют выживанию клеток. Например, клетки могут быть суспендированы в любой подходящей питательной среде, которая будет удобной, типа модифицированной Iscove среды DMC или RPMI 1640 с добавлением фетальной телячьей сыворотки или инактивированной нагреванием козьей сыворотки (5-10%), L-глутамина, тиола, в частности 2-меркаптоэтанол, и антибиотиков, например пенициллина и стрептомицина. Культура может содержать факторы роста, к которым клетки восприимчивы. Факторами роста, как определено здесь, являются молекулы, способные стимулировать выживание, рост и/или дифференцировку клеток, либо в культуре, либо в интактной ткани, посредством специфических эффектов на трансмембранные рецепторы. Факторы роста могут включать полипептиды и неполипептидные факторы.

В многочисленных воплощениях выбранная система доставки нацелена на определенные типы тканей или клеток. В некоторых случаях наводка системы доставки на ткани или клетки осуществляется путем связывания системы доставки со специфичными маркерами тканей или клеток типа поверхностных белков клетки. Вирусные и невирусные системы доставки могут быть адаптированы к целевой ткани или представляющим интерес типам клеток.

Фармацевтические композиции, содержащие описанные здесь молекулы (например, полипептиды и/или нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды) или иммунные клетки, можно вводить для профилактического и/или терапевтического лечения. В терапевтических применениях композиции можно

вводить субъектам, которые уже страдают заболеванием, в количестве, достаточном для излечения или по крайней мере частичной остановки симптомов заболевания или же для лечения, излечения, улучшения или ослабления заболевания. Эффективные количества для такого применения могут варьироваться в зависимости от тяжести и течения заболевания, предшествующей терапии, состояния здоровья пациента, веса и реакции на лекарства, а также суждения лечащего врача.

Можно вводить несколько терапевтических средств в любом порядке или одновременно. Если одновременно, то несколько терапевтических средств можно представить в единой унифицированной форме или в нескольких формах, к примеру, в виде нескольких отдельных таблеток. Молекулы могут быть упакованы вместе или по отдельности, в одной упаковке или в нескольких упаковках. Одно или все терапевтические средства можно назначать в нескольких дозах. Если не одновременно, то промежуток времени между несколькими дозами может составлять даже целый месяц.

Описанные здесь молекулы можно вводить до, во время или после возникновения заболевания, а время введения композиций, содержащих соединения, может варьироваться. Например, фармацевтические композиции можно использовать в качестве профилактики и вводить непрерывно субъектам со склонностью к заболеваниям, чтобы предотвратить возникновение заболевания. Молекулы и фармацевтические композиции можно вводить субъекту во время или как можно скорее после появления симптомов.

Введение молекул можно начинать в пределах первых 48 ч после появления симптомов, в пределах первых 24 ч после появления симптомов, в пределах первых 6 ч после появления симптомов или в пределах первых 3 ч после появления симптомов. Первоначальное введение может осуществляться практически любым способом, как-то любым описанным здесь способом, используя любые описанные здесь лекарственные формы. Молекулы можно вводить, как только это будет практически возможно после явного или предполагаемого возникновения заболевания и на протяжении времени, необходимого для лечения заболевания, как-то, к примеру, от 1 до 3 месяцев. Продолжительность лечения может варьироваться для каждого пациента.

Молекулы могут быть упакованы в биологический компартмент. Биологический компартмент, содержащий молекулы, можно вводить субъекту. К биологическим компартментам могут относиться, без ограничения, вирусы (лентивирусы, аденовирусы), наносферы, липосомы, квантовые точки, наночастицы, микрочастицы, нанокапсулы, везикулы, частицы полиэтиленгликоля, гидрогели и мицеллы.

Например, биологический компартмент может включать липосомы. Липосома может быть самосборочной структурой, содержащей один или несколько липидных бислоев, каждый из которых может содержать два монослоя, содержащих противоположно ориентированные молекулы амфипатических липидов. Амфипатические липиды могут содержать полярную (гидрофильную) головку, ковалентно связанную с одной или двумя или несколькими неполярными (гидрофобными) ацильными или алкильными цепями. Энергетически неблагоприятные контакты между гидрофобными ацильными цепями и окружающей водной средой вынуждают молекулы амфипатических липидов устроиться таким образом, чтобы полярные головки были ориентированы на поверхность бислоя, а ацильные цепи ориентированы вовнутрь бислоя, эффективно ограждая ацильные цепи от контакта с водной средой.

Примеры предпочтительных амфипатических соединений, используемых в липосомах, включают фосфоглицериды и сфинголипиды, типичные примеры которых включают фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидную кислоту, фосфатидилглицерин, пальмитоилолеоил-фосфатидилхолин, лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилэтаноламин, димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилхолин, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), дилолеоилфосфатидилхолин и яичный сфингомиелин или любые их комбинации.

Биологический компартмент может включать наночастицы. Наночастицы могут иметь диаметр от 40 нанометров (нм) до 1,5 микрометров (мкм), от 50 нм до 1,2 мкм, от 60 нм до 1 мкм, от 70 до 800 нм, от 80 до 600 нм, от 90 до 400 нм, от 100 до 200 нм.

В некоторых случаях с увеличением размера наночастиц скорость высвобождения может замедляться или увеличиваться, а с уменьшением размера наночастиц скорость высвобождения может повышаться.

Содержание альбумина в наночастицах может составлять от 5 до 85% (об./об.), от 10 до 80%, от 15 до 80%, от 20 до 70% альбумина (об./об.), от 25 до 60%, от 30 до 50% или от 35 до 40%. Фармацевтическая композиция может содержать до 30, 40, 50, 60, 70 или 80% наночастиц или больше. В некоторых случаях молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению могут быть связаны с поверхностью наночастиц.

Биологический компартмент может включать вирусы. Вирусы могут служить системой доставки для фармацевтических композиций изобретения. Типичные вирусы включают лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы, вирусы простого герпеса I или II, парвовирусы, вирусы ретикулоэндотелиоза и аденоассоциированные вирусы (AAV). Фармацевтические композиции изобретения можно доставлять в клетки с помощью вирусов. Вирусом можно инфицировать и трансдуцировать клетки *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. При доставке *ex vivo* и *in vitro* нуждающемуся в терапии субъекту можно вводить трансдуцирован-

ные клетки.

Фармацевтические композиции могут быть упакованы в системы вирусной доставки. Например, композиции могут быть упакованы в вирионы с помощью упаковочной системы, свободной от хелперного вируса HSV-1.

Вирусные системы доставки (например, вирусы, содержащие фармацевтические композиции избрания) можно вводить путем прямой инъекции, стереотаксической инъекции, в желудочки мозга, при помощи инфузионных миниасосов, посредством конвекции, через катетеры, путем внутривенной, парентеральной, внутрибрюшинной и/или подкожной инъекции, в клетки, ткань или орган нуждающегося в этом субъекта. В некоторых случаях клетки могут быть трансдуцированы *in vitro* или *ex vivo* с помощью вирусных систем доставки. Трансдуцированные клетки можно вводить заболевшему субъекту. Например, можно трансдуцировать стволовые клетки с помощью системы вирусной доставки, содержащей фармацевтическую композицию, а затем эти стволовые клетки можно имплантировать пациенту для лечения заболевания. В некоторых случаях доза трансдуцированных клеток при введении субъекту может составлять 1×10^5 клеток/кг, 5×10^5 клеток/кг, 1×10^6 клеток/кг, 2×10^6 клеток/кг, 3×10^6 клеток/кг, 4×10^6 клеток/кг, 5×10^6 клеток/кг, 6×10^6 клеток/кг, 7×10^6 клеток/кг, 8×10^6 клеток/кг, 9×10^6 клеток/кг, 1×10^7 клеток/кг, 5×10^7 клеток/кг, 1×10^8 клеток/кг или больше в одной разовой дозе.

Введение биологических компарментов в клетки может происходить путем инфицирования вирусом или бактериофагом, трансфекции, конъюгации, слияния протопластов, липофекции, электропорации, осаждения фосфатом кальция, трансфекции с помощью полиэтиленимина (PEI), трансфекции с помощью DEAE-декстрана, трансфекции при помощи липосом, технологии пушки для частиц, осаждения фосфатом кальция, прямой микроинъекции и доставки нуклеиновой кислоты при помощи наночастиц.

В некоторых воплощениях вводятся иммунные клетки, экспрессирующие данную систему. Иммунные клетки, экспрессирующие данную систему, можно вводить до, во время или после возникновения заболевания, а время введения иммунных клеток может варьироваться. Например, иммунные клетки, экспрессирующие данную систему, можно использовать в качестве профилактики и вводить непрерывно субъектам со склонностью к заболеваниям, чтобы предотвратить возникновение заболевания. Иммунные клетки можно вводить субъекту во время или как можно скорее после появления симптомов. Введение можно начинать в пределах первых 48 ч после появления симптомов, в пределах первых 24 ч после появления симптомов, в пределах первых 6 ч после появления симптомов или в пределах первых 3 ч после появления симптомов. Первоначальное введение может осуществляться любым подходящим способом, как-то любым описанным здесь способом, используя любые описанные здесь лекарственные формы. Иммунные клетки можно вводить, как только это будет практически возможно после явного или предполагаемого возникновения заболевания и на протяжении времени, необходимого для лечения заболевания, как-то, к примеру, от 1 месяца до 3 месяцев. Продолжительность лечения может варьироваться для каждого пациента.

Описанные здесь молекулы (например, полипептиды и/или нуклеиновые кислоты) могут присутствовать в композиции в пределах от 1 до 2000 мг; от 5 до 1000 мг, от 10 до 25 мг, до 500 мг, от 50 до 250 мг, от 100 до 200 мг, от 1 до 50 мг, от 50 до 100 мг, от 100 до 150 мг, от 150 до 200 мг, от 200 до 250 мг, от 250 до 300 мг, от 300 до 350 мг, от 350 до 400 мг, от 400 до 450 мг, от 450 до 500 мг, от 500 до 550 мг, от 550 до 600 мг, от 600 до 650 мг, от 650 до 700 мг, от 700 до 750 мг, от 750 до 800 мг, от 800 до 850 мг, от 850 до 900 мг, от 900 до 950 мг или от 950 до 1000 мг.

Описанные здесь молекулы (например, полипептиды и/или нуклеиновые кислоты) могут присутствовать в композиции в количестве примерно 1 мг, 2 мг, 3 мг, 4 мг, 5 мг, 10 мг, 15 мг, 20 мг, 25 мг, 30 мг, 35 мг, 40 мг, 45 мг, 50 мг, 55 мг, 60 мг, 65 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 85 мг, 90 мг, 95 мг, 100 мг, 125 мг, 150 мг, 175 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1000 мг, 1050 мг, 1100 мг, 1150 мг, 1200 мг, 1250 мг, 1300 мг, 1350 мг, 1400 мг, 1450 мг, 1500 мг, 1550 мг, 1600 мг, 1650 мг, 1700 мг, 1750 мг, 1800 мг, 1850 мг, 1900 мг, 1950 мг или 2000 мг.

Описанные здесь молекулы (например, полипептиды и/или нуклеиновые кислоты) могут присутствовать в композиции так, чтобы получилось по меньшей мере 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 10 или больше единиц активности на 1 мг молекулы. Активность может представлять собой регуляцию экспрессии генов. В некоторых воплощениях общее количество единиц активности при введении молекул субъекту составляет по меньшей мере 25 000, 30 000, 35 000, 40 000, 45 000, 50 000, 60 000, 70 000, 80 000, 90 000, 110 000, 120 000, 130 000, 140 000, 150 000, 160 000, 170 000, 180 000, 190 000, 200 000, 210 000, 220 000, 230 000, 250 000 или больше единиц. В некоторых воплощениях общее количество единиц активности при введении молекул субъекту составляет не более 25 000, 30 000, 35 000, 40 000, 45 000, 50 000, 60 000, 70 000, 80 000, 90 000, 110 000, 120 000, 130 000, 140 000, 150 000, 160 000, 170 000, 180 000, 190 000, 200 000, 210 000, 220 000, 230 000, 250 000 или больше единиц.

В некоторых воплощениях субъекту вводится по меньшей мере 10 000 единиц активности из расчета на 50 кг массы тела. В некоторых воплощениях субъекту вводится по меньшей мере 10 000, 15 000, 25 000, 30 000, 35 000, 40 000, 45 000, 50 000, 60 000, 70 000, 80 000, 90 000, 110 000, 120 000, 130 000, 140

000, 150 000, 160 000, 170 000, 180 000, 190 000, 200 000, 210 000, 220 000, 230 000, 250 000 или больше единиц активности молекулы из расчета на 50 кг массы тела. В некоторых воплощениях терапевтически эффективная доза составляет по меньшей мере 5×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , $1,1 \times 10^7$, $1,2 \times 10^7$, $1,5 \times 10^7$, $1,6 \times 10^7$, $1,7 \times 10^7$, $1,8 \times 10^7$, $1,9 \times 10^7$, 2×10^7 , $2,1 \times 10^7$, 3×10^7 или больше единиц активности молекулы. В некоторых воплощениях терапевтически эффективная доза составляет не более 5×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , $1,1 \times 10^7$, $1,2 \times 10^7$, $1,5 \times 10^7$, $1,6 \times 10^7$, $1,7 \times 10^7$, $1,8 \times 10^7$, $1,9 \times 10^7$, 2×10^7 , $2,1 \times 10^7$, 3×10^7 или больше единиц активности молекулы.

В некоторых воплощениях терапевтически эффективная доза составляет по меньшей мере 10 000, 15 000, 20 000, 22 000, 24 000, 25 000, 30 000, 40 000, 50 000, 60 000, 70 000, 80 000, 90 000, 100 000, 125 000, 150 000, 200 000 или 500 000 единиц на 1 кг массы тела. В некоторых воплощениях терапевтически эффективная доза составляет не более 10 000, 15 000, 20 000, 22 000, 24 000, 25 000, 30 000, 40 000, 50 000, 60 000, 70 000, 80 000, 90 000, 100 000, 125 000, 150 000, 200 000 или 500 000 единиц на 1 кг массы тела.

В некоторых воплощениях активность молекулы при введении субъекту составляет 10 000, 11 000, 12 000, 13 000, 14 000, 20 000, 21 000, 22 000, 23 000, 24 000, 25 000, 26 000, 27 000, 28 000, 30 000, 32 000, 34 000, 35 000, 36 000, 37 000, 40 000, 45 000, 50 000 или больше ед./мг молекулы. В некоторых воплощениях активность молекулы при введении субъекту составляет не более 10 000, 11 000, 12 000, 13 000, 14 000, 20 000, 21 000, 22 000, 23 000, 24 000, 25 000, 26 000, 27 000, 28 000, 30 000, 32 000, 34 000, 35 000, 36 000, 37 000, 40 000, 45 000, 50 000 или больше ед./мг молекулы.

В различных воплощениях приведенных здесь аспектов могут быть получены фармакокинетические и фармакодинамические данные. Существуют различные экспериментальные методы получения таких данных. Соответствующие компоненты фармакокинетического и фармакодинамического профиля, описывающие определенную композицию, могут варьироваться вследствие вариаций в метаболизме препарата у людей. Фармакокинетические и фармакодинамические профили могут основываться на определении средних параметров у группы испытуемых. Группа субъектов включает любое разумное количество субъектов, подходящее для определения репрезентативного среднего, к примеру, 5 субъектов, 10 субъектов, 15 субъектов, 20 субъектов, 25 субъектов, 30 субъектов, 35 субъектов или больше. Среднее значение определяется путем вычисления среднего значения по всем измерениям субъекта для каждого измеряемого параметра. Для получения требуемого фармакокинетического или фармакодинамического профиля типа желательного или эффективного профиля крови можно модулировать дозу, как описано здесь.

Фармакокинетические параметры могут быть любые параметры, подходящие для описания молекул. Например, C_{\max} может составлять, к примеру, не менее 25 нг/мл; не менее 50 нг/мл; не менее 75 нг/мл; не менее 100 нг/мл; не менее 200 нг/мл; не менее 300 нг/мл; не менее 400 нг/мл; не менее 500 нг/мл; не менее 600 нг/мл; не менее 700 нг/мл; не менее 800 нг/мл; не менее 900 нг/мл; не менее 1000 нг/мл; не менее 1250 нг/мл; не менее 1500 нг/мл; не менее 1750 нг/мл; не менее 2000 нг/мл; или любое другое значение C_{\max} , подходящее для описания фармакокинетического профиля описанных здесь молекул.

Значение T_{\max} у описанных здесь молекул может составлять, к примеру, не более 0,5 ч, не более 1 ч, не более 1,5 ч, не более 2 ч, не более 2,5 ч, не более 3 ч, не более 3,5 ч, не более 4 ч, не более 4,5 ч, не более 5 ч или любое другое значение T_{\max} , подходящее для описания фармакокинетического профиля описанных здесь молекул.

Значение $AUC_{(0-\infty)}$ у описанных здесь молекул может составлять, к примеру, не менее 50 нг·ч/мл, не менее 100 нг·ч/мл, не менее 150 нг·ч/мл, не менее 200 нг·ч/мл, не менее 250 нг·ч/мл, не менее 300 нг·ч/мл, не менее 350 нг·ч/мл, не менее 400 нг·ч/мл, не менее 450 нг·ч/мл, не менее 500 нг·ч/мл, не менее 600 нг·ч/мл, не менее 700 нг·ч/мл, не менее 800 нг·ч/мл, не менее 900 нг·ч/мл, не менее 1000 нг·ч/мл, не менее 1250 нг·ч/мл, не менее 1500 нг·ч/мл, не менее 1750 нг·ч/мл, не менее 2000 нг·ч/мл, не менее 2500 нг·ч/мл, не менее 3000 нг·ч/мл, не менее 3500 нг·ч/мл, не менее 4000 нг·ч/мл, не менее 5000 нг·ч/мл, не менее 6000 нг·ч/мл, не менее 7000 нг·ч/мл, не менее 8000 нг·ч/мл, не менее 9000 нг·ч/мл, не менее 10 000 нг·ч/мл или любое другое значение $AUC_{(0-\infty)}$, подходящее для описания фармакокинетического профиля описанных здесь молекул.

Концентрация в плазме описанных здесь молекул через 1 ч после введения может составлять, к примеру, не менее 25 нг/мл, не менее 50 нг/мл, не менее 75 нг/мл, не менее 100 нг/мл, не менее 150 нг/мл, не менее 200 нг/мл, не менее 300 нг/мл, не менее 400 нг/мл, не менее 500 нг/мл, не менее 600 нг/мл, не менее 700 нг/мл, не менее 800 нг/мл, не менее 900 нг/мл, не менее 1000 нг/мл, не менее 1200 нг/мл или любое другое значение концентрации в плазме описанных здесь молекул.

Фармакокинетические параметры могут быть любые параметры, подходящие для описания фармацевтических композиций изобретения. Например, фармакодинамический профиль может проявлять снижение факторов, связанных с воспалением, к примеру, через 2, 4, 8, 12 или 24 ч.

В различных воплощениях приведенных здесь аспектов способы по изобретению выполняются на

субъектах. Субъектами могут быть люди. Субъектами могут быть млекопитающие (например, крысы, мыши, коровы, собаки, свиньи, овцы, лошади). Субъектами могут быть позвоночные или беспозвоночные. Субъектами могут быть лабораторные животные. Субъектами могут быть пациенты. Субъекты могут страдать заболеванием. Субъект может проявлять симптомы заболевания. Субъект может не проявлять симптомы заболевания, но все же иметь заболевание. Субъект может получать медицинскую помощь от специалиста по уходу за больными (например, субъект госпитализирован и проходит лечение у врача). Субъектами могут быть растения или сельскохозяйственные культуры.

Примеры

Далее различные аспекты изобретения раскрываются на следующих неограничительных примерах.

Пример 1. Изменение экспрессии цитокина при помощи химерного трансмембранного рецептора

Как показано на фиг. 14, для изменения экспрессии цитокина в иммунных клетках применяется система, содержащая химерный полипептид трансмембранного рецептора 1401 и химерный адаптерный полипептид 1402. Компоненты системы экспрессируются в лимфоцитах типа Т-клеток. Вырабатывается химерный полипептид трансмембранного рецептора, включающий внеклеточную область, содержащую одноцепочечный Fv (scFv, например, взаимодействующий с антигеном домен), который связывает HER2. Внутриклеточная область химерного полипептида трансмембранного рецептора включает сигнальный домен иммунной клетки 1403, связанный с ген-модулирующим полипептидом (GMP). Сигнальный домен иммунной клетки содержит сигнальный домен CD3 ξ в качестве первичного сигнального домена и костимулирующий домен из CD28. GMP содержит исполнительный элемент 1404 (например, dCas9), соединенный с сайтом распознавания рестрикции (например, последовательностью протеазы). Химерный адаптерный полипептид содержит расщепляющий элемент 1405. Участок рецепторного связывания может связываться или кластеризоваться с модифицированным химерным полипептидом трансмембранного рецептора. Когда расщепляющий элемент приближается к сайту распознавания расщепления при взаимодействии между рецептором и адаптером, сайт распознавания расщепления может расщепляться расщепляющим элементом, тем самым высвобождая исполнительный элемент из связанного с мембраной рецептора. Исполнительный элемент транслируется в ядро и регулирует экспрессию интерлейкина-1 (IL-1) с геномной ДНК (например, полинуклеотида-мишени). Исполнительный элемент может регулировать экспрессию IL-1 путем регуляции транскрипции посредством создания физической преграды или путем редактирования последовательности кодирующей IL-1 нуклеиновой кислоты таким образом, что продукты гена будут дефектными или полностью удалится последовательность гена. При снижении экспрессии IL-1 в лимфоцитах может уменьшиться токсичность, связанная с CRS при иммунотерапии. Исполнительный элемент dCas9 может комплексоваться с одинарной направляющей РНК (sg-РНК) либо до, либо после высвобождения из GMP. В альтернативной конфигурации химерный трансмембранный рецептор содержит расщепляющий элемент, а химерный адаптерный полипептид содержит GMP.

Пример 2. Изменение экспрессии цитокина при помощи сопряженного с антителом химерного трансмембранного рецептора

Как показано на фиг. 14, для изменения экспрессии цитокина в иммунных клетках применяется система, содержащая химерный полипептид трансмембранного рецептора 1401 и химерный адаптерный полипептид 1402. Компоненты системы экспрессируются в лимфоцитах типа Т-клеток. Вырабатывается химерный полипептид трансмембранного рецептора, включающий внеклеточную область, содержащую Fc-связывающий домен Fc-рецептора (например, взаимодействующий с антигеном домен), который связывает антитело против HER2 (например, антиген). Внутриклеточная область химерного полипептида трансмембранного рецептора содержит сигнальный домен иммунной клетки 1403, связанный с ген-модулирующим полипептидом (GMP). Сигнальный домен иммунной клетки содержит сигнальный домен CD3 ξ в качестве первичного сигнального домена и костимулирующий домен из CD28. GMP содержит исполнительный элемент 1404 (например, dCas9), соединенный с сайтом распознавания рестрикции (например, последовательностью протеазы). Химерный адаптерный полипептид содержит расщепляющий элемент 1405. Участок рецепторного связывания может связываться или кластеризоваться с модифицированным химерным полипептидом трансмембранного рецептора. Когда расщепляющий элемент приближается к сайту распознавания расщепления при взаимодействии между рецептором и адаптером, сайт распознавания расщепления может расщепляться расщепляющим элементом, тем самым высвобождая исполнительный элемент из связанного с мембраной рецептора. Исполнительный элемент транслируется в ядро и регулирует экспрессию интерлейкина-1 (IL-1) из геномной ДНК (например, полинуклеотида-мишени). Исполнительный элемент может регулировать экспрессию IL-1 путем регуляции транскрипции посредством создания физических преград или путем редактирования последовательности кодирующей IL-1 нуклеиновой кислоты таким образом, что продукты гена будут дефектными или полностью удалится последовательность гена. При снижении экспрессии IL-1 в лимфоцитах может уменьшиться токсичность, связанная с CRS при иммунотерапии. Исполнительный элемент dCas9 может комплексоваться с одинарной направляющей РНК (sg-РНК) либо до, либо после высвобождения из GMP. В альтернативной конфигурации химерный трансмембранный рецептор содержит расщепляющий элемент, а химерный адаптерный полипептид содержит GMP.

Пример 3. Изменение экспрессии PD-1 при помощи химерного трансмембранного рецептора

Как показано на фиг. 15, для изменения экспрессии PD-1 в иммунных клетках применяется система, содержащая химерный полипептид трансмембранного рецептора 1501 и химерный адаптерный полипептид 1502. Компоненты системы экспрессируются в лимфоцитах типа Т-клеток. Вырабатывается химерный полипептид трансмембранного рецептора, включающий внеклеточную область, содержащую одноцепочечный Fv (scFv, например, взаимодействующий с антигеном домен), который связывает HER2. Внутриклеточная область химерного полипептида трансмембранного рецептора включает сигнальный домен иммунной клетки 1503, связанный с ген-модулирующим полипептидом (GMP). Сигнальный домен иммунной клетки содержит сигнальный домен CD3 ξ в качестве первичного сигнального домена и костимулирующий домен из CD28. GMP содержит исполнительный элемент 1504 (например, dCas9), соединенный с сайтом распознавания рестрикции (например, последовательностью протеазы). Химерный адаптерный полипептид содержит расщепляющий элемент 1505. Участок рецепторного связывания может связываться или кластеризоваться с модифицированным химерным полипептидом трансмембранного рецептора. Когда расщепляющий элемент приближается к сайту распознавания расщепления при взаимодействии между рецептором и адаптером, сайт распознавания расщепления может расщепляться расщепляющим элементом, тем самым высвобождая исполнительный элемент из связанного с мембраной рецептора. Исполнительный элемент транслируется в ядро и регулирует экспрессию PD-1 из геномной ДНК (например, полинуклеотида-мишени). Исполнительный элемент может регулировать экспрессию PD-1 путем регуляции транскрипции посредством создания физических преград или путем редактирования последовательности кодирующей PD-1 нуклеиновой кислоты таким образом, что продукты гена будут дефектными или полностью удалены последовательность гена. При снижении экспрессии PD-1 в лимфоцитах может повыситься эффективность иммунотерапии. Исполнительный элемент dCas9 может комплексоваться с одинарной направляющей РНК (sg-РНК) либо до, либо после высвобождения из GMP. В альтернативной конфигурации химерный трансмембранный рецептор содержит расщепляющий элемент, а химерный адаптерный полипептид содержит GMP.

Пример 4. Изменение экспрессии PD-1 при помощи сопряженного с антителом химерного трансмембранного рецептора

Как показано на фиг. 15, для изменения экспрессии PD-1 в иммунных клетках применяется система, содержащая химерный полипептид трансмембранного рецептора 1501 и химерный адаптерный полипептид 1502. Компоненты системы экспрессируются в лимфоцитах типа Т-клеток. Вырабатывается химерный полипептид трансмембранного рецептора, включающий внеклеточную область, содержащую Fc-связывающий домен Fc-рецептора (например, взаимодействующий с антигеном домен), который связывает антитело против HER2 (например, антиген). Внутриклеточная область химерного полипептида трансмембранного рецептора включает сигнальный домен иммунной клетки 1503, связанный с ген-модулирующим полипептидом (GMP). Сигнальный домен иммунной клетки содержит сигнальный домен CD3 ξ в качестве первичного сигнального домена и костимулирующий домен из CD28. GMP содержит исполнительный элемент 1504 (например, dCas9), соединенный с сайтом распознавания рестрикции (например, последовательностью протеазы). Химерный адаптерный полипептид содержит расщепляющий элемент 1505. Участок рецепторного связывания может связываться или кластеризоваться с модифицированным химерным полипептидом трансмембранного рецептора. Когда расщепляющий элемент приближается к сайту распознавания расщепления при взаимодействии между рецептором и адаптером, сайт распознавания расщепления может расщепляться расщепляющим элементом, тем самым высвобождая исполнительный элемент из связанного с мембраной рецептора. Исполнительный элемент транслируется в ядро и регулирует экспрессию PD-1 из геномной ДНК (например, полинуклеотида-мишени). Исполнительный элемент может регулировать экспрессию PD-1 путем регуляции транскрипции посредством создания физических преград или путем редактирования последовательности кодирующей PD-1 нуклеиновой кислоты таким образом, что продукты гена будут дефектными или полностью удалены последовательность гена. При снижении экспрессии PD-1 в лимфоцитах может повыситься эффективность иммунотерапии. Исполнительный элемент dCas9 может комплексоваться с одинарной направляющей РНК (sg-РНК) либо до, либо после высвобождения из GMP. В альтернативной конфигурации химерный трансмембранный рецептор содержит расщепляющий элемент, а химерный адаптерный полипептид содержит GMP.

Пример 5. Экспрессия дополнительного химерного полипептида трансмембранного рецептора при помощи химерного полипептида трансмембранного рецептора

Как показано на фиг. 16, для экспрессии второго рецепторного полипептида из плазмиды применяется система, содержащая химерный полипептид трансмембранного рецептора 1601 и химерный адаптерный полипептид 1602. Компоненты системы экспрессируются в лимфоцитах типа Т-клеток. Вырабатывается химерный полипептид трансмембранного рецептора, включающий внеклеточную область, содержащую одноцепочечный Fv (scFv, например, взаимодействующий с антигеном домен), который связывает HER2. Внутриклеточная область химерного полипептида трансмембранного рецептора включает сигнальный домен иммунной клетки 1603, связанный с ген-модулирующим полипептидом (GMP). Сиг-

нальный домен иммунной клетки содержит сигнальный домен CD3 ξ в качестве первичного сигнального домена и костимулирующий домен из CD28. GMP содержит исполнительный элемент 1604 (например, dCas9), соединенный с сайтом распознавания рестрикции (например, последовательностью протеазы). Химерный адаптерный полипептид содержит расщепляющий элемент 1605. Участок рецепторного связывания может связываться или кластеризоваться с модифицированным химерным полипептидом трансмембранного рецептора. Когда расщепляющий элемент приближается к сайту распознавания расщепления при взаимодействии между рецептором и адаптером, сайт распознавания расщепления может расщепляться расщепляющим элементом, тем самым высвобождая исполнительный элемент из связанного с мембраной рецептора. Исполнительный элемент транслируется к экзогенной плазмиде (например, к полинуклеотиду-мишени), введенной в клетку, и регулирует экспрессию второго рецепторного полипептида. Исполнительный элемент может содержать активатор транскрипции, который усиливает транскрипцию из экзогенной плазмиды. Исполнительный элемент dCas9 может комплексоваться с одинарной направляющей РНК (sg-РНК) либо до, либо после высвобождения из GMP. В альтернативной конфигурации химерный трансмембранный рецептор содержит расщепляющий элемент, а химерный адаптерный полипептид содержит GMP.

Пример 6. Экспрессия дополнительного химерного полипептида трансмембранного рецептора при помощи сопряженного с антителом химерного полипептида трансмембранного рецептора

Как показано на фиг. 16, для экспрессии второго рецепторного полипептида из плазмиды применяется система, содержащая химерный полипептид трансмембранного рецептора 1601 и химерный адаптерный полипептид 1602. Компоненты системы экспрессируются в лимфоцитах типа Т-клеток. Вырабатывается химерный полипептид трансмембранного рецептора, включающий внеклеточную область, содержащую Fc-связывающий домен Fc-рецептора (например, взаимодействующий с антигеном домен), который связывает антитело против HER2 (например, антиген). Внутриклеточная область химерного полипептида трансмембранного рецептора включает сигнальный домен иммунной клетки 1603, связанный с ген-модулирующим полипептидом (GMP). Сигнальный домен иммунной клетки содержит сигнальный домен CD3 ξ в качестве первичного сигнального домена и костимулирующий домен из CD28. GMP содержит исполнительный элемент 1604 (например, dCas9), соединенный с сайтом распознавания рестрикции (например, последовательностью протеазы). Химерный адаптерный полипептид содержит расщепляющий элемент 1605. Участок рецепторного связывания может связываться или кластеризоваться с модифицированным химерным полипептидом трансмембранного рецептора. Когда расщепляющий элемент приближается к сайту распознавания расщепления при взаимодействии между рецептором и адаптером, сайт распознавания расщепления может расщепляться расщепляющим элементом, тем самым высвобождая исполнительный элемент из связанного с мембраной рецептора. Исполнительный элемент транслируется к экзогенной плазмиде (например, к полинуклеотиду-мишени), введенной в клетку, и регулирует экспрессию второго рецепторного полипептида. Исполнительный элемент может содержать активатор транскрипции, который усиливает транскрипцию из экзогенной плазмиды.

Исполнительный элемент dCas9 может комплексоваться с одинарной направляющей РНК (sg-РНК) либо до, либо после высвобождения из GMP. В альтернативной конфигурации химерный трансмембранный рецептор содержит расщепляющий элемент, а химерный адаптерный полипептид содержит GMP.

Пример 7. Домен dCas9-KRAB отщепляется от химерных рецепторов в присутствии протеазы TEV

Химерные рецепторные полипептиды, содержащие dCas9-KRAB, экспрессированные в клетках млекопитающих, расщепляли в присутствии протеазы TEV по расщепляемой TEV последовательности (TCS). В этом примере протеазу TEV экспрессировали совместно с пре-Т-клеточным антигенным рецептором-альфа (PTCRA), связанным с dCas9-KRAB (PTCRA-dCas9-KRAB), GPCR-рецептором CXCR2, связанным с dCas9-KRAB (CXCR2-dCas9-KRAB), рецептором интерлейкина-6 (IL6R), связанным с dCas9-KRAB (IL6R-dCas9-KRAB), или нацеливающимся CD19 химерным антигенным рецептором (CAR), связанным с dCas9-KRAB (CAR-dCas9-KRAB), в клетках HEK293T, и анализировали клеточный лизат Вестерн-блоттингом на присутствие продуктов расщепления.

Для каждого химерного рецептора создавали экспрессирующий вектор для клеток млекопитающих методами молекулярного клонирования. Конструкция PTCRA-dCas9-KRAB включала PTCRA, связанный с расщепляемой TEV последовательностью (TCS), dCas9, KRAB и с-Мус-DDK (PTCRA-dCas9-KRAB). Конструкция CXCR2 включала CXCR2, связанный с расщепляемой TEV последовательностью (TCS), dCas9, KRAB и с-Мус-DDK (CXCR2-dCas9-KRAB). Конструкция IL6R включала IL6R, связанный с расщепляемой TEV последовательностью (TCS), dCas9, KRAB и с-Мус-DDK (IL6R-dCas9-KRAB). Конструкция CAR включала CAR, связанный с расщепляемой TEV последовательностью (TCS), dCas9, KRAB и с-Мус-DDK (CAR-dCas9-KRAB). Протеаза TEV была предоставлена в индуцибельной системе экспрессии (Tet-on), позволяющей регулировать экспрессию TEV доксициклином (DOX); она включала плазмиду Tet-on-TEV и плазмиду, экспрессирующую rTA.

Для каждого химерного рецептора экспрессирующий вектор для клеток млекопитающих трансфицировали совместно с плазмидами Tet-on-TEV и rTA в клетки HEK293T. В качестве контроля использо-

вали клетки, трансфицированные "свободным" dCas9-KRAB или без ДНК. Вкратце, клетки HEK293T трансфицировали при конfluэнтности 50-70% с помощью реагента для трансфекции *Mirus*. Через 24 ч после трансфекции в культуральные среды клеток добавляли доксициклин (DOX), чтобы индуцировать высокую экспрессию протеазы TEV. При использовании индуцибельной системы экспрессии добавление доксициклина (DOX) приводит к высокой экспрессии протеазы TEV, тогда как отсутствие DOX приводит к низкой экспрессии протеазы TEV. Через 48 ч после трансфекции собирали образцы клеток в буфере RIPA с добавлением ингибиторов протеаз и анализировали Вестерн-блоттингом.

Для метода вестерн-блот готовили клеточные лизаты, используя буфер для образцов NuPAGE LDS (4X) и восстановитель NuPAGE Reducing Agent (10X), разгоняли белки на заранее отлитых гелях, а затем переносили на нитроцеллюлозные мембраны. Мембраны зондировали антителами против Cas9 и против АСТВ (контроль).

Анализ Вестерн-блоттингом показал расщепление химерных рецепторов по TCS в присутствии или в отсутствие DOX. Присутствие меньших полос белка, соответствующих отщепленному dCas9-KRAB на фиг. 20, указывает на отщепление dCas9-KRAB из химерных рецепторов в присутствии протеазы TEV ("низкая" и "высокая" TEV).

Пример 8. dCas9-KRAB отщепляется от CAR-dCas9-KRAB в присутствии адаптера-протеазы TEV

В присутствии различных слияний адаптера с протеазой TEV полипептиды CAR-dCas9-KRAB расщеплялись по расщепляемой TEV последовательности (TCS). В данном примере протеазу TEV сливали с различными трансмембранными и цитоплазматическими адаптерными белками, которые могут рекрутироваться к активированному CAR. Исследуемые цитоплазматические адаптерные белки включают ZAP70, LCP-2, GADS и GRB2. Исследуемые трансмембранные адаптеры включают LCK и LAT. Различные конструкции типа адаптер-протеаза TEV были предоставлены в индуцибельной системе экспрессии (Tet-on), позволяющей регулировать экспрессию TEV доксициклином (DOX); она включала плазмиду Tet-on-адаптер-TEV и плазмиду, экспрессирующую rTA.

Для каждого адаптерного белка экспрессирующий вектор для CAR-dCas9-KRAB, как описано в примере 7, экспрессировали совместно с плазмидами Tet-on-адаптер-TEV и rTA в клетках HEK293T. В качестве контроля использовали клетки, трансфицированные "свободным" dCas9-KRAB или CAR-dCas9-KRAB без котрансфекции адаптером-TEV. Вкратце, клетки HEK293T трансфицировали при конfluэнтности 50-70% с помощью реагента для трансфекции *Mirus*. Через 24 ч после трансфекции в культуральные среды клеток добавляли доксициклин (DOX), чтобы индуцировать высокую экспрессию адаптера-TEV. При использовании индуцибельной системы экспрессии добавление доксициклина (DOX) приводит к высокой экспрессии адаптера с протеазой TEV, тогда как отсутствие DOX приводит к низкой экспрессии адаптера с протеазой TEV. Через 48 ч после трансфекции собирали образцы клеток в буфере RIPA с добавлением ингибиторов протеаз и анализировали Вестерн-блоттингом.

Для Вестерн-блоттинга готовили клеточные лизаты, используя буфер для образцов NuPAGE LDS (4X) и восстановитель NuPAGE Reducing Agent (10X), разгоняли белки на заранее залитых гелях, а затем переносили на нитроцеллюлозные мембраны. Мембраны анализировали с антителами против Cas9 и против АСТВ (контроль).

Наблюдалось расщепление химерных рецепторов по TCS у слитой с трансмембранным или цитоплазматическим адаптером TEV в присутствии низких и высоких DOX. Присутствие меньших полос белка, соответствующих отщепленному dCas9-KRAB на фиг. 21, указывает на отщепление dCas9-KRAB из химерных рецепторов в присутствии адаптера-протеазы TEV ("низкая" и "высокая" TEV). Для цитоплазматических адаптеров низкая экспрессия адаптера-TEV была достаточна для отщепления. Для трансмембранных адаптеров высокая экспрессия адаптера-TEV (+ DOX) приводила к более высоким уровням отщепления.

Пример 9. Вызванное связыванием лиганда расщепление химерного рецептора

Проводится анализ индуцированного лигандом расщепления полипептидов химерного рецептора в клетках Jurkat и первичных Т-клетках человека. Экспрессируют полипептиды химерного рецептора, связывающие антиген CD19, и химерные адаптерные полипептиды в клетках Jurkat или первичных Т-клетках человека, получая сконструированные клетки Jurkat и сконструированные Т-клетки. При презентации клеткам антигена CD19 наблюдается расщепление рецептора в сконструированных клетках Jurkat и сконструированных Т-клетках.

Проводится упаковка лентивируса со связывающим CD19 CAR и dCas9-KRAB (CD19-CAR-dCas9-KRAB) и лентивируса с адаптером-TEV в клетках 293T. Для получения сконструированных клеток Jurkat и сконструированных Т-клеток, совместно экспрессирующих полипептиды CD19-CAR-dCas9-KRAB и адаптер-TEV (например, ZAP70-TEV, LCP2-TEV, GADS-TEV, GRB2-TEV, PIK3R-TEV, LCK-TEV, LAT-TEV и NCK-TEV), применяется трансдукция лентивирусов. Трансдукция лентивирусов проверяется методом проточной цитометрии (CD19-CAR-dCas9-KRAB) и вестерн-блот (адаптер-TEV). После трансдукции и проверки экспрессии полипептидов сконструированные клетки Jurkat и сконструированные Т-клетки (отдельно) культивируют вместе с клетками CD19⁺ лейкомиической линии клеток NALM-6, клетками Daudi CD19⁺ лимфомы Беркитта или клетками Raji CD19⁺ лимфомы Беркитта. В качестве контроля сконструированные клетки Jurkat и Т-клетки (отдельно) культивируют вместе с клетками CD19⁻ (не

экспрессирующими CD19). Связывание CD19 со внеклеточным доменом CD19-CAR-dCas9-KRAB активирует CAR-сигнализацию и рекрутирует полипептиды адаптера-TEV (например, ZAP70-TEV, LCP2-TEV, GADS-TEV, GRB2-TEV, PIK3R-TEV, LCK-TEV, LAT-TEV и NCK-TEV) к внутриклеточному домену полипептида химерного рецептора, где и происходит расщепление. После совместного культивирования проводится лизис сконструированных клеток Jurkat и сконструированных Т-клеток для анализа Вестерн-блоттингом на наличие свободного dCas9-KRAB (отщепленного от рецептора) в присутствии клеток CD19⁺ или клеток CD19⁻, как описано в примере 7. Уровень активированного CD19 расщепления сравнивают с базальным уровнем расщепления рецептора в сконструированных клетках Jurkat и сконструированных Т-клетках при совместном культивировании с клетками CD19⁺.

Расщепление полипептидов химерного рецептора должно быть выше в сконструированных клетках Jurkat или сконструированных Т-клетках при совместном культивировании с клетками CD19⁺.

Пример 10. Регуляция транскрипции (понижающая регуляция) в результате расщепления химерного рецептора

Проводится анализ изменений уровня экспрессии генов, возникающих при лиганд-зависимом расщеплении полипептидов химерного рецептора и происходящем при этом высвобождении dCas9-KRAB для регуляции транскрипции в сконструированных клетках Jurkat и сконструированных Т-клетках. Как описано в примере 9, сконструированные клетки Jurkat и сконструированные Т-клетки совместно экспрессируют CD19-CAR-dCas9-KRAB и адаптер-TEV, а также экспрессируют нацеливающие РНК (sg-RNAs). Нацеливающие РНК специфичны для PD-1 (sgPD-1) или IL-6 (sgIL-6). Проводится упаковка лентивируса со связывающим CD19 CAR и dCas9-KRAB (CD19-CAR-dCas9-KRAB), лентивируса с адаптером-TEV и лентивируса с нацеливающей на PD-1 или IL-6 sg-РНК в клетках 293Т. Для получения сконструированных клеток Jurkat и сконструированных Т-клеток, совместно экспрессирующих CD19-CAR-dCas9-KRAB, полипептид адаптер-TEV (например, ZAP70-TEV, LCP2-TEV, GADS-TEV, GRB2-TEV, PIK3R-TEV, LCK-TEV, LAT-TEV и NCK-TEV) и sg-РНК (например, sgPD-1, sgIL-6 или sgNT "без нацеливания"), применяется трансдукция лентивирусов. Трансдукция лентивирусов проверяется методом проточной цитометрии (CD19-CAR-dCas9-KRAB) и вестерн-блот (адаптер-TEV). После трансдукции сконструированные клетки Jurkat и сконструированные Т-клетки (отдельно) культивируют вместе с клетками CD19⁺ лейкоцитарной линии клеток NALM-6, клетками Daudi CD19⁺ лимфомы Беркитта или клетками Raji CD19⁺ лимфомы Беркитта. В качестве контроля сконструированные клетки Jurkat и Т-клетки культивируют вместе с клетками CD19⁻. Связывание CD19 со внеклеточным доменом химерного рецептора активирует CAR-сигнализацию и рекрутирует полипептиды адаптера-TEV (например, ZAP70-TEV, LCP2-TEV, GADS-TEV, GRB2-TEV, PIK3R-TEV, LCK-TEV, LAT-TEV и NCK-TEV) к внутриклеточному домену слитого белка CAR-dCas9-KRAB, где и происходит расщепление. После совместного культивирования проводится лизис сконструированных клеток Jurkat и сконструированных Т-клеток для анализа Вестерн-блоттингом на наличие свободного dCas9-KRAB (отщепленного от рецептора) в присутствии клеток CD19⁺ или клеток CD19⁻, как описано в примере 7.

Лиганд-зависимое расщепление рецептора проверяется Вестерн-блоттингом, как описано в примере 8. Изменения уровня экспрессии генов PD-1 и IL-6, возникающие при высвобождении dCas9-KRAB и последующей наводке dCas9-KRAB в комплексе с sg-РНК, анализируют методом qPCR. Поверхностную экспрессию PD-1 (белка) анализируют методом проточной цитометрии. Секрецию IL-6 (белка) анализируют методом ELISA.

Ожидаются изменения в транскрипционной регуляции экспрессии PD-1 и IL-6 в ответ на связывание CD19 и CD19CAR-dCas9-KRAB. Ожидается понижающая регуляция PD-1 и IL-6 в сконструированных клетках Jurkat и первичных Т-клетках человека, экспрессирующих CD19CAR-dCas9-KRAB, адаптер-TEV и sg-РНК. Сконструированные клетки Jurkat и Т-клетки, экспрессирующие РНК "без нацеливания", например, sgNT, при совместном культивировании с лейкоцитарными и лимфоцитарными клетками CD19⁺ должны проявлять минимальные изменения в регуляции транскрипции по сравнению с исходным уровнем, так как sgNT не будет нацеливать на dCas9-KRAB для регуляции транскрипции.

Пример 11. Регуляция транскрипции (повышающая регуляция) в результате расщепления химерного рецептора

Проводится анализ изменений уровня экспрессии генов, возникающих при лиганд-зависимом расщеплении полипептидов химерного рецептора и происходящем при этом высвобождении dCas9-KRAB для регуляции транскрипции в сконструированных клетках Jurkat и сконструированных Т-клетках. Как описано в примере 9, сконструированные клетки Jurkat и сконструированные Т-клетки совместно экспрессируют CD19-CAR-dCas9-VPR и адаптер-TEV, а также экспрессируют нацеливающие РНК (sg-RNAs). Нацеливающие РНК специфичны для PD-1 (sgPD-1) или IL-6 (sgIL-6). Проводится упаковка лентивируса со связывающим CD19 CAR и dCas9-VPR (CD19-CAR-dCas9-VPR), лентивируса с адаптером-TEV и лентивируса с нацеливающей на PD-1 или IL-6 sg-РНК в клетках 293Т. Для получения сконструированных клеток Jurkat и сконструированных Т-клеток, совместно экспрессирующих CD19-CAR-dCas9-VPR, полипептид адаптер-TEV (например, ZAP70-TEV, LCP2-TEV, GADS-TEV, GRB2-TEV, PIK3R-TEV, LCK-TEV, LAT-TEV и NCK-TEV) и sg-РНК (например, sgPD-1, sgIL-6 или sgNT "без нацеливания"), применяется трансдукция лентивирусов. Трансдукция лентивирусов проверяется методом проточ-

ной цитометрии (CD19-CAR-dCas9-VPR) и вестерн-блот (адаптер-TEV). После трансдукции сконструированные клетки Jurkat и сконструированные Т-клетки (отдельно) культивируют вместе с клетками CD19+ лейкемической линии клеток NALM-6, клетками Daudi CD19+ лимфомы Беркитта или клетками Raji CD19+ лимфомы Беркитта. В качестве контроля сконструированные клетки Jurkat и Т-клетки культивируют вместе с клетками CD19-. Связывание CD19 со внеклеточным доменом химерного рецептора активирует CAR-сигнализацию и рекрутирует полипептиды адаптера-TEV (например, ZAP70-TEV, LCP2-TEV, GADS-TEV, GRB2-TEV, PIK3R-TEV, LCK-TEV, LAT-TEV и NCK-TEV) к внутриклеточному домену слитого белка CAR-dCas9-VPR, где и происходит расщепление. После совместного культивирования проводится лизис сконструированных клеток Jurkat и сконструированных Т-клеток для анализа Вестерн-блоттингом на наличие свободного dCas9-VPR (отщепленного от рецептора) в присутствии клеток CD19+ или клеток CD19-, как описано в примере 7.

Лиганд-зависимое расщепление рецептора проверяется Вестерн-блоттингом, как описано в примере 8. Изменения уровня экспрессии генов PD-1 и IL-6, возникающие при высвобождении dCas9-VPR и последующей наводке dCas9-VPR в комплексе с sg-PHK, анализируют методом qPCR. Поверхностную экспрессию PD-1 (белка) анализируют методом проточной цитометрии. Секрецию IL-6 (белка) анализируют методом ELISA.

Ожидаются изменения в транскрипционной регуляции экспрессии PD-1 и IL-6 в ответ на связывание CD19 и CD19CAR-dCas9-VPR. Ожидается повышающая регуляция PD-1 и IL-6 в сконструированных клетках Jurkat и первичных Т-клетках человека, экспрессирующих CD19CAR-dCas9-VPR, адаптер-TEV и sg-PHK. Сконструированные клетки Jurkat и Т-клетки, экспрессирующие РНК "без нацеливания", например, sgNT, при совместном культивировании с лейкемическими и лимфомными клетками CD19+ должны проявлять минимальные изменения в регуляции транскрипции по сравнению с исходным уровнем, так как sgNT не будет наводить на dCas9-VPR для регуляции транскрипции.

Хотя предпочтительные воплощения настоящего изобретения были представлены и описаны здесь, специалистам в данной области должно быть ясно, что такие воплощения представлены только в качестве примера. Теперь у специалистов в данной области должны возникать многочисленные вариации, изменения и замены, не отходящие от изобретения. Следует понимать, что при осуществлении изобретения могут использоваться различные альтернативы описанных здесь воплощений изобретения. Предполагается, что объем изобретения определяется нижеприведенной формулой изобретения, причем она охватывает способы и структуры, входящие в объем этой формулы и её эквивалентов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинация полипептидов для условной регуляции экспрессии гена и/или активности полинуклеотида-мишени в иммунной клетке, которая включает:

(a) химерный полипептид трансмембранного рецептора, включающий: (i) внеклеточную область, содержащую взаимодействующий с антигеном домен, который связывает антиген, и (ii) внутриклеточную область, содержащую сигнальный домен иммунной клетки;

(b) химерный адаптерный полипептид, содержащий участок рецепторного связывания, который связывает рецепторный полипептид, когда рецепторный полипептид подвергся модификации при связывании с антигеном;

(c) ген-модулирующий полипептид (GMP), содержащий исполнительный элемент, соединенный с сайтом распознавания расщепления, где при высвобождении из GMP исполнительный элемент способен регулировать экспрессию гена и/или активность полинуклеотида-мишени; и

(d) расщепляющий элемент, который расщепляет сайт распознавания расщепления, когда он находится вблизи сайта распознавания расщепления, высвобождая исполнительный элемент из GMP;

где в ответ на связывание антигена рецептор модифицируется и химерный адаптерный полипептид рекрутируется к рецептору;

где расщепляющий элемент входит в состав химерного адаптерного полипептида, а GMP входит в состав внутриклеточной области рецепторного полипептида, где связывание химерного адаптерного полипептида с рецептором сближает расщепляющий элемент и сайт распознавания расщепления и где расщепляющий элемент расщепляет сайт распознавания расщепления для высвобождения исполнительного элемента из GMP.

2. Комбинация полипептидов для условной регуляции экспрессии гена и/или активности полинуклеотида-мишени в иммунной клетке, которая включает:

(a) химерный полипептид трансмембранного рецептора, включающий: (i) внеклеточную область, содержащую взаимодействующий с антигеном домен, который связывает антиген, и (ii) внутриклеточную область, содержащую сигнальный домен иммунной клетки;

(b) химерный адаптерный полипептид, содержащий участок рецепторного связывания, который связывает рецепторный полипептид, когда рецепторный полипептид подвергся модификации при связывании с антигеном;

(c) ген-модулирующий полипептид (GMP), содержащий исполнительный элемент, соединенный с

сайтом распознавания расщепления, где при высвобождении из GMP исполнительный элемент способен регулировать экспрессию гена и/или активность полинуклеотида-мишени; и

(d) расщепляющий элемент, который расщепляет сайт распознавания расщепления, когда он находится вблизи сайта распознавания расщепления, высвобождая исполнительный элемент из GMP;

где в ответ на связывание антигена рецептор модифицируется и химерный адаптерный полипептид рекрутируется к рецептору;

где расщепляющий элемент входит в состав внутриклеточной области рецепторного полипептида, а GMP входит в состав химерного адаптерного полипептида, где связывание химерного адаптерного полипептида с рецептором сближает расщепляющий элемент и сайт распознавания расщепления и где расщепляющий элемент расщепляет сайт распознавания расщепления для высвобождения исполнительного элемента из GMP.

3. Комбинация полипептидов для условной регуляции экспрессии гена и/или активности полинуклеотида-мишени в иммунной клетке, которая включает:

(a) химерный полипептид трансмембранного рецептора, включающий: (i) внеклеточную область, содержащую взаимодействующий с антигеном домен, который связывает антиген, и (ii) внутриклеточную область, содержащую сигнальный домен иммунной клетки;

(b) химерный адаптерный полипептид, содержащий участок рецепторного связывания, который связывает рецепторный полипептид, когда рецепторный полипептид подвергся модификации при связывании с антигеном;

(c) ген-модулирующий полипептид (GMP), содержащий исполнительный элемент, соединенный с сайтом распознавания расщепления, где при высвобождении из GMP исполнительный элемент способен регулировать экспрессию гена и/или активность полинуклеотида-мишени; и

(d) расщепляющий элемент, который расщепляет сайт распознавания расщепления, когда он находится вблизи сайта распознавания расщепления, высвобождая исполнительный элемент из GMP;

где в ответ на связывание антигена рецептор модифицируется и химерный адаптерный полипептид рекрутируется к рецептору;

где расщепляющий элемент образует комплекс со вторым адаптерным полипептидом, который связывается с рецепторным полипептидом, подвергшимся модификации при связывании рецептора с антигеном, а GMP входит в состав химерного адаптерного полипептида; или, где связывание химерного адаптерного полипептида с рецептором сближает расщепляющий элемент и сайт распознавания расщепления и где расщепляющий элемент расщепляет сайт распознавания расщепления для высвобождения исполнительного элемента из GMP.

4. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом расщепляющий элемент входит в состав внутриклеточной области рецепторного полипептида, а GMP входит в состав химерного адаптерного полипептида.

5. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом расщепляющий элемент образует комплекс со вторым адаптерным полипептидом, который связывается с рецепторным полипептидом, подвергшимся модификации при связывании рецептора с антигеном, а GMP входит в состав химерного адаптерного полипептида.

6. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом расщепляющий элемент входит в состав химерного адаптерного полипептида, а GMP входит в состав внутриклеточной области рецепторного полипептида.

7. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом иммунные клетки представлены лимфоцитами.

8. Комбинация полипептидов по п.7, при этом лимфоциты представлены Т-клетками.

9. Комбинация полипептидов по п.7, при этом лимфоциты представлены клетками естественных киллеров (NK).

10. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом взаимодействующий с антигеном домен связывает антитело.

11. Комбинация полипептидов по п.10, при этом взаимодействующий с антигеном домен связывает по меньшей мере одну Fc-область, Fv-область, тяжелую цепь или легкую цепь антитела.

12. Комбинация полипептидов по п.11, при этом взаимодействующий с антигеном домен связывает Fc-область антитела.

13. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом взаимодействующий с антигеном домен включает, по меньшей мере, Fab, одноцепочечный Fv (scFv), внеклеточный рецепторный домен или Fc-связывающий домен.

14. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-13, при этом взаимодействующий с антигеном домен включает Fc-связывающий домен, содержащий Fc-рецептор или его фрагмент.

15. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-14, при этом взаимодействующий с антигеном домен включает Fc-связывающий домен, содержащий FcγRI (CD64), FcγRIa, FcγRIb, FcγRIc, FcγRIIA (CD32), FcγRIIA (CD32, H131), FcγRIIA (CD32, R131), FcγRIIB (CD32), FcγRIIB-1, FcγRIIB-2, FcγRIIA

(CD16a, V158), FcγRIIIA (CD16a, F158), FcγRIIIB (CD16b, FcγRIIIB-NA1), FcγRIIIB (CD16b, FcγRIIIB-NA2), FcεRI, FcεRII (CD23), FcαRI (CD89), Fcα/μR, FcRn.

16. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом взаимодействующий с антигеном домен связывает антиген, включающий антитело, которое в свою очередь связывает антиген, выбранный из группы, в которую входят β-амилоид 1-40, 4-1BB, 5A3, 5T4, киназа-1 типа рецептора активина, ACVR2B, антиген аденокарциномы, AGS-22M6, альфа-фетопротеин, ангиопоэтин 2, ангиопоэтин 3, сибирезвенный токсин, AOC3 (VAP-1), B7-H3, токсин *Bacillus anthracis*, BAFF, бета-амилоид, клетки В-лимфомы, антиген C242, C5, CA-125, IL31 собаки (*Canis lupus familiaris*), карбоангидраза 9 (CA-IX), сердечный миозин, CCL11 (эотаксин-1), CCR4, CCR5, CD11, CD18, CD125, CD140a, CD147 (базигин), CD15, CD152, CD154 (CD40L), CD19, CD2, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23 (рецептор IgE), CD25 (α-цепь рецептора IL-2), CD27, CD274, CD28, CD3, CD3-эпсилон, CD30, CD33, CD37, CD38, CD4, CD40, лиганд CD40, CD41, CD44 v6, CD5, CD51, CD52, CD56, CD6, CD70, CD74, CD79B, CD80, CEA, родственный CEA антиген, CFD, ch4D5, CLDN18.2, *Clostridium difficile*, фактор слипания A, CSF1R, CSF2, CTLA-4, рецептор-4 хемокинов типа C-X-C, цитомегаловирус, гликопротеин В цитомегаловируса, дабигатран, DLL4, DPP4, DR5, шигатоксин *E. coli* 1 типа, шигатоксин *E. coli* 2 типа, EGFL7, EGFR, эндотоксин, EPCAM, эписиалин, ERBB3, *Escherichia coli*, F-белок респираторно-синцитиального вируса, FAP, бета-цепь фибрина II, дополнительный домен-В фибронектина, фолатгидролаза, рецептор фолата 1, альфа-рецептор фолата, рецептор Frizzled, ганглиозид GD2, GD2, ганглиозид GD3, глипикан 3, α-цепь рецептора GMCSF, GPNMB, фактор роста и дифференцировки 8, GUCY2C, гемагглютинин, поверхностный антиген гепатита В, вирус гепатита В, HER1, HER2/neu, HER3, HGF, HHGFR, гистоновый комплекс, HIV-1, ULA-DR, HNGF, Hsp90, киназа рецептора фактора роста гепатоцитов (scatter factor) человека, TNF человека, бета-амилоид человека, ICAM-1 (CD54), IFN-α, IFN-γ, IgE, Fc-область IgE, рецептор IGF-1, IGF-1, IGHE, IL 17A, IL 17F, IL 20, IL-12, IL-13, IL-17, IL-1β, IL-22, IL-23, IL-31RA, IL-4, IL-5, IL-6, рецептор IL-6, IL-9, ILGF2, гемагглютинин вируса гриппа А, рецептор инсулиноподобного фактора роста I, интегрин α4β7, α4-интегрин, интегрин α5β1, интегрин α7β7, интегрин αIIbβ3, интегрин αvβ3, рецептор α/β-интерферона, индуцированный γ-интерфероном белок, ITGA2, ITGB2 (CD18), KIR2D, антиген Lewis-Y, LFA-1 (CD11a), LINGO-1, липотейхоевая кислота, LOXL2, L-селектин (CD62L), LTA, MCP-1, мезотелин, MIF, MS4A1, MSLN, MUC1, CanAg муцина, связанный с миелином гликопротеин, миостатин, NCA-90 (антиген гранулоцитов), регулируемая апоптозом невральной протеиназа 1, NGF, N-гликолилнейраминавая кислота, NOGO-A, рецептор Notch, NRP1, *Oryctolagus cuniculus*, OX-40, oxLDL, PCSK9, PD-1, PDCD1, PDGF-Rα, котранспортер фосфата-натрия, фосфатидилсерин, бета-рецептор тромбоцитарного фактора роста, клетки карциномы простаты, *Pseudomonas aeruginosa*, гликопротеин вируса бешенства, RANKL, респираторно-синцитиальный вирус, RHD, резус-фактор, RON, RTN4, склеростин, SDC1, селектин P, SLAMF7, SOST, сфингозин-1-фосфат, *Staphylococcus aureus*, STEAP1, TAG-72, T-клеточный рецептор, TEM1, тенацин С, TFPI, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β, TNF-α, TRAIL-R1, TRAIL-R2, опухолевый антиген СТАА16.88, опухолеспецифичный гликозилированный MUC1, связанный с опухолями передатчик кальциевых сигналов 2, рецептор TWEAK, TYRP1 (гликопротеин 75), VEGFA, VEGFR1, VEGFR2, виментин и VWF.

17. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом взаимодействующий с антигеном домен связывает Fc-область антитела, выбранного из группы, в которую входят 20-(74)-(74) (милатузумаб, велтузумаб), 20-2b-2b, 3F8, 74-(20)-(20) (милатузумаб, велтузумаб), 8H9, A33, AB-16B5, абаговомаб, абциксимаб, абитузумаб, ABP 494 (биоаналог цетуксимаба), абрилумаб, АВТ-700, АВТ-806, актимаб-А (Ac-225 активный-линтузумаб), актоксумаб, адалимумаб, ADC-1013, ADCT-301, ADCT-402, адекватумумаб, адуканумаб, афелимомаб, AFM13, афугузумаб, AGEN1884, AGS15E, AGS16C3F, AGS67E, алацизумаб-пегол, ALD518, алемтузумаб, алирокумаб, алтумомаб пентетат, аматуксимаб, AMG 228, AMG 820, анатумомаб мафенатокс, анетумаб равтансин, анифролумаб, анрукинзумаб, APN301, APN311, аполизумаб, APX003/SIM-BD0801 (севацизумаб), APX005M, арцитумомаб, ARX788, аскринвакумаб, аселизумаб, ASG-15ME, атезолизумаб, атинумаб, ATL101, алтизумаб (также известен как тоцилизумаб), аторолимумаб, авелумаб, В-701, бапинеузумаб, базиликсимаб, бавитуксимаб, BAY1129980, BAY1187982, бектумомаб, бегеломаб, белимумаб, бенрализумаб, бертилимумаб, бесилесомаб, беталутин (¹⁷⁷Lu-тетраксетан-тетуломаб), бевацизумаб, BEVZ92 (биоаналог бевацизумаба), безлтоксумаб, BGB-A317, BHK880, BI 836880, BI-505, бициромаб, бимагрумаб, бимекизумаб, биватузумаб мертансин, BIW-8962, блинатумомаб, блосозумаб, BMS-936559, BMS-986012, BMS-986016, BMS-986148, BMS-986178, BNC101, бокоцизумаб, брентуксимаб ведотин, BrevaRex, бриакинумаб, бродалумаб, бролуцизумаб, брониктузумаб, C2-2b-2b, канакинумаб, кантузумаб мертансин, кантузумаб равтансин, каплацизумаб, капромаб пентетид, карлумаб, катумаксомаб, иммуноконъюгат CBR96-доксорубин, CBT124 (бевацизумаб), CC-90002, CDX-014, CDX-1401, цеделизумаб, цертолизумаб-пегол, цетуксимаб, CGEN-15001T, CGEN-15022, CGEN-15029, CGEN-15049, CGEN-15052, CGEN-15092, Ch.14.18, цитатузумаб богатокс, циксутумумаб, клазакизумаб, кленоликсимаб, кливатузумаб тетраксетан, CM-24, кодритузумаб, колтуксимаб равтансин, конатумумаб, концизумаб, Cotara (I-131 йод-дерлотуксимаб-биотин), cR6261, кренезумаб, DA-3111 (биоаналог трастузумаба), дацетузумаб, даклизумаб, далотузумаб, дапиролизумаб-пегол, даратумумаб, дара-

тумумаб Enhance (даратумумаб), дарлейкин, дектрекумаб, демцизумаб, денинтузумаб мафодотин, дено-сумаб, депатуксизумаб, депатуксизумаб мафодотин, дерлотуксимаб-биотин, детумомаб, DI-B4, динутуксимаб, диридавумаб, DKN-01, DMOT4039A, дорлимомаб аритокс, дрозитумаб, DS-1123, DS-8895, дули-готумаб, душлумаб, дурвалумаб, дусигитумаб, экроексимаб, экулизумаб, эдобакомаб, эдреколомаб, эфализумаб, эфунгумаб, эдделумаб, элгемтумаб, элотузумаб, элсилимомаб, эмактузумаб, эмибетузумаб, энаватузумаб, энфортумаб ведотин, энлимомаб-пегол, эноблитузумаб, энокизумаб, энотикумаб, энситуксимаб, эпитумомаб цитуксетан, эпратузумаб, эрлизумаб, эртумаксумаб, этарацизумаб, этролизумаб, эвинакумаб, эволокумаб, эксбивирумаб, фанолесумаб, фаралимомаб, фарлетузумаб, фасинумаб, FBTA05, фелвизумаб, фезакинумаб, FF-21101, конъюгат антитело-препарат FGFR2, Fibromin, фиклатузумаб, фи-гитумумаб, фиривумаб, фланвотумаб, флетикумаб, фонтолизумаб, форалумаб, форавирумаб, FPA144, фресолимумаб, FS102, фулранумаб, футуксимаб, галиксимаб, ганитумаб, гантенерумаб, гавилимомаб, гемтузумаб озогамидин, герилимумаб, гевокизумаб, гирентуксимаб, глембатумумаб ведотин, GNR-006, GNR-011, голимумаб, гомиликсимаб, GSK2849330, GSK2857916, GSK3174998, GSK3359609, гуселку-маб, mAb Hu14.18K322A, hu3S193, Hu8F4, HuL2G7, HuMab-5B1, ибализумаб, ибритумомаб тиуксетан, икрукумаб, идаруцизумаб, IGN002, IGN523, иговомаб, IMAV362, IMAV362 (клаудиксимаб), ималумаб, IMC-CS4, IMC-D11, имциромаб, имгатузумаб, IMG529, IMMU-102 (Y-90 иттрий-этратузумаб тетраксетан), IMMU-114, антагонистическое антитело ImmuTune IMP701, INCAGN1876, инклакумаб, INCSHR1210, индатуксимаб равтансин, индусатумаб ведотин, инфликсимаб, инолимомаб, инотузумаб озогамидин, интетумумаб, Ipafriccept, IPH4102, ипилимумаб, иратумумаб, изатуксимаб, истиратумаб, итолизумаб, иксекизумаб, JNJ-56022473, JNJ-61610588, келиксимаб, KTN3379, L19IL2/L19TNF, лабету-зумаб, лабетузумаб говитекан, LAG525, ламбролизумаб, лампализумаб, L-DOS47, лебрикизумаб, лемалесумаб, лензилумаб, лерделимумаб, лейкотуксимаб, лексатумумаб, либивирумаб, лифастузумаб ведо-тин, лигелизумаб, лилотомаб сатетраксетан, линтузумаб, лирилумаб, LKZ145, лоделцизумаб, локивет-маб, лорвотузумаб мертансин, лукатумумаб, лулизумаб-пегол, люмиликсимаб, люмретузумаб, LY3164530, мапатумумаб, маргетуксимаб, маслимомаб, мартузумаб, маврилимумаб, MB311, MCS-110, MEDI0562, MEDI-0639, MEDI0680, MEDI-3617, MEDI-551 (инебилизумаб), MEDI-565, MEDI6469, мепо-лизумаб, метелимумаб, MGB453, MGD006/S80880, MGD007, MGD009, MGD011, милатузумаб, милату-зумаб-SN-38, минретумомаб, мирветуксимаб соравтанзин, митумомаб, MK-4166, MM-111, MM-151, MM-302, могамулизумаб, MOR202, MOR208, MORAb-066, моролимумаб, мотавизумаб, моксетумомаб пасудотокс, муромонаб-CD3, наколомаб тафенатокс, намилиумаб, наптумомаб эстафенатокс, нарнатумаб, натализумаб, небакумаб, нецитумумаб, немолизумаб, нерелимомаб, несвакумаб, нимотузумаб, ниволу-маб, нофетумомаб мерпентан, NOV-10, обилтоксаксимаб, обинутузумаб, окаратузумаб, окрелизумаб, одулимомаб, офатумумаб, оларатумаб, олокизумаб, омализумаб, OMP-131R10, OMP-305B83, онартузу-маб, онтуксизумаб, опицинумаб, опортузумаб монатокс, ореговомаб, ортикумаб, отеликсизумаб, отлер-тузумаб, OX002/MEN1309, окселумаб, озанезумаб, озорализумаб, пагибаксимаб, палилвизумаб, паниту-мумаб, панкомаб, PankoMab-GEX, панобакумаб, парсатузумаб, пасколизумаб, пасотуксизумаб, патекли-зумаб, патриумаб, PAT-SC1, PAT-SM6, пембролизумаб, пемтумомаб, перакизумаб, пертузумаб, пексе-лизумаб, PF-05082566 (утомилумаб), PF-06647263, PF-06671008, PF-06801591, пидилизумаб, пинатузу-маб ведотин, пинтумомаб, плакулумаб, полатузумаб ведотин, понезумаб, приликсимаб, притоксаксимаб, притумумаб, PRO 140, Proxinium, PSMA ADC, квилизумаб, ракотумомаб, радретумаб, рафивирумаб, ралпанцизумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, рефанезумаб, регавирумаб, REGN1400, REGN2810/SAR439684, реслизумаб, RFM-203, RG7356, RG7386, RG7802, RG7813, RG7841, RG7876, RG7888, RG7986, рилотумумаб, ринукумаб, ритуксимаб, RM-1929, RO7009789, робатумумаб, роледумаб, ромосозумаб, ронтализумаб, ровелизумаб, руплизумаб, сацитумумаб говитекан, самализумаб, SAR 408701, SAR566658, сарилумаб, SAT 012, сатумомаб пендетид, SCT200, SCT400, SEA-CD40, секукину-маб, серибантумаб, сетоксаксимаб, севирумаб, SGN-CD19A, SGN-CD19B, SGN-CD33A, SGN-CD70A, SGN-LIV1A, сибротузумаб, сифалимумаб, силтуксимаб, симтузумаб, сиплизумаб, сирукумаб, софитузу-маб ведотин, соланезумаб, солитомаб, сонепцизумаб, сонтузумаб, стамулумаб, сулесумаб, сувизумаб, SYD985, SYM004 (футуксимаб и модотуксимаб), Sym015, TAB08, табалумаб, такатузумаб тетраксетан, тадоцизумаб, тализумаб, танезумаб, танибрирумаб, таплитумомаб паптокс, тарекстумаб, TB-403, тефиба-зумаб, Teleukin, телимомаб аритокс, тенатумомаб, тенеликсимаб, теплизумаб, тепротумумаб, тесидолу-маб, тетуломаб, TG-1303, TGN1412, конъюгат торий-227-эпратузумаб, тицилимумаб, тигатузумаб, тилд-ракизумаб, тисотумаб ведотин, TNX-650, тоцилизумаб, торализумаб, тосатоксумаб, тоситумомаб, тове-тумаб, тралокинумаб, трастузумаб, трастузумаб эмтансин, TRBS07, TRC105, трегализумаб, тремелиму-маб, тревогрумаб, TRPH 011, TRX518, TSR-042, TTI-200.7, тукотузумаб целмолейкин, тувирумаб, U3-1565, U3-1784, ублитуксимаб, улокуплумаб, урелумаб, уртоксазумаб, устекинумаб, вадастуксимаб Taligine, вандортузумаб ведотин, вантуктумаб, вануцизумаб, вапаликсимаб, варлилумаб, вателизумаб, VB6-845, ведолизумаб, велтузумаб, вепалимомаб, весенкумаб, висилизумаб, волоциксимаб, ворсетузу-маб мафодотин, вотумумаб, YUV-101, залутумумаб, занолимумаб, затуксимаб, зиралимумаб и золимо-маб аритокс.

18. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом внеклеточная область содержит несколько взаимодействующих с антигеном доменов, каждый из которых проявляет связывание с одним и

тем же или разными антигенами.

19. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом взаимодействующий с антигеном домен связывает антиген, выбранный из группы, в которую входят 707-AP, биотинилированная молекула, α -актинин-4, abl-bcr alb-b3 (b2a2), abl-bcr alb-b4 (b3a2), адипофилин, AFP, AIM-2, аннексин II, ART-4, BAGE, β -катенин, bcr-abl, bcr-abl p190 (e1a2), bcr-abl p210 (b2a2), bcr-abl p210 (b3a2), BING-4, CAG-3, CAIX, CAMEL, каспаза-8, CD171, CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44v7/8, CDC27, CDK-4, CEA, CLCA2, Сур-В, DAM-10, DAM-6, DEK-CAN, EGFRvIII, EGP-2, EGP-40, ELF2, Ер-САМ, EphA2, EphA3, erb-B2, erb-B3, erb-B4, ES-ESO-1a, ETV6/AML, FBP, фетальный ацетилхолиновый рецептор, FGF-5, FN, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7B, GAGE-8, GD2, GD3, GnT-V, G100, gp75, Her-2, HLA-A* 0201-R170I, HMW-MAA, HSP70-2M, HST-2 (FGF6), HST-2/neu, hTERT, iCE, IL-11R α , IL-13R α 2, KDR, KIAA0205, K-RAS, молекула клеточной адгезии L1, LAGE-1, LDLR/FUT, Lewis Y, MAGE-1, MAGE-10, MAGE-12, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-6, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-B1, MAGE-B2, "яблочный" фермент, маммаглобин-А, MART-1/Melan-A, MART-2, MC1R, M-CSF, мезотелин, MUC1, MUC16, MUC2, MUM-1, MUM-2, MUM-3, миозин, NA88-A, Neo-PAP, NKG2D, NPM/ALK, N-RAS, NY-ESO-1, OA1, OGT, онкофетальный антиген (h5T4), OS-9, полипептид Р, P15, P53, PRAME, PSA, PSCA, PSMA, PTPRK, RAGE, ROR1, RU1, RU2, SART-1, SART-2, SART-3, SOX10, SSX-2, сурвивин, сурвивин-2В, SYT/SSX, TAG-72, TEL/AML1, TGF β RII, TGF β RII, TP1, TRAG-3, TRG, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TRP-2-6b, тирозиназа, VEGF-R2, WT1, α -фолатный рецептор и легкая к-цепь.

20. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом сигнальный домен иммунной клетки рецепторного полипептида включает первичный сигнальный домен, содержащий активационный мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITAM).

21. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом сигнальный домен иммунной клетки рецепторного полипептида включает первичный сигнальный домен, содержащий ингибирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITIM).

22. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом сигнальный домен иммунной клетки включает первичный сигнальный домен белка, выбранного из группы, в которую входят рецептор Fc γ R (Fc γ R), рецептор Fc ϵ (Fc ϵ R), рецептор Fc α (Fc α R), неонатальный Fc-рецептор (FcRn), CD3, CD3 ζ , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD4, CD5, CD8, CD21, CD22, CD28, CD32, CD40L (CD154), CD45, CD66d, CD79a, CD79b, CD80, CD86, CD278 (также известен как ICOS), CD247 ζ , CD247 η , DAP10, DAP12, FYN, LAT, Lck, MAPK, комплекс MHC, NFAT, NF- κ B, PLC- γ , iC3b, C3dg, C3d и Zap70.

23. Комбинация полипептидов по п.22, при этом первичный сигнальный домен включает сигнальный домен CD3 ζ .

24. Комбинация полипептидов по п.23, при этом первичный сигнальный домен содержит активационный мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITAM) из CD3 ζ .

25. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом сигнальный домен иммунной клетки включает костимулирующий домен.

26. Комбинация полипептидов по п.25, при этом сигнальный домен иммунной клетки включает несколько костимулирующих доменов.

27. Комбинация полипептидов по п.25, при этом костимулирующий домен включает сигнальный домен молекулы MHC класса I, белка рецептора TNF, иммуноглобулиноподобного белка, рецептора цитокинов, интегрина, сигнальной молекулы активации лимфоцитов (белка SLAM), активирующего рецептора NK-клеток или рецептора типа Toll.

28. Комбинация полипептидов по п.25, при этом костимулирующий домен включает сигнальный домен молекулы, выбранной из группы, в которую входят 2B4/CD244/SLAMF4, 4-1BB/TNFSF9/CD137, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BAFF R/TNFRSF13C, BAFF/BLyS/TNFSF13B, BLAME/SLAMF8, BTLA/CD272, CD100 (SEMA4D), CD103, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD150, CD160 (BY55), CD18, CD19, CD2, CD200, CD229/SLAMF3, лиганд CD27/TNFSF7, CD27/TNFRSF7, CD28, CD29, CD2F-10/SLAMF9, лиганд CD30/TNFSF8, CD30/TNFRSF8, CD300a/LMIR1, CD4, лиганд CD40/TNFSF5, CD40/TNFRSF5, CD48/SLAMF2, CD49a, CD49D, CD49f, CD53, CD58/LFA-3, CD69, CD7, CD8 α , CD8 β , CD82/Kai-1, CD84/SLAMF5, CD90/Thy1, CD96, CDS, CEACAM1, CRACC/SLAMF7, CRTAM, CTLA-4, DAP12, дектин-1/CLEC7A, DNAM1 (CD226), DPPIV/CD26, DR3/TNFRSF25, EphB6, GADS, Gi24/VISTA/B7-H5, лиганд GITR/TNFSF18, GITR/TNFRSF18, HLA класса I, HLA-DR, HVEM/TNFRSF14, IA4, ICAM-1, ICOS/CD278, Ikaros, IL2R β , IL2R γ , IL7R α , α 4-интегрин/CD49d, интегрин α 4 β 1, интегрин α 4 β 7/LPAM-1, IPO-3, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB1, ITGB2, ITGB7, KIRDS2, LAG-3, LAT, LIGHT/TNFSF14, LTBR, Ly108, Ly9 (CD229), связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), α -лимфотоксин/TNF- β , NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRP1), NTB-A/SLAMF6, лиганд OX40/TNFSF4, OX40/TNFRSF4, PAG/Cbp, PD-1, PDCD6, PD-L2/B7-DC, PSGL1, RELT/TNFRSF19L, SELPLG (CD162), SLAM (SLAMF1), Slam/CD150, SLAMF4 (CD244), SLAMF6 (NTB-A), SLAMF7, SLP-76, TACI/TNFRSF13B, TCL1A, TCL1B, TIM-1/KIM-1/HAVER, TIM-4, TL1A/TNFSF15, TNF RII/TNFRSF1B,

TNF- α , TRANCE/RANKL, TSLP, TSLP R, VLA1 и VLA-6.

29. Комбинация полипептидов по п.25, при этом костимулирующий домен действует, регулируя пролиферативный сигнал и/или сигнал выживания в иммунных клетках.

30. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом рецептор содержит по меньшей мере один нацеливающий пептид, который направляет транспортировку рецепторного полипептида в определенную область клетки.

31. Комбинация полипептидов по п.30, при этом нацеливающий пептид направляет транспортировку рецепторного полипептида в ядро, митохондрии, эндоплазматический ретикулум (ER), хлоропласты, пероксисомы или плазматическую мембрану.

32. Комбинация полипептидов по п.30, при этом нацеливающий пептид содержит сигнал ядерного экспорта (NES).

33. Комбинация полипептидов по п.30, при этом нацеливающий пептид включает нацеливающий пептид для плазматической мембраны.

34. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом модификация рецептора включает химическую модификацию.

35. Комбинация полипептидов по п.34, при этом химическая модификация включает фосфорилирование.

36. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом участок рецепторного связывания у химерного адаптерного полипептида содержит связывающий домен молекулы, выбранной из группы, в которую входят ABL1, ABL2, APBA1, APBA2, APBA3, BCAR3, BLK, BLNK, BMX, BTK, CHN2, CISH, CRK, CRKL, CSK, DAPP1, DOK1, DOK2, DOK3, DOK4, DOK5, DOK6, DOK7, EAT-2, EPS8, EPS8L1, EPS8L2, EPS8L3, FER, FES, FGR, FRK, FRS2, FRS3, FYN, GADS, GRAP, GRAP2, GRB10, GRB14, GRB2, GRB7, HCK, HSH2D, INPP5D, INPPL1, IRS1, IRS2, IRS3, IRS4, ITK, JAK2, LAT, LCK, LCP2, LYN, MATK, NCK1, NCK2, PIK3R1, PIK3R2, PIK3R3, PLCG1, PLCG2, PTK6, PTPN11, PTPN6, RASA1, SAP, SH2B1, SH2B2, SH2B3, SH2D1A, SH2D1B, SH2D2A, SH2D3A, SH2D3C, SH2D4A, SH2D4B, SH2D5, SH2D6, SH3BP2, SHB, SHC1, SHC2, SHC3, SHC4, SHD, SHE, SHP1, SHP2, SLA, SLA2, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6, SOCS7, SRC, SRMS, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6, SUPT6H, SYK, TEC, TENC1, TLN1, TLN2, TNS, TNS1, TNS3, TNS4, TXK, VAV1, VAV2, VAV3, YES1, ZAP70, X11a.

37. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом исполнительный элемент включает CRISPR-ассоциированный (Cas) полипептид, нуклеазу типа "цинковый палец" (ZFN), связанные с "цинковым пальцем" полипептиды регуляции генов, эффекторную нуклеазу типа активатора транскрипции (TALEN), связанные с эффекторной нуклеазой типа активатора транскрипции полипептиды регуляции генов, мегануклеазу, природные главные факторы транскрипции, эпигенетические модифицирующие ферменты, рекомбиназу, флипазу, транспозазу, РНК-связывающие белки (RBP), белок Argonaute.

38. Комбинация полипептидов по п.37, при этом исполнительный элемент включает Cas-белок, и комбинация полипептидов дополнительно содержит направляющую РНК (гидРНК), которая образует комплекс с Cas-белком.

39. Комбинация полипептидов по п.38, при этом гидРНК включает нацеливающий сегмент, который по последовательности по меньшей мере на 80% идентичен с полинуклеотидом-мишенью.

40. Комбинация полипептидов по п.38, при этом Cas-белок практически не обладает активностью расщепления ДНК.

41. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом исполнительный элемент включает по меньшей мере один нацеливающий пептид, который направляет исполнительный элемент в определенный район клетки.

42. Комбинация полипептидов по п.41, при этом нацеливающий пептид содержит сигнал ядерной локализации (NLS).

43. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом модификация рецептора включает модификацию по нескольким сайтам модификации, причем каждый сайт модификации эффективно связывает химерный адаптерный полипептид и/или второй адаптерный полипептид.

44. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом сайт распознавания расщепления содержит полипептидную последовательность, а расщепляющий элемент обладает протеазной активностью.

45. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом исполнительный элемент после высвобождения из GMP связывается с полинуклеотидом-мишенью и регулирует экспрессию с полинуклеотида-мишени путем создания физического препятствия полинуклеотиду-мишени или привлечения дополнительных факторов для эффективного подавления или усиления экспрессии с полинуклеотида-мишени.

46. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом исполнительный элемент содержит активатор транскрипции для эффективного повышения экспрессии с полинуклеотида-мишени.

47. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом исполнительный элемент содержит репрессор транскрипции для эффективного снижения экспрессии с полинуклеотида-мишени.

48. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом полинуклеотид-мишень содержит геномную ДНК.

49. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом полинуклеотид-мишень содержит РНК.

50. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом полинуклеотид-мишень содержит эндогенный ген или продукт эндогенного гена.

51. Комбинация полипептидов по п.50 при этом эндогенный ген или продукт эндогенного гена кодирует цитокин.

52. Комбинация полипептидов по п.51, при этом цитокин выбран из группы, в которую входят 4-1BBL, активин β A, активин β B, активин β C, активин β E, артемин (ARTN), BAFF/BLyS/TNFSF138, BMP10, BMP15, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, костный морфогенетический белок 1 (BMP1), CCL1/TCA3, CCL11, CCL12/MCP-5, CCL13/MCP-4, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17/TARC, CCL18, CCL19, CCL2/MCP-1, CCL20, CCL21, CCL22/MDC, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL3L3, CCL4, CCL4L1/LAG-1, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, CD153/CD30L/TNFSF8, CD40L/CD154/TNFSF5, CD40LG, CD70, CD70/CD27L/TNFSF7, CLCF1, c-MPL/CD110/TPOR, CNTF, CX3CL1, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17, CXCL2/MIP-2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7/Ppbp, CXCL9, EDA-A1, FAM19A1, FAM19A2, FAM19A3, FAM19A4, FAM19A5, лиганд Fas/FASLG/CD95L/CD178, GDF10, GDF11, GDF15, GDF2, GDF3, GDF4, GDF5, GDF6, GDF7, GDF8, GDF9, нейротрофический фактор из глиальных клеток (GDNF), фактор роста и дифференцировки 1 (GDF1), IFNA1, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA2, IFNA4, IFNA5/IFNaG, IFNA7, IFNA8, IFNB1, IFNE, IFNG, IFNZ, IFN ω /IFNW1, IL11, IL18, IL18BP, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F3/IL1RA, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL1RL2, IL31, IL33, IL6, IL8/CXCL8, ингибин-A, ингибин-B, лептин, LIF, LTA/TNFB/TNFSF1, LTB/TNFC, нейртурин (NRTN), OSM, OX-40L/TNFSF4/CD252, персефин (PSPN), RANKL/OPGL/TNFSF11 (CD254), TL1A/TNFSF15, TNFA, TNF-альфа/TNFA, TNFSF10/TRAIL/APO-2L (CD253), TNFSF12, TNFSF13, TNFSF14/LIGHT/CD258, XCL1 и XCL2.

53. Комбинация полипептидов по п.50, при этом эндогенный ген или продукт эндогенного гена кодирует иммунорегуляторный белок.

54. Комбинация полипептидов по п.53, при этом иммунорегуляторный белок выбран из группы, в которую входят A2AR, B7.1, B7-H3/CD276, B7-H4/B7S1/B7x/Vtcn1, B7-H6, BTLA/CD272, CCR4, CD122, 4-1BB/CD137, CD27, CD28, CD40, CD47, CD70, CISH, CTLA-4/CD152, DR3, GITR, ICOS/CD278, IDO, KIR, LAG-3, OX40/CD134, PD-1/CD279, PD2, PD-L1, PD-L2, TIM-3 и VISTA/Dies1/Gi24/PD-1H (C10orf54).

55. Комбинация полипептидов по любому из пп.1-3, при этом полинуклеотид-мишень содержит гетерологичный ген или продукт гетерологичного гена.

56. Комбинация полипептидов по п.55, при этом гетерологичный ген или продукт гетерологичного гена кодирует дополнительный химерный полипептид трансмембранного рецептора.

57. Комбинация полипептидов по п.56, при этом дополнительный химерный полипептид трансмембранного рецептора включает:

(а) внеклеточную область, содержащую дополнительный взаимодействующий с антигеном домен, который связывает дополнительный антиген; и

(b) костимулирующий домен.

58. Лимфоцит, экспрессирующий комбинацию полипептидов по любому из пп.1-3.

59. Лимфоцит по п.58, при этом лимфоцит отличается тем, что исполнительный элемент высвобождается из GMP путем отщепления по сайту распознавания расщепления при связывании рецепторного полипептида с антигеном.

60. Лимфоцит по п.58, при этом высвобожденный исполнительный элемент образует комплекс с полинуклеотидом-мишенью в лимфоците.

61. Лимфоцит по п.60, при этом образование комплекса исполнительного элемента с полинуклеотидом-мишенью приводит к повышающей регуляции экспрессии гена в лимфоците.

62. Лимфоцит по п.61, при этом ген представлен гетерологичным геном.

63. Лимфоцит по п.62, при этом гетерологичный ген кодирует дополнительный химерный полипептид трансмембранного рецептора.

64. Лимфоцит по п.63, при этом дополнительный химерный полипептид трансмембранного рецептора включает:

(а) внеклеточную область, содержащую дополнительный взаимодействующий с антигеном домен, который связывает дополнительный антиген; и

(b) костимулирующий домен.

65. Лимфоцит по п.61, при этом ген представлен эндогенным геном.

66. Лимфоцит по п.65, при этом эндогенный ген кодирует цитокин.

67. Лимфоцит по п.66, при этом цитокин выбран из группы, в которую входят: 4-1BBL, активин β A,

активин β B, активин β C, активин β E, артемин (ARTN), BAFF/BLyS/TNFSF138, BMP10, BMP15, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, костный морфогенетический белок 1 (BMP1), CCL1/TCA3, CCL11, CCL12/MCP-5, CCL13/MCP-4, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17/TARC, CCL18, CCL19, CCL2/MCP-1, CCL20, CCL21, CCL22/MDC, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL3L3, CCL4, CCL4L1/LAG-1, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, CD153/CD30L/TNFSF8, CD40L/CD154/TNFSF5, CD40LG, CD70, CD70/CD27L/TNFSF7, CLCF1, c-MPL/CD110/TPOR, CNTF, CX3CL1, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17, CXCL2/MIP-2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7/Ppbp, CXCL9, EDA-A1, FAM19A1, FAM19A2, FAM19A3, FAM19A4, FAM19A5, лиганд Fas/FASLG/CD95L/CD178, GDF10, GDF11, GDF15, GDF2, GDF3, GDF4, GDF5, GDF6, GDF7, GDF8, GDF9, нейротрофический фактор из глиальных клеток (GDNF), фактор роста и дифференцировки 1 (GDF1), IFNA1, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA2, IFNA4, IFNA5/IFNaG, IFNA7, IFNA8, IFNB1, IFNE, IFNG, IFNZ, IFN ω /IFNW1, IL11, IL18, IL18BP, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F3/IL1RA, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL1RL2, IL31, IL33, IL6, IL8/CXCL8, ингибин-А, ингибин-В, лептин, LIF, LTA/TNFB/TNFSF1, LTB/TNFC, нейртулин (NRTN), OSM, OX40L/TNFSF4/CD252, персефин (PSPN), RANKL/OPGL/TNFSF11 (CD254), TL1A/TNFSF15, TNFA, TNF-альфа/TNFA, TNFSF10/TRAIL/APO-2L (CD253), TNFSF12, TNFSF13, TNFSF14/LIGHT/CD258, XCL1 и XCL2.

68. Лимфоцит по п.60, при этом образование комплекса исполнительного элемента с полинуклеотидом-мишенью приводит к понижающей регуляции экспрессии гена в лимфоците.

69. Лимфоцит по п.68, при этом ген представлен эндогенным геном.

70. Лимфоцит по п.69, при этом эндогенный ген кодирует иммунорегуляторный белок.

71. Лимфоцит по п.70, при этом иммунорегуляторный белок выбран из группы, в которую входят A2AR, B7.1, B7-H3/CD276, B7-H4/B7S1/B7x/Vtcn1, B7-H6, BTLA/CD272, CCR4, CD122, 4-1BB/CD137, CD27, CD28, CD40, CD47, CD70, CISH, CTLA-4/CD152, DR3, GITR, ICOS/CD278,IDO, KIR, LAG-3, OX40/CD134, PD-1/CD279, PD2, PD-L1, PD-L2, TIM-3 и VISTA/Dies1/Gi24/PD-1H (C10orf54).

72. Популяция лимфоцитов, экспрессирующая комбинацию полипептидов по любому из пп.1-3, где популяция лимфоцитов характеризуется тем, что исполнительный элемент высвобождается из GMP путем отщепления на сайте распознавания расщепления, когда рецепторный полипептид связывается с антигеном.

73. Способ индуцирования гибели клеток мишени, включающий воздействие на клетки мишени лимфоцитов по п.58, причем при воздействии лимфоцитов на клетки мишени рецепторный полипептид, экспрессируемый лимфоцитами, связывает антиген, содержащий антиген клеточной поверхности клеток мишени или антиген, секретируемый клетками мишени, причем связывание рецепторного полипептида с антигеном активирует цитотоксичность лимфоцитов, тем самым вызывая гибель клеток мишени.

74. Способ по п.73, при этом клетки мишени являются раковыми клетками.

75. Способ по п.73, при этом связывание рецепторного полипептида с антигеном активирует цитотоксичность лимфоцитов при высвобождении исполнительного элемента из GMP.

76. Способ по п.75, при этом исполнительный элемент регулирует экспрессию с полинуклеотида-мишени путем создания физической преграды полинуклеотиду-мишени или привлечения дополнительных факторов для эффективного подавления или усиления экспрессии с полинуклеотида-мишени.

77. Способ по п.75, при этом исполнительный элемент содержит активатор транскрипции для эффективного повышения экспрессии с полинуклеотида-мишени.

78. Способ по п.75, при этом исполнительный элемент содержит репрессор транскрипции для эффективного снижения экспрессии с полинуклеотида-мишени.

79. Способ по п.73, при этом полинуклеотид-мишень содержит геномную ДНК.

80. Способ по п.73, при этом полинуклеотид-мишень содержит РНК.

81. Способ по п.73, при этом модификация рецептора включает фосфорилирование.

82. Способ по п.73, при этом модификация рецептора включает модификацию по нескольким сайтам модификации, причем каждый сайт модификации эффективно связывает химерный адаптерный полипептид.

83. Способ по п.73, при этом исполнительный элемент включает CRISPR-ассоциированный (Cas) полипептид, нуклеазу с "цинковым пальцем" (ZFN), связанные с "цинковым пальцем" полипептиды регуляции генов, эффекторную нуклеазу типа активатора транскрипции (TALEN), связанные с эффекторной нуклеазой типа активатора транскрипции полипептиды регуляции генов, мегануклеазу, природные главные факторы транскрипции, эпигенетические модифицирующие ферменты, рекомбиназу, флиппазу, транспозазу, РНК-связывающие белки (RBP), белок Argonaute.

84. Способ по п.83, при этом исполнительный элемент включает Cas-белок, который образует комплекс с направляющей РНК (гидРНК).

85. Способ по п.84, при этом Cas-белок практически не обладает активностью расщепления ДНК.

86. Способ по п.73, при этом сайт распознавания расщепления содержит полипептидную последовательность, а расщепляющий элемент обладает протеазной активностью.

87. Способ условной регуляции лимфоцитов, который включает контактирование лимфоцитов по п.58 с антигеном, который связывается со взаимодействующим с антигеном доменом химерного полипептида трансмембранного рецептора, причем контактирование вызывает активацию или дезактивацию активности иммунных клеток, при этом происходит условная регуляция лимфоцитов.

88. Способ по п.87, при этом активность иммунных клеток выбрана из группы, состоящей из: клональной экспансии лимфоцитов; высвобождения цитокинов лимфоцитами; цитотоксичности лимфоцитов; пролиферации лимфоцитов; дифференцировки, дедифференцировки или трансдифференцировки лимфоцитов; перемещения и/или транспортировки лимфоцитов; истощения и/или реактивации лимфоцитов и высвобождения других межклеточных молекул, метаболитов, химических соединений или их комбинаций лимфоцитами.

89. Способ по п.87, при этом при связывании антигена со взаимодействующим с антигеном доменом рецепторного полипептида из GMP высвобождается исполнительный элемент для осуществления активации или дезактивации.

90. Химерный адаптерный полипептид, включающий:

(а) участок рецепторного связывания, который связывается с рецептором, подвергающимся модификации при связывании с антигеном, причем данный рецептор включает внутриклеточную область, содержащую сигнальный домен иммунной клетки; и

(б) ген-модулирующий полипептид (GMP), соединенный с участком рецепторного связывания; причем GMP содержит исполнительный элемент, соединенный с сайтом распознавания расщепления;

причем при связывании участка рецепторного связывания с рецептором, подвергшимся модификации, исполнительный элемент высвобождается из GMP путем отщепления на сайте распознавания расщепления.

91. Химерный адаптерный полипептид по п.90, при этом участок рецепторного связывания содержит связывающий домен молекулы, выбранной из группы, состоящей из ABL1, ABL2, APBA1, APBA2, APBA3, BCAR3, BLK, BLNK, BMX, BTK, CHN2, CISH, CRK, CRKL, CSK, DAPP1, DOK1, DOK2, DOK3, DOK4, DOK5, DOK6, DOK7, EAT-2, EPS8, EPS8L1, EPS8L2, EPS8L3, FER, FES, FGR, FRK, FRS2, FRS3, FYN, GADS, GRAP, GRAP2, GRB10, GRB14, GRB2, GRB7, HCK, HSH2D, INPP5D, INPL1, IRS1, IRS2, IRS3, IRS4, ITK, JAK2, LAT, LCK, LCP2, LYN, MATK, NCK1, NCK2, PIK3R1, PIK3R2, PIK3R3, PLCG1, PLC2, SH2D3A, SH2D3C, SH2D4A, SH2D4B, SH2D5, SH2D6, SH3BP2, SHB, SHC1, SHC2, SHC3, SHC4, SHD, SH2D3A, SH2D1B, SH2D2A, SH2D3A, SH2D3A, SH2D3A, SH2D3C, SH2D4A, SH2D4B, SH2D5, SH2D6, SH3BP2, SHC3, SHC4, SHE, SHP1, SHP2, SLA, SLA2, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6, SOCS7, SRC, SRMS, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6, SUPT6H, SYK, TEC, TENC1, TLN1, TLN2, TNS, TNS1, TNS3, TNS4, TXK, VAV1, VAV2, VAV3, YES1, ZAP70, X11a.

92. Химерный адаптерный полипептид по п.90, при этом химерный адаптерный полипептид включает по меньшей мере один нацеливающий пептид, который направляет транспорт химерного адаптерного полипептида в определенный район клетки.

93. Химерный адаптерный полипептид по п.92, при этом нацеливающий пептид направляет транспорт химерного адаптерного полипептида в ядро, цитоплазму, митохондрии, эндоплазматический ретикулум (ER), хлоропласты, апопласты, пероксисомы или плазматическую мембрану.

94. Химерный адаптерный полипептид по п.92, при этом нацеливающий пептид содержит сигнал ядерного экспорта (NES).

95. Химерный адаптерный полипептид по п.94, при этом NES соединяется с N-концом химерного адаптерного полипептида.

96. Химерный адаптерный полипептид по п.92, при этом нацеливающий пептид включает нацеливающий пептид для плазматической мембраны.

97. Химерный адаптерный полипептид по п.92, при этом нацеливающий пептид соединяется с исполнительным элементом.

98. Химерный адаптерный полипептид по п.97, при этом нацеливающий пептид содержит сигнал ядерной локализации (NLS).

99. Химерный адаптерный полипептид по п.98, при этом нацеливающий пептид, содержащий NLS и соединенный с исполнительным элементом, направляет транспорт исполнительного элемента в ядро клетки после высвобождения исполнительного элемента из GMP при отщеплении по сайту распознавания расщепления.

100. Химерный адаптерный полипептид по п.90, при этом исполнительный элемент включает CRISPR-ассоциированный (Cas) полипептид, нуклеазу типа "цинковый палец" (ZFN), связанные с "цинковым пальцем" полипептиды регуляции генов, эффекторную нуклеазу типа активатора транскрипции (TALEN), связанные с эффекторной нуклеазой типа активатора транскрипции полипептиды регуляции генов, мегануклеазу, природные главные факторы транскрипции, эпигенетические модифицирующие ферменты, рекомбиназу, флипазу, транспозазу, РНК-связывающие белки (RBP), белок Argonaute.

101. Химерный адаптерный полипептид по п.100, при этом исполнительный элемент включает Cas-белок, который образует комплекс с направляющей РНК (гидРНК).

102. Химерный адаптерный полипептид по п.101, при этом Cas-белок практически не обладает ак-

тивностью расщепления ДНК.

103. Химерный адаптерный полипептид по п.100, при этом исполнительный элемент регулирует экспрессию гена путем создания физической преграды полинуклеотиду-мишени или привлечения дополнительных факторов для эффективного подавления или усиления экспрессии гена с нуклеиновой кислоты-мишени.

104. Химерный адаптерный полипептид по п.100, при этом исполнительный элемент содержит активатор транскрипции для эффективного повышения экспрессии с полинуклеотида-мишени.

105. Химерный адаптерный полипептид по п.100, при этом исполнительный элемент содержит репрессор транскрипции для эффективного снижения экспрессии с полинуклеотида-мишени.

106. Химерный адаптерный полипептид по п.100, при этом сайт распознавания расщепления фланкирован участком рецепторного связывания и исполнительным элементом.

107. Химерный адаптерный полипептид по п.100, при этом сайт распознавания расщепления содержит последовательность распознавания расщепления, которая распознается протеазой.

108. Химерный адаптерный полипептид по п.107, при этом сайт распознавания расщепления содержит несколько последовательностей распознавания расщепления, причем каждая последовательность распознавания расщепления распознается одной и той же или разными протеазами.

109. Химерный адаптерный полипептид по п.107, при этом последовательность распознавания расщепления распознается протеазой, выбранной из группы, в которую входят ахромопептидаза, аминоксипептидаза, анкрод, ангиотензин-превращающий фермент, бромелаин, кальпаин, кальпаин I, кальпаин II, карбоксипептидаза А, карбоксипептидаза В, карбоксипептидаза G, карбоксипептидаза Р, карбоксипептидаза W, карбоксипептидаза Y, каспаза 1, каспаза 2, каспаза 3, каспаза 4, каспаза 5, каспаза 6, каспаза 7, каспаза 8, каспаза 9, каспаза 10, каспаза 11, каспаза 12, каспаза 13, катепсин В, катепсин С, катепсин D, катепсин Е, катепсин G, катепсин Н, катепсин L, химопапаин, химаза, химотрипсин, кластрипаин, коллагеназа, комплемент C1g, комплемент C1s, фактор D комплемента, фактор I комплемента, кукумизин, дипептидилпептидаза IV, эластаза (лейкоцитарная), эластаза (панкреатическая), эндопротеиназа Arg-C, эндопротеиназа Asp-N, эндопротеиназа Glu-C, эндопротеиназа Lys-C, энтерокиназа, фактор Ха, фицин, фузин, гранзим А, гранзим В, протеаза ВИЧ, IG-аза, тканевой калликреин, лейцин-аминопептидаза (общая), лейцин-аминопептидаза (цитозольная), лейцин-аминопептидаза (микросомальная), матриксная металлопротеаза, метионин-аминопептидаза, нейтраза, папаин, пепсин, плазмин, пролидаза, проназа Е, простатоспецифичный антиген, алкалофильная протеаза из *Streptomyces griseus*, протеаза *Aspergillus*, протеаза из *Aspergillus saitoi*, протеаза из *Aspergillus sojae*, протеаза *B. licheniformis* (щелочная или алкалаза), протеаза из *Bacillus polymyxa*, протеаза из *Bacillus sp.*, протеаза из *Rhizopus sp.*, протеаза S, протеасомы, протеиназа из *Aspergillus oryzae*, протеиназа 3, протеиназа А, протеиназа К, белок С, пироглутамат-аминопептидаза, ренин, реннин, стрептокиназа, субтилизин, термолизин, тромбин, активатор тканевого плазминогена, трипсин, триптаза и урокиназа.

110. Химерный полипептид трансмембранного рецептора, включающий:

(а) внеклеточную область, содержащую взаимодействующий с антигеном домен, который связывает антиген, и

(b) внутриклеточную область, содержащую сигнальный домен иммунной клетки; и ген-модулирующий полипептид (GMP), соединенный с сигнальным доменом иммунной клетки; причем GMP содержит исполнительный элемент, соединенный с сайтом распознавания расщепления;

причем при связывании антигена со внеклеточной областью (i) внутриклеточная область рецептора модифицируется и (ii) адаптерный полипептид, содержащий домен рецепторного связывания и расщепляющий домен, рекрутируется к рецептору для сближения расщепляющего элемента и сайта распознавания расщепления, чтобы расщепляющий элемент расщепил сайт распознавания расщепления для высвобождения исполнительного элемента из GMP.

111. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.110, при этом взаимодействующий с антигеном домен связывает мембраносвязанный антиген.

112. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.110, при этом взаимодействующий с антигеном домен связывает антиген, который не связан с мембраной.

113. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.110, при этом взаимодействующий с антигеном домен связывает антитело.

114. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.113, при этом взаимодействующий с антигеном домен связывает по меньшей мере одну Fc-область, Fv-область, тяжелую цепь или легкую цепь антитела.

115. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.114, при этом взаимодействующий с антигеном домен связывает Fc-область антитела.

116. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.110, при этом взаимодействующий с антигеном домен включает, по меньшей мере, Fab, одноцепочечный Fv (scFv), внеклеточный рецепторный домен или Fc-связывающий домен.

117. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.116, при этом взаимодействующий с антигеном домен включает Fc-связывающий домен, содержащий Fc-рецептор или его фрагмент.

118. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.117, при этом взаимодействующий с антигеном домен включает Fc-связывающий домен, содержащий FcγRI (CD64), FcγRIa, FcγRIb, FcγRIc, FcγRIIA (CD32), FcγRIIA (CD32, H131), FcγRIIA (CD32, R131), FcγRIIB (CD32), FcγRIIB-1, FcγRIIB-2, FcγRIIA (CD16a, V158), FcγRIIA (CD16a, F158), FcγRIIB (CD16b, FcγRIIB-NA1), FcγRIIB (CD16b, FcγRIIB-NA2), FcεRI, FcεRII (CD23), FcαRI (CD89), Fcα/μR, FcRn.

119. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.110, при этом взаимодействующий с антигеном домен связывает антиген, включающий антитело, которое в свою очередь связывает антиген, выбранный из группы, в которую входят β-амилоид 1-40, 4-1BB, 5A3, 5T4, киназа-1 типа рецептора активина, ACVR2B, антиген аденокарциномы, AGS-22M6, альфа-фетопротейн, ангиопоэтин 2, ангиопоэтин 3, сибирезвенный токсин, AOC3 (VAP-1), B7-H3, токсин *Bacillus anthracis*, BAFF, бета-амилоид, клетки В-лимфомы, антиген C242, C5, CA-125, IL31 собаки (*Canis lupus familiaris*), карбоангидраза 9 (CA-IX), сердечный миозин, CCL11 (эотаксин-1), CCR4, CCR5, CD11, CD18, CD125, CD140a, CD147 (базигин), CD15, CD152, CD154 (CD40L), CD19, CD2, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23 (рецептор IgE), CD25 (α-цепь рецептора IL-2), CD27, CD274, CD28, CD3, CD3-эпсилон, CD30, CD33, CD37, CD38, CD4, CD40, лиганд CD40, CD41, CD44 v6, CD5, CD51, CD52, CD56, CD6, CD70, CD74, CD79B, CD80, CEA, родственник CEA антиген, CFD, ch4D5, CLDN18.2, *Clostridium difficile*, фактор слипания A, CSF1R, CSF2, CTLA-4, рецептор-4 хемокинов типа C-X-C, цитомегаловирус, гликопротеин В цитомегаловируса, дабигатран, DLL4, DPP4, DR5, шигатоксин *E. coli* 1 типа, шигатоксин *E. coli* 2 типа, EGFL7, EGFR, эндотоксин, ЕpCAM, эписиалин, ERBB3, *Escherichia coli*, F-белок респираторно-синцитиального вируса, FAP, бета-цепь фибрина II, дополнительный домен-В фибронектина, фолатгидролаза, рецептор фолата 1, альфа-рецептор фолата, рецептор Frizzled, ганглиозид GD2, GD2, ганглиозид GD3, глипикан 3, α-цепь рецептора GMCSF, GPNMB, фактор роста и дифференцировки 8, GUCY2C, гемагглютинин, поверхностный антиген гепатита В, вирус гепатита В, HER1, HER2/neu, HER3, HGF, HNGFR, гистоновый комплекс, HIV-1, HLA-DR, HNGF, Hsp90, киназа рецептора фактора роста гепатоцитов (scatter factor) человека, TNF человека, бета-амилоид человека, ICAM-1 (CD54), IFN-α, IFN-γ, IgE, Fc-область IgE, рецептор IGF-1, IGF-1, IGHE, IL 17A, IL 17F, IL 20, IL-12, IL-13, IL-17, IL-1β, IL-22, IL-23, IL-31RA, IL-4, IL-5, IL-6, рецептор IL-6, IL-9, ILGF2, гемагглютинин вируса гриппа А, рецептор инсулиноподобного фактора роста I, интегрин α4β7, α4-интегрин, интегрин α5β1, интегрин α7β7, интегрин αIIbβ3, интегрин αvβ3, рецептор α/β-интерферона, индуцированный γ-интерфероном белок, ITGA2, ITGB2 (CD18), KIR2D, антиген Lewis-Y, LFA-1 (CD11a), LINGO-1, липотейхоевая кислота, LOXL2, L-селектин (CD62L), LTA, MCP-1, мезотелин, MIF, MS4A1, MSLN, MUC1, CanAg муцина, связанный с миелином гликопротеин, миостатин, NCA-90 (антиген гранулоцитов), регулируемая апоптозом невральная протеиназа 1, NGF, N-гликолилнейраминавая кислота, NOGO-A, рецептор Notch, NRP1, *Oryctolagus cuniculus*, OX-40, oxLDL, PCSK9, PD-1, PDCD1, PDGF-Rα, котранспортер фосфата-натрия, фосфатидилсерин, бета-рецептор тромбоцитарного фактора роста, клетки карциномы простаты, *Pseudomonas aeruginosa*, гликопротеин вируса бешенства, RANKL, респираторно-синцитиальный вирус, RHD, резус-фактор, RON, RTN4, склеростин, SDC1, селектин P, SLAMF7, SOST, сфингозин-1-фосфат, *Staphylococcus aureus*, STEAP1, TAG-72, T-клеточный рецептор, TEM1, тенасцин С, TFPI, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β, TNF-α, TRAIL-R1, TRAIL-R2, опухолевый антиген СТАА16.88, опухолеспецифичный гликозилированный MUC1, связанный с опухолями передатчик кальциевых сигналов 2, рецептор TWEAK, TYRP1 (гликопротеин 75), VEGFA, VEGFR1, VEGFR2, виментин и VWF.

120. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.117, при этом взаимодействующий с антигеном домен связывает Fc-область антитела, выбранного из группы, в которую входят 20-(74)-(74) (милатузумаб, велтузумаб), 20-2b-2b, 3F8, 74-(20)-(20) (милатузумаб, велтузумаб), 8H9, A33, AB-16B5, абаговомаб, абциксимаб, абитузумаб, ABP 494 (биоаналог цетуксимаба), абрилумаб, АВТ-700, АВТ-806, актимаб-А (Ac-225 актиний-линтузумаб), актоксумаб, адалимумаб, ADC-1013, ADCT-301, ADCT-402, адекватумаб, адуканумаб, афелимомаб, AFM13, афутузумаб, AGEN1884, AGS15E, AGS16C3F, AGS67E, алацизумаб-пегол, ALD518, алемтузумаб, алирокумаб, алтумомаб пентетат, аматуксимаб, AMG 228, AMG 820, анатумомаб мафенатокс, анетумаб равтансин, анифролумаб, анрукинумаб, APN301, APN311, аполизумаб, APX003/SIM-BD0801 (севацизумаб), APX005M, арцитумомаб, ARX788, аскринвакумаб, аселизумаб, ASG-15ME, атезолизумаб, атинумаб, ATL101, алтизумаб (также известен как тоцилизумаб), аторолимумаб, авелумаб, В-701, бапинеузумаб, базиликсимаб, бавитуксимаб, BAY1129980, BAY1187982, бектумомаб, бегеломаб, белимумаб, бенрализумаб, бертилимумаб, бесилесомаб, беталутин (¹⁷⁷Lu-тетракетсан-тетуломаб), бевацизумаб, BEVZ92 (биоаналог бевацизумаба), безлотоксумаб, BGB-A317, BHQ880, BI 836880, BI-505, бициромаб, бимагрумаб, бимекизумаб, биватузумаб мертансин, BIW-8962, блинагумаб, блосозумаб, BMS-936559, BMS-986012, BMS-986016, BMS-986148, BMS-986178, BNC101, бокоцизумаб, брентуксимаб ведотин, BrevaRex, бриакинумаб, бродалумаб, бролуцизумаб, бронтикузумаб, C2-2b-2b, канакинумаб, кантузумаб мертансин, кантузумаб равтансин, каплацизумаб, капромаб пендетид, карлумаб, катумаксумаб, иммуноконъюгат CBR96-доксорубин, СВТ124 (бевацизумаб), CC-90002, CDX-014, CDX-1401, цеделизумаб, цертолизумаб-пегол, цетуксимаб, CGEN-15001T, CGEN-15022, CGEN-15029, CGEN-15049, CGEN-15052, CGEN-15092, Ch.14.18, цитатузумаб богатоке,

циксутумумаб, клазакизумаб, кленоликсимаб, кливатузумаб тетраксетан, CM-24, кодритузумаб, колтуксимаб равтансин, конатумумаб, концизумаб, Cotara (I-131 йод-дерлотуксимаб-биотин), cR6261, кренезумаб, DA-3111 (биоаналог трастузумаба), дацетузумаб, даклизумаб, далотузумаб, дапиролузумаб-пегол, даратумумаб, даратумумаб Enhance (даратумумаб), дарлейкин, дектрекумаб, демцизумаб, денинтузумаб мафодотин, деносумаб, депатуксизумаб, депатуксизумаб мафодотин, дерлотуксимаб-биотин, детумомаб, DI-B4, динутуксимаб, диридавумаб, DKN-01, DMOT4039A, дорлимомаб аритокс, дрозитумаб, DS-1123, DS-8895, дулиготумаб, дупилумаб, дурвалумаб, дусигитумаб, экроексимаб, экулизумаб, эдобакомаб, эдреколомаб, эфализумаб, эфунгумаб, элделумаб, элгемтумаб, элотузумаб, элсилимомаб, эмактузумаб, эмибетузумаб, энаватузумаб, энфортумаб ведотин, энлимомаб-пегол, эноблитузумаб, энокизумаб, энотикумаб, энситуксимаб, эпитумомаб цитуксетан, эпратузумаб, эрлизумаб, эртумаксумаб, этарацизумаб, этролизумаб, эвинакумаб, эволокумаб, эксбивирумаб, фанолесумаб, фаралимомаб, фарлетузумаб, фасинумаб, FBTA05, фелвизумаб, фезакинумаб, FF-21101, конъюгат антители-препарат FGFR2, Fibromun, фиклатузумаб, фигитумумаб, фиривумаб, фланвотумаб, флетикумаб, фонтолизумаб, форалумаб, форавирумаб, FPA144, фресолимумаб, FS102, фулранумаб, футуксимаб, галиксимаб, ганитумаб, гантенерумаб, гавилимомаб, гемтузумаб озогамин, герилизумаб, гевокизумаб, гевоксизумаб, гирентуксимаб, глембатумумаб ведотин, GNR-006, GNR-011, голимумаб, гомиликсимаб, GSK2849330, GSK2857916, GSK3174998, GSK3359609, гуселкумаб, mAb Hu14.18K322A, hu3S193, Hu8F4, HuL2G7, HuMab-5B1, ибализумаб, ибритумомаб тиуксетан, икрукумаб, идаруцизумаб, IGN002, IGN523, иговомаб, IMAB362, IMAB362 (клаудиксимаб), ималумаб, IMC-CS4, IMC-D11, имциромаб, имгатузумаб, IMG529, IMMU-102 (Y-90 иттрий-эпратузумаб тетраксетан), IMMU-114, антагонистическое антители ImmuTune IMP701, INCAGN1876, инклакумаб, INCSHR1210, индатуксимаб равтансин, индусатумаб ведотин, инфликсимаб, инолимомаб, инотузумаб озогамин, интетумумаб, Iraftcept, IPH4102, ипилимумаб, иратумумаб, изатуксимаб, истиратумаб, итолизумаб, иксекизумаб, JNJ-56022473, JNJ-61610588, келиксимаб, KTN3379, L191L2/L19TNF, лабетузумаб, лабетузумаб говитекан, LAG525, ламбролизумаб, лампализумаб, L-DOS47, лебрикизумаб, лемалесумаб, лензилумаб, лерделимумаб, лейкотуксимаб, лексатумумаб, либивирумаб, лифастузумаб ведотин, лигелизумаб, лилотомаб сатетраксетан, линтузумаб, лирилумаб, LKZ145, лоделцизумаб, локиветмаб, лорвотузумаб мертансин, лукатумумаб, лулизумаб-пегол, люмиликсимаб, люмретузумаб, LY3164530, мапатумумаб, маргетуксимаб, маслимомаб, мартузумаб, маврилимумаб, MB311, MCS-110, MEDI0562, MEDI-0639, MEDI0680, MEDI-3617, MEDI-551 (инебилизумаб), MEDI-565, MEDI6469, меполизумаб, метелимумаб, MGB453, MGD006/S80880, MGD007, MGD009, MGD011, милатузумаб, милатузумаб-SN-38, минретумомаб, мирветуксимаб соравтанзин, митумомаб, MK-4166, MM-111, MM-151, MM-302, могамулизумаб, MOR202, MOR208, MORAb-066, моролимумаб, мотавизумаб, моксетумомаб пасудотокс, муромонаб-CD3, наколомаб тафенатокс, намилиумаб, наптумомаб эстафенатокс, нарнатумаб, натализумаб, небакумаб, нецитумумаб, немолизумаб, нерелимомаб, несвакумаб, нимотузумаб, ниволумаб, нофетумомаб мерпентан, NOV-10, обилтоксаксимаб, обинутузумаб, окаратузумаб, окрелизумаб, одулимомаб, офатумумаб, оларатумаб, олокизумаб, омализумаб, OMP-131R10, OMP-305B83, онартузумаб, онтуксизумаб, опицинумаб, опортузумаб монатокс, ореговомаб, ортикумаб, отеликсизумаб, олпертузумаб, OX002/MEN1309, окселумаб, озанезумаб, озорализумаб, пагибаксимаб, палилвизумаб, панитумумаб, панкомаб, PankoMab-GEX, панобакумаб, парсагузумаб, пасколизумаб, пасотуксизумаб, патеклизумаб, патритумаб, PAT-SC1, PAT-SM6, пембролизумаб, пемтумомаб, перакизумаб, пергузумаб, пекселизумаб, PF-05082566 (утомилумаб), PF-06647263, PF-06671008, PF-06801591, пидилизумаб, пинатузумаб ведотин, пинтумомаб, плакулумаб, полатузумаб ведотин, понезумаб, приликсимаб, притоксаксимаб, притумумаб, PRO 140, Proxipium, PSMA ADC, квилизумаб, ракотумомаб, радретумаб, рафивирумаб, ралпанцизумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, рефанезумаб, регавирумаб, REGN1400, REGN2810/SAR439684, реслизумаб, RFM-203, RG7356, RG7386, RG7802, RG7813, RG7841, RG7876, RG7888, RG7986, рилотумумаб, ринукумаб, ритуксимаб, RM-1929, RO7009789, робатумумаб, роледумаб, ромосозумаб, ронтализумаб, ровелизумаб, руплизумаб, сацитузумаб говитекан, самализумаб, SAR 408701, SAR566658, сарилумаб, SAT 012, сатумомаб пендетид, SCT200, SCT400, SEA-CD40, секукинумаб, серибантумаб, сетоксаксимаб, севирумаб, SGN-CD19A, SGN-CD19B, SGN-CD33A, SGN-CD70A, SGN-LIV1A, сибротузумаб, сифалимумаб, силтуксимаб, симтузумаб, силлизумаб, сирукумаб, софитузумаб ведотин, соланезумаб, солитомаб, сонепцизумаб, сонтузумаб, стамулумаб, сулесумаб, сувизумаб, SYD985, SYM004 (футуксимаб и модотуксимаб), Sym015, TAB08, табалумаб, такатузумаб тетраксетан, тадоцизумаб, тализумаб, танезумаб, танибрирумаб, таплитумомаб паптокс, тарекстумаб, TB-403, тефибазумаб, Teleukin, телимомаб аритокс, тенатумомаб, тенеликсимаб, теплизумаб, тепротумумаб, тесидолумаб, тетуломаб, TG-1303, TGN1412, конъюгат торий-227-эпратузумаб, тицилимумаб, тигатузумаб, тилдракизумаб, тисотумаб ведотин, TNX-650, тоцилизумаб, торализумаб, тосатоксумаб, тоситумомаб, товетумаб, тралокинумаб, трастузумаб, трастузумаб эмтансин, TRBS07, TRC105, трегализумаб, тремелимумаб, тревогрумаб, TRPH 011, TRX518, TSR-042, TTI-200.7, тукотузумаб целмолейкин, тувирумаб, U3-1565, U3-1784, ублитуксимаб, улокуплумаб, урелумаб, уртоксазумаб, устекинумаб, вадастуксимаб, Taligine, вандортузумаб ведотин, вантисумаб, вануцизумаб, вапаликсимаб, варлилумаб, вателизумаб, VB6-845, ведолизумаб, велтузумаб, вепалимомаб, весенкумаб, весилизумаб, волоциксимаб, ворсетузумаб мафодотин, вотумумаб, YUV-101, залутумумаб, занолимумаб, затуксимаб, зиралимумаб и золимо-

маб аритокс.

121. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.110, при этом внеклеточная область содержит несколько взаимодействующих с антигеном доменов, каждый из которых проявляет связывание с одним и тем же или разными антигенами.

122. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.110, при этом взаимодействующий с антигеном домен связывает антиген, выбранный из группы, в которую входят биотинилированная молекула 707-AP, α -актинин-4, abl-bcr alb-b3 (b2a2), abl-bcr alb-b4 (b3a2), адипофилин, AFP, AIM-2, аннексин II, ART-4, BAGE, β -катенин, bcr-abl, bcr-abl p190 (e1a2), bcr-abl p210 (b2a2), bcr-abl p210 (b3a2), BING-4, CAG-3, CAIX, CAMEL, каспаза-8, CD171, CD 19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44v7/8, CDC27, CDK-4, CEA, CLCA2, Cyp-B, DAM-10, DAM-6, DEK-CAN, EGFRvIII, EGP-2, EGP-40, ELF2, Ep-CAM, EphA2, EphA3, erb-B2, erb-B3, erb-B4, ES-ESO-1a, ETV6/AML, FBP, фетальный ацетилюлиновый рецептор, FGF-5, FN, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7B, GAGE-8, GD2, GD3, GnT-V, Gp100, gp75, Her-2, HLA-A* 0201-R170I, HMW-MAA, HSP70-2M, HST-2 (FGF6), HST-2/neu, hTERT, iCE, IL-11R α , IL-13R α 2, KDR, KIAA0205, K-RAS, молекула клеточной адгезии L1, LAGE-1, LDLR/FUT, Lewis Y, MAGE-1, MAGE-10, MAGE-12, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-6, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-B1, MAGE-B2, "яблочный" фермент, маммаглобин-A, MART-1/Melan-A, MART-2, MC1R, M-CSF, мезотелин, MUC1, MUC16, MUC2, MUM-1, MUM-2, MUM-3, миозин, NA88-A, Neo-PAP, NKG2D, NPM/ALK, N-RAS, NY-ESO-1, OA1, OGT, онко-фетальный антиген (h5T4), OS-9, полипептид P, P15, P53, PRAME, PSA, PSCA, PSMA, PTPRK, RAGE, ROR1, RU1, RU2, SART-1, SART-2, SART-3, SOX10, SSX-2, сурвивин, сурвивин-2B, SYT/SSX, TAG-72, TEL/AML1, TGF β RII, TGF β RII, TP1, TRAG-3, TRG, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TRP-2-6b, тирозиназа, VEGF-R2, WT1, α -фолатный рецептор и легкая к-цепь.

123. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.110, при этом сигнальный домен иммунной клетки включает первичный сигнальный домен, содержащий активационный мотив иммуно-рецептора на основе тирозина (ITAM).

124. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.110, при этом сигнальный домен иммунной клетки включает первичный сигнальный домен, содержащий ингибирующий мотив иммуно-рецептора на основе тирозина (ITIM).

125. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.110, при этом сигнальный домен иммунной клетки включает первичный сигнальный домен белка, выбранного из группы, в которую входят рецептор Fc γ (Fc γ R), рецептор Fc ϵ (Fc ϵ R), рецептор Fc α (Fc α R), неонатальный Fc-рецептор (FcRn), CD3, CD3 ζ , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD4, CD5, CD8, CD21, CD22, CD28, CD32, CD40L (CD154), CD45, CD66d, CD79a, CD79b, CD80, CD86, CD278 (также известен как ICOS), CD247 ζ , CD247 η , DAP10, DAP12, FYN, LAT, Lck, MAPK, комплекс MHC, NFAT, NF- κ B, PLC- γ , iC3b, C3dg, C3d и Zap70.

126. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.125, при этом первичный сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3 ζ .

127. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.126, при этом первичный сигнальный домен содержит активационный мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITAM) из CD3 ζ .

128. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.110, при этом сигнальный домен иммунной клетки включает костимулирующий домен.

129. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.128, при этом сигнальный домен иммунной клетки включает несколько костимулирующих доменов.

130. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.128, при этом костимулирующий домен включает сигнальный домен молекулы MHC класса I, белка рецептора TNF, иммуноглобулиноподобного белка, рецептора цитокинов, интегрин, сигнальной молекулы активации лимфоцитов (белка SLAM), активирующего рецептора NK-клеток или рецептора типа Toll.

131. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.128, при этом костимулирующий домен включает сигнальный домен молекулы, выбранной из группы, в которую входят 2B4/CD244/SLAMF4, 4-1BB/TNFSF9/CD137, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BAFF R/TNFRSF13C, BAFF/BLyS/TNFSF13B, BLAME/SLAMF8, BTLA/CD272, CD100 (SEMA4D), CD103, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD150, CD160 (BY55), CD18, CD19, CD2, CD200, CD229/SLAMF3, лиганд CD27/TNFSF7, CD27/TNFRSF7, CD28, CD29, CD2F-10/SLAMF9, лиганд CD30/TNFSF8, CD30/TNFRSF8, CD300a/LMIR1, CD4, лиганд CD40/TNFSF5, CD40/TNFRSF5, CD48/SLAMF2, CD49a, CD49D, CD49f, CD53, CD58/LFA-3, CD69, CD7, CD8 α , CD8 β , CD82/Kai-1, CD84/SLAMF5, CD90/Thy1, CD96, CDS, CEACAM1, CRACC/SLAMF7, CRTAM, CTLA-4, DAP12, дектин-1/CLEC7A, DNAM1 (CD226), DPPIV/CD26, DR3/TNFRSF25, EphB6, GADS, Gi24/VISTA/B7-H5, лиганд GITR/TNFSF18, GITR/TNFRSF18, HLA класса I, HLA-DR, HVEM/TNFRSF14, IA4, ICAM-1, ICOS/CD278, Ikaros, IL2R β , IL2R γ , IL7R α , α 4-интегрин/CD49d, интегрин α 4 β 1, интегрин α 4 β 7/LPAM-1, IPO-3, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB1, ITGB2, ITGB7, KIRDS2, LAG-3, LAT, LIGHT/TNFSF14, LTBR, Ly108, Ly9 (CD229), связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), α -лимфотоксин/TNF- β , NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), NTB-A/SLAMF6,

лиганд OX40/TNFSF4, OX40/TNFRSF4, PAG/Cbp, PD-1, PDCD6, PD-L2/B7-DC, PSGL1, RELT/TNFRSF19L, SELPLG (CD162), SLAM (SLAMF1), SLAM/CD150, SLAMF4 (CD244), SLAMF6 (NTB-A), SLAMF7, SLP-76, TACI/TNFRSF13B, TCL1A, TCL1B, TIM-1/KIM-1/HAVCR, TIM-4, TL1A/TNFSF15, TNF RII/TNFRSF1B, TNF- α , TRANCE/RANKL, TSLP, TSLPR, VLA1 и VLA-6.

132. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.128, при этом костимулирующий домен регулирует пролиферативный сигнал и/или сигнал выживания иммунных клеток.

133. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.110, при этом исполнительный элемент включает CRISPR-ассоциированный (Cas) полипептид, нуклеазу типа "цинковый палец" (ZFN), связанный с "цинковым пальцем" полипептид регуляции генов, эффекторную нуклеазу типа активатора транскрипции (TALEN), связанный с эффекторной нуклеазой типа активатора транскрипции полипептид регуляции генов, мегануклеазу, природный главный фактор транскрипции, эпигенетический модифицирующий фермент, рекомбиназу, флиппазу, транспозазу, РНК-связывающие белки (RBP), белок Argonaute.

134. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.133, при этом исполнительный элемент включает Cas-белок, который образует комплекс с направляющей РНК (гидРНК).

135. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.134, при этом Cas-белок практически не обладает активностью расщепления ДНК.

136. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.110, при этом исполнительный элемент регулирует экспрессию гена путем создания физической преграды полинуклеотиду-мишени или привлечения дополнительных факторов для эффективного подавления или усиления экспрессии гена с нуклеиновой кислоты-мишени.

137. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.110, при этом исполнительный элемент содержит активатор транскрипции для эффективного повышения экспрессии с полинуклеотида-мишени.

138. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.110, при этом исполнительный элемент содержит репрессор транскрипции для эффективного снижения экспрессии с полинуклеотида-мишени.

139. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.110, при этом сайт распознавания расщепления фланкирован сигнальным доменом иммунной клетки и исполнительным элементом.

140. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.110, при этом сайт распознавания расщепления содержит последовательность распознавания расщепления, которая распознается протеазой.

141. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.140, при этом сайт распознавания расщепления содержит несколько последовательностей распознавания расщепления, причем каждая последовательность распознавания расщепления распознается одной и той же или разными протеазами.

142. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.140, при этом последовательность распознавания расщепления распознается протеазой, выбранной из группы, в которую входят ахромопептидаза, аминопептидаза, анкрод, ангиотензин-превращающий фермент, бромелаин, кальпаин, кальпаин I, кальпаин II, карбоксипептидаза А, карбоксипептидаза В, карбоксипептидаза G, карбоксипептидаза Р, карбоксипептидаза W, карбоксипептидаза Y, каспаза 1, каспаза 2, каспаза 3, каспаза 4, каспаза 5, каспаза 6, каспаза 7, каспаза 8, каспаза 9, каспаза 10, каспаза 11, каспаза 12, каспаза 13, катепсин В, катепсин С, катепсин D, катепсин Е, катепсин G, катепсин H, катепсин L, химопапаин, химаза, химотрипсин, кластрипаин, коллагеназа, комплемент C1r, комплемент C1s, фактор D комплемента, фактор I комплемента, кукумизин, дипептидилпептидаза IV, эластаза (лейкоцитарная), эластаза (панкреатическая), эндопротеиназа Arg-C, эндопротеиназа Asp-N, эндопротеиназа Glu-C, эндопротеиназа Lys-C, энтерокиназа, фактор Ха, фицин, фурин, гранзим А, гранзим В, протеаза ВИЧ, IG-аза, тканевой калликреин, лейцин-аминопептидаза (общая), лейцин-аминопептидаза (цитозольная), лейцин-аминопептидаза (микросомальная), матриксная металлопротеаза, метионин-аминопептидаза, нейтраза, папаин, пепсин, плазмин, пролидаза, проназа Е, простатоспецифичный антиген, алкалофильная протеаза из *Streptomyces griseus*, протеаза *Aspergillus*, протеаза из *Aspergillus saitoi*, протеаза из *Aspergillus sojae*, протеаза *B. licheniformis* (щелочная или алкалаза), протеаза из *Bacillus polymyxa*, протеаза из *Bacillus sp.*, протеаза из *Rhizopus sp.*, протеаза S, протеасомы, протеиназа из *Aspergillus oryzae*, протеиназа 3, протеиназа А, протеиназа К, белок С, пироглутамат-аминопептидаза, ренин, реннин, стрептокиназа, субтилизин, термолизин, тромбин, активатор тканевого плазминогена, трипсин, триптаза и урокиназа.

143. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.110, дополнительно включающий по меньшей мере один нацеливающий пептид, который направляет транспорт рецептора в определенный район клетки.

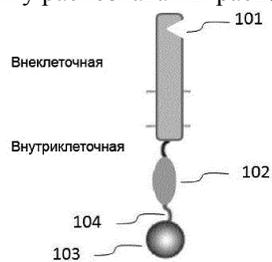
144. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.143, при этом нацеливающий пептид направляет транспорт рецептора в ядро, митохондрии, эндоплазматический ретикулум (ER), хлоропласты, пероксисомы или плазматическую мембрану.

145. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.143, при этом нацеливающий пептид содержит сигнал ядерного экспорта (NES).

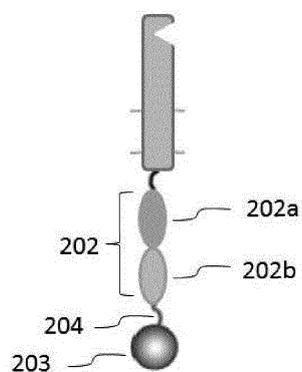
146. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.143, при этом нацеливающий пептид включает нацеливающий пептид для плазматической мембраны.

147. Химерный полипептид трансмембранного рецептора по п.143, при этом нацеливающий пептид соединяется с исполнительным элементом, необязательно при этом нацеливающий пептид содержит сигнал ядерной локализации (NLS), необязательно

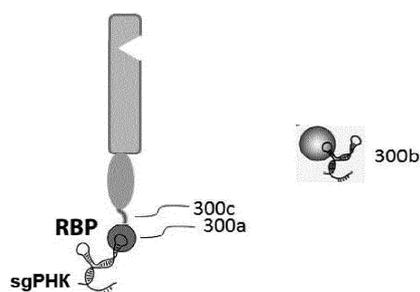
при этом нацеливающий пептид, содержащий NLS и соединенный с исполнительным элементом, направляет транспорт исполнительного элемента в ядро клетки после высвобождения исполнительного элемента из GMP при отщеплении по сайту распознавания расщепления.



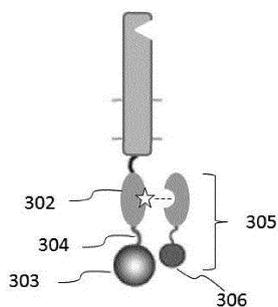
Фиг. 1



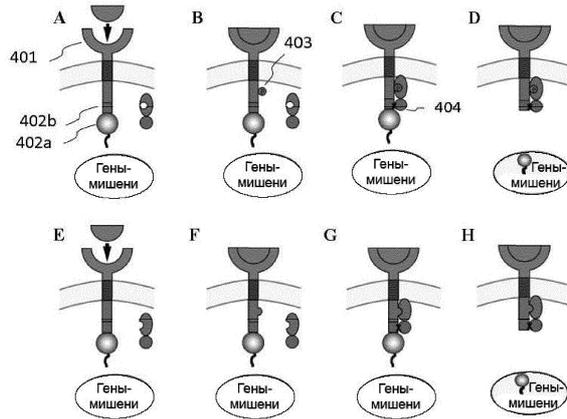
Фиг. 2



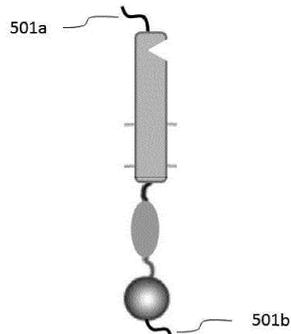
Фиг. 3А



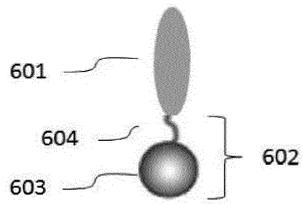
Фиг. 3В



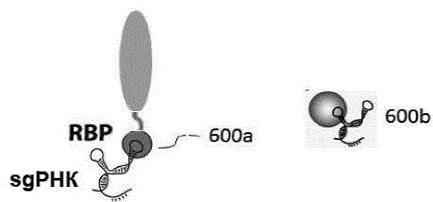
Фиг. 4



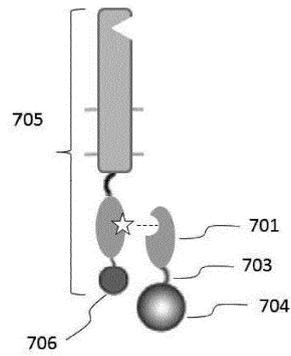
Фиг. 5



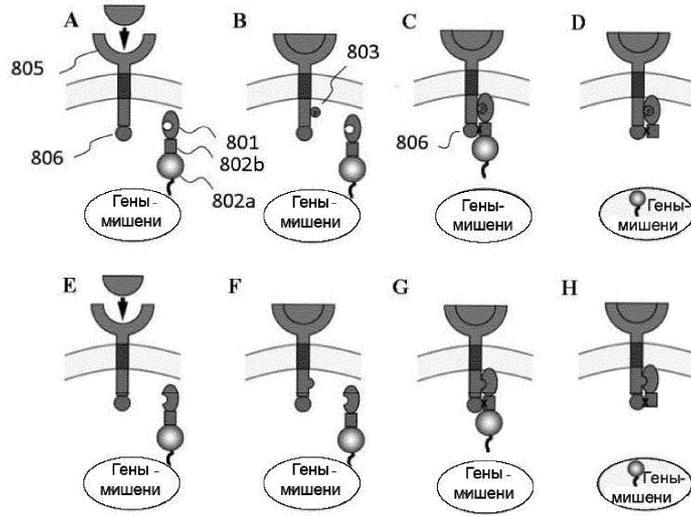
Фиг. 6А



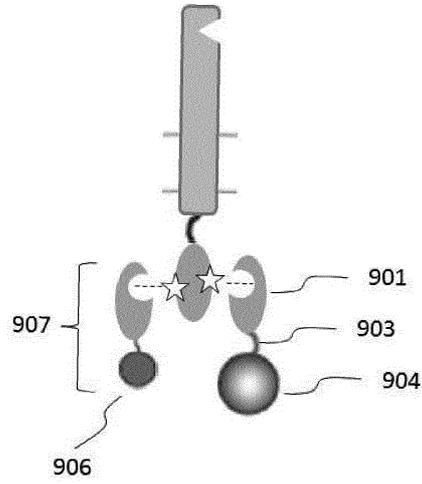
Фиг. 6В



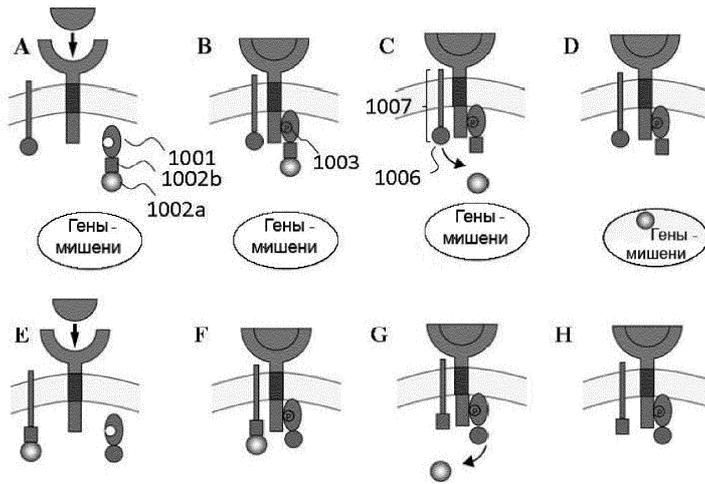
Фиг. 7



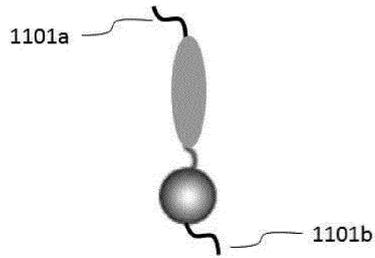
Фиг. 8



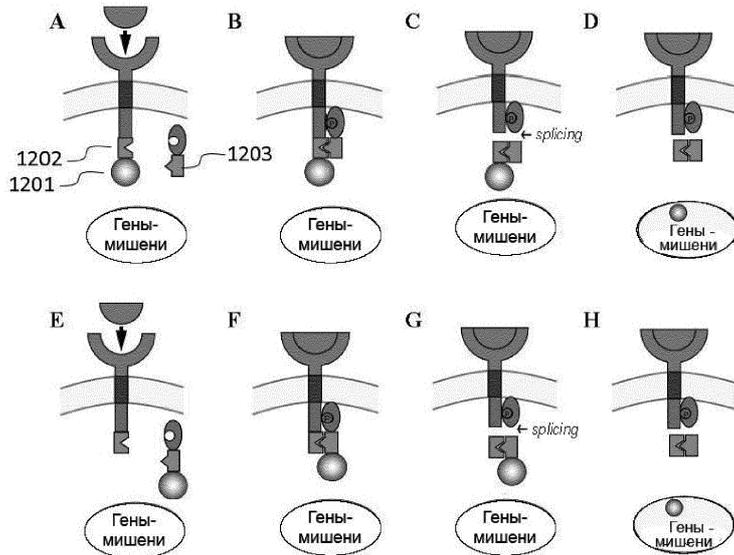
Фиг. 9



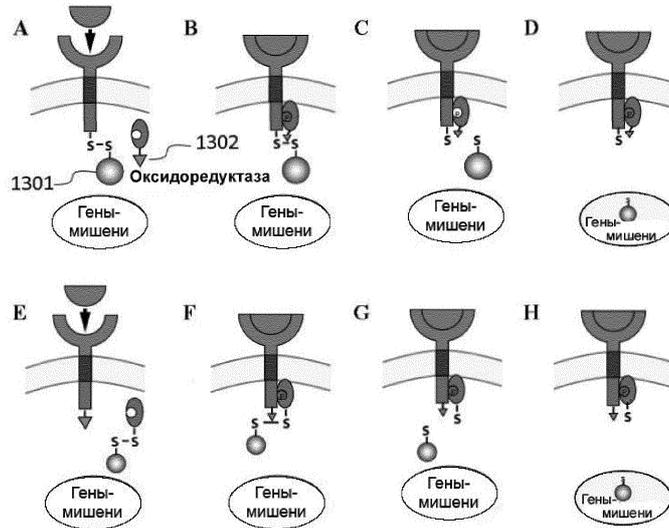
Фиг. 10



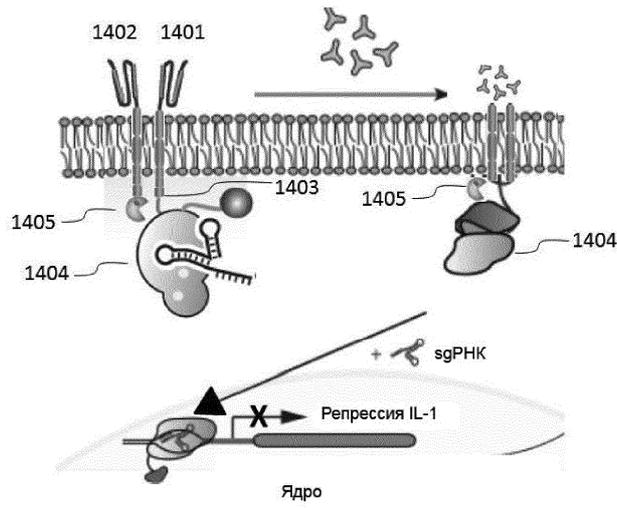
Фиг. 11



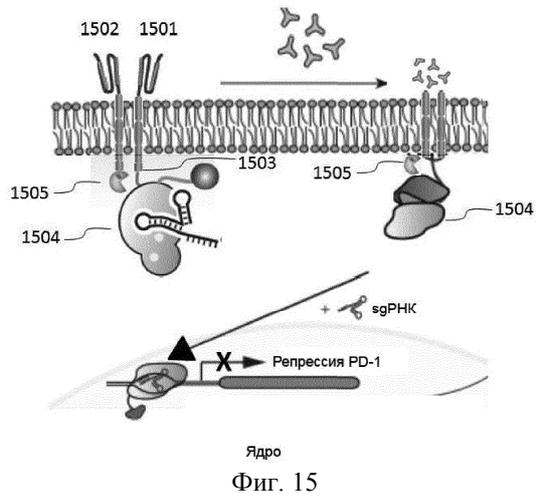
Фиг. 12



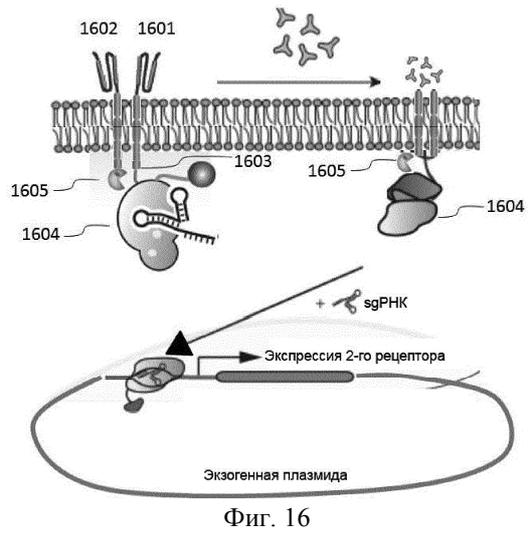
Фиг. 13



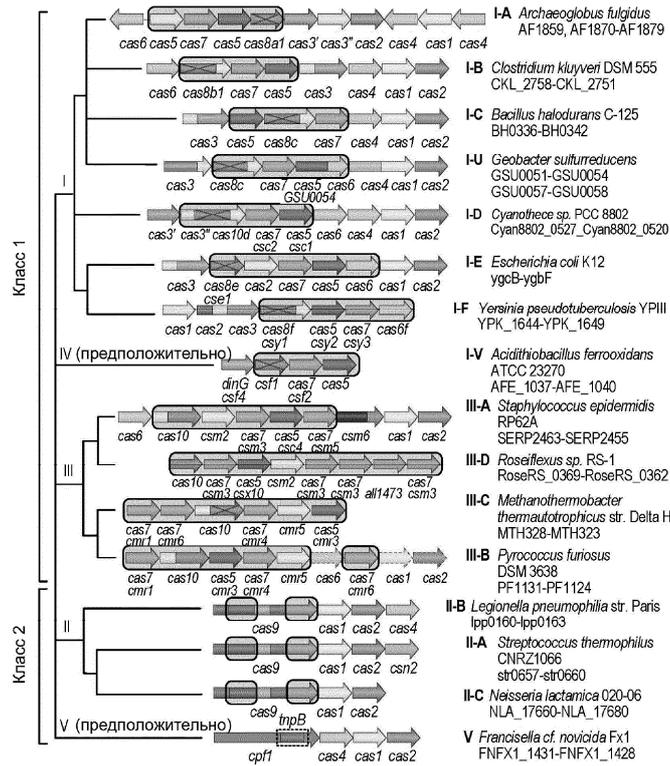
Фиг. 14



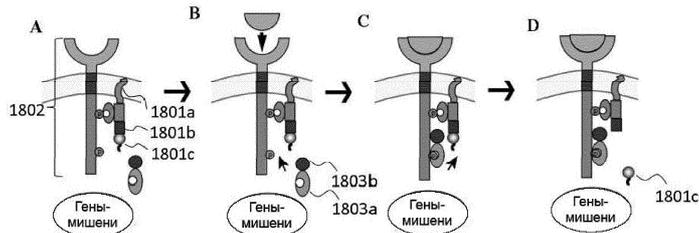
Фиг. 15



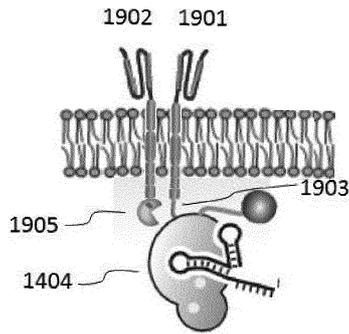
Фиг. 16



Фиг. 17

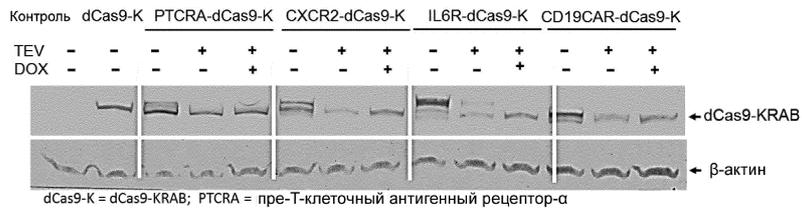


Фиг. 18

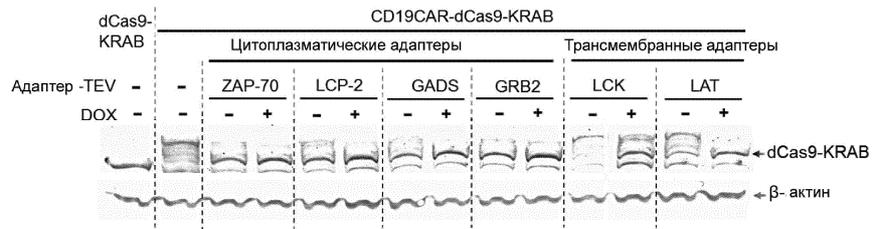


Фиг. 19

Рецептор-dCas9-KRAB



Фиг. 20



Фиг. 21



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2