

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393493** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.03.05

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.06.08

(54) **АГЕНТЫ И СПОСОБЫ АКТИВАЦИИ И НАЦЕЛИВАНИЯ НА ИММУННЫЕ ЭФФЕКТОРНЫЕ КЛЕТКИ**

(31) **PCT/EP2021/065290**

(32) **2021.06.08**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2022/065596**

(87) **WO 2022/258711 2022.12.15**

(71) Заявитель:
**БИОНТЕХ СЕЛ ЭНД ДЖИН
ТЕРЕПИЗ ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:

**Сахин Угур, Вюстехубе-Лауш
Джоселин, Шмольдт Ханс-Ульрих,
Ренгстль Беньямин, Биртель
Маггиас, Эм Петра (DE)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение относится к агентам и способам активации иммунных эффекторных клеток и адресной доставке активированных иммунных эффекторных клеток к клеткам-мишеням. В одном из воплощений изобретение включает предоставление субъекту иммунных эффекторных клеток, генетически модифицированных для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR). В одном из воплощений изобретение включает введение РНК, кодирующей пептид или полипептид (активирующее соединение), включающий связывающий фрагмент для CAR, и введение РНК, кодирующей пептид или полипептид (соединение-ярлык), включающий связывающий фрагмент, связывающийся с клетками-мишенями (первичная нацеливающая часть), и дополнительный связывающий фрагмент для CAR (вторичная мишень).

A1

202393493

202393493

A1

АГЕНТЫ И СПОСОБЫ АКТИВАЦИИ И НАЦЕЛИВАНИЯ НА ИММУННЫЕ ЭФФЕКТОРНЫЕ КЛЕТКИ

Изобретение относится к средствам и способам активации иммунных эффекторных клеток и адресной доставке активированных иммунных эффекторных клеток к клеткам-мишеням. В одном воплощении изобретение включает обеспечение субъекта иммунными эффекторными клетками, генетически модифицированными для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR). В одном из воплощений изобретение включает введение РНК, кодирующей пептид или полипептид (активирующее соединение), включающий связывающий фрагмент для CAR, и введение РНК, кодирующей пептид или полипептид (соединение-ярлык), включающий связывающий фрагмент, связывающийся с клетками-мишенями (фрагмент первичного нацеливания) и дополнительный связывающий фрагмент для CAR (вторичная мишень). В одном воплощении РНК, кодирующая активирующее соединение, экспрессируется антигенпрезентирующими клетками на их клеточной поверхности. После экспрессии активирующего соединения связывающий фрагмент CAR может быть доступен для связывания иммунными эффекторными клетками, при этом указанное связывание может привести к размножению иммунных эффекторных клеток. В одном воплощении РНК, кодирующая соединение-ярлык, экспрессируется и секретируется клетками субъекта, такими как клетки печени. После экспрессии соединения-ярлыка первичный нацеливающий фрагмент может связаться с целевым антигеном, таким как раковый антиген, на раковых клетках, а затем иммунные эффекторные клетки могут нацелиться на вторичную мишень, тем самым точно доставляя иммунные эффекторные клетки к клеткам-мишеням, таким как раковые клетки. Связывающий фрагмент CAR, включенный в активирующее соединение, и связывающий фрагмент CAR, включенный в соединение-ярлык, могут представлять собой пептидную метку и/или могут быть идентичными или разными.

Во многих областях медицинской терапии и диагностики желательно избирательно доставлять средство, такое как терапевтическое средство (лекарственный препарат) или диагностическое средство (например, для визуализации), к определенному участку или ограниченной области тела субъекта, такого как пациент.

Активное нацеливание на орган или ткань может быть достигнуто путем прямой или непрямой конъюгации желаемых активных фрагментов (например, цитотоксического соединения) с нацеливающей конструкцией, которая связывается с клеточными поверхностями в интересующем сайте-мишени. Нацеливающие фрагменты, применяемые для нацеливания таких средств, обычно представляют собой конструкции, обладающие

сродством к мишеням клеточной поверхности, например, мембранным белкам, и включают антитела или фрагменты антител.

Настоящее изобретение относится к подходу, в котором применяют кодируемое РНК соединение-ярлык, которое метит клетки-мишени, например, путем связывания с первичной мишенью (например, антигеном клеточной поверхности). Соединение-ярлык включает вторичную мишень, на которую в конечном итоге будут воздействовать иммунные эффекторные клетки, снабженные рецептором антигена, нацеленным на вторичную мишень. Таким образом, согласно изобретению вводят РНК, кодирующую соединение-ярлык. После экспрессии РНК соединение-ярлык может связываться с клетками-мишенями, например, путем связывания с первичной мишенью. Иммунные эффекторные клетки связываются с вторичной мишенью соединения-ярлыка через свой антигенный рецептор. Кроме того, согласно изобретению вводят РНК, кодирующую активирующее соединение. После экспрессии РНК активирующее соединение может присутствовать на клеточной поверхности антигенпрезентирующих клеток и может презентовать на клеточной поверхности фрагмент, который может связываться иммунными эффекторными клетками. Иммунные эффекторные клетки связываются со связывающим фрагментом через свой антигенный рецептор, причем указанное связывание приводит к размножению иммунных эффекторных клеток. Концепция, описанная в настоящем документе, позволяет применять один тип иммунных эффекторных клеток для воздействия на широкий спектр клеток-мишеней, т.е. путем применения одного типа иммунных эффекторных клеток и, необязательно, одного типа активирующего соединения в сочетании с различными соединения-ярлыками, нацеленными на разные первичные мишени и включающими идентичную вторичную мишень.

Раскрытие изобретения

В одном аспекте изобретение относится к способу лечения субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние, характеризующееся экспрессией клетками целевого антигена, включающему:

- (i) обеспечение субъекта иммунными эффекторными клетками, генетически модифицированными для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR);
- (ii) введение субъекту первой РНК, кодирующей первый пептид или полипептид, первый пептид или полипептид, включающий связывающий фрагмент для CAR;
- (iii) обеспечение экспрессии первого пептида или полипептида антигенпрезентирующими клетками у субъекта таким образом, чтобы связывающий фрагмент для CAR была доступна для связывания иммунными эффекторными клетками,

причем указанное связывание приводит к размножению иммунных эффекторных клеток;

(iv) введение субъекту второй РНК, кодирующей второй пептид или полипептид, второй пептид или полипептид, включающий связывающий фрагмент, связывающийся с целевым антигеном, и связывающий фрагмент для CAR; и

(v) обеспечение экспрессии второго пептида или полипептида клетками субъекта, так что второй пептид или полипептид становится связанным с клетками, экспрессирующими целевой антиген, и связывающий фрагмент CAR становится доступной для связывания иммунными эффекторными клетками.

В некоторых воплощениях, антигенпрезентирующие клетки трансфицируют первой РНК.

В некоторых воплощениях, первую РНК вводят в виде дисперсной композиции, например, в виде частиц липоплекса.

В некоторых воплощениях, клетки, экспрессирующие второй пептид или полипептид, трансфицируют вторую РНК.

В некоторых воплощениях, вторую РНК вводят в виде дисперсной композиции, например, в виде липидных наночастиц.

В некоторых воплощениях, антигенпрезентирующие клетки экспрессируют первый пептид или полипептид так, что он остается связанным с антигенпрезентирующими клетками.

В некоторых воплощениях, первый пептид или полипептид представляет собой мембранный пептид или полипептид.

В некоторых воплощениях, первый пептид или полипептид представляет собой слитый белок фрагмента, связывающего CAR, и мембранного пептида или полипептида.

В некоторых воплощениях, связывание иммунных эффекторных клеток со вторым пептидом или полипептидом, связанным с клетками, экспрессирующими целевой антиген, приводит к уничтожению клеток, экспрессирующих целевой антиген.

В некоторых воплощениях, клетки, экспрессирующие второй пептид или полипептид, секретируют второй пептид или полипептид.

В некоторых воплощениях, клетки, экспрессирующие второй пептид или полипептид, экспрессируют второй пептид или полипептид так, что он высвобождается в кровотоке.

В некоторых воплощениях, целевой антиген представляет собой антиген клеточной поверхности.

В некоторых воплощениях, второй пептид или полипептид представляет собой слитый пептид или полипептид связывающего фрагмента, связывающегося с целевым

антигеном, и связывающего фрагмента для CAR.

В некоторых воплощениях, связывающий фрагмент, связывающийся с целевым антигеном, включает антитело или производное антитела.

В некоторых воплощениях, связывающий фрагмент CAR включает пептидную метку.

В некоторых воплощениях, CAR включает антитело или производное антитела.

В некоторых воплощениях, производное антитела представляет собой фрагмент антитела.

В некоторых воплощениях, способ включает введение субъекту иммунных эффекторных клеток, генетически модифицированных для экспрессии CAR.

В некоторых воплощениях, способ включает создание иммунных эффекторных клеток, генетически модифицированных для экспрессии CAR у субъекта.

В некоторых воплощениях, заболевание, расстройство или состояние представляет собой рак.

В некоторых воплощениях, клетки, экспрессирующие целевой антиген, представляют собой пораженные клетки.

В некоторых воплощениях, клетки, экспрессирующие целевой антиген, представляют собой раковые клетки.

В некоторых воплощениях, целевой антиген представляет собой опухолевый антиген.

В следующем аспекте изобретение относится к способу лечения субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние, характеризующееся клетками, экспрессирующими целевой антиген, включающему:

(i) обеспечение субъекта иммунными эффекторными клетками, генетически модифицированными для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), связывающегося с пептидной меткой;

(ii) введение субъекту первой РНК, кодирующей первый пептид или полипептид, так что первый пептид или полипептид экспрессируется в антигенпрезентирующих клетках субъекта, где первый пептид или полипептид представляет собой мембранный белок, который включает во внеклеточном домене пептидную метку, с которой связывается CAR; и

(iii) введение субъекту второй РНК, кодирующей второй пептид или полипептид, так что второй пептид или полипептид экспрессируется и секретируется клетками субъекта, при этом второй пептид или полипептид включает связывающий фрагмент, связывающийся с целевым антигеном, и пептидную метку, с которой

связывается CAR.

В некоторых воплощениях, связывание иммунных эффекторных клеток с первым пептидом или полипептидом приводит к размножению иммунных эффекторных клеток.

В некоторых воплощениях, связывание иммунных эффекторных клеток со вторым пептидом или полипептидом, связанным с целевым антигеном, приводит к уничтожению клеток, экспрессирующих целевой антиген.

В некоторых воплощениях, антигенпрезентирующие клетки трансфицируют первой РНК.

В некоторых воплощениях, первую РНК вводят в виде дисперсной композиции, например, в виде частиц липоплекса.

В некоторых воплощениях, клетки, экспрессирующие второй пептид или полипептид, трансфицируют второй РНК.

В некоторых воплощениях, вторую РНК вводят в виде дисперсной композиции, например, в виде липидных наночастиц.

В некоторых воплощениях, антигенпрезентирующие клетки экспрессируют первый пептид или полипептид так, что он остается связанным с антигенпрезентирующими клетками.

В некоторых воплощениях, первый пептид или полипептид представляет собой слитый белок пептидной метки, с которой связывается CAR, и мембранного пептида или полипептида.

В некоторых воплощениях, второй пептид или полипептид секретируется в кровотока.

В некоторых воплощениях, целевой антиген представляет собой антиген клеточной поверхности.

В некоторых воплощениях, второй пептид или полипептид представляет собой слитый пептид или полипептид связывающего фрагмента, связывающегося с целевым антигеном, и пептидной метки, с которой связывается CAR.

В некоторых воплощениях, связывающая группа, связывающаяся с целевым антигеном, включает антитело или производное антитела.

В некоторых воплощениях, CAR включает антитело или производное антитела.

В некоторых воплощениях, производное антитела представляет собой фрагмент антитела.

В некоторых воплощениях, способ включает введение субъекту иммунных эффекторных клеток, генетически модифицированных для экспрессии CAR.

В некоторых воплощениях, способ включает создание иммунных эффекторных

клеток, генетически модифицированных для экспрессии CAR у субъекта.

В некоторых воплощениях, заболевание, расстройство или состояние представляет собой рак.

В некоторых воплощениях, клетки, экспрессирующие целевой антиген, представляют собой пораженные клетки.

В некоторых воплощениях, клетки, экспрессирующие целевой антиген, представляют собой раковые клетки.

В некоторых воплощениях, целевой антиген представляет собой опухолевый антиген.

В дополнительном аспекте, изобретение относится к набору, включающему:

(i) нуклеиновую кислоту для генетической модификации иммунных эффекторных клеток для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), связывающегося с пептидной меткой, или иммунные эффекторные клетки, генетически модифицированные для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), связывающегося с пептидной меткой;

(ii) первую РНК, кодирующую первый пептид или полипептид, который представляет собой мембранный белок, который включает во внеклеточном домене пептидную метку, с которой связывается CAR, или нуклеиновую кислоту для получения указанной первой РНК; и необязательно

(iii) вторую РНК, кодирующую второй пептид или полипептид, который включает связывающий фрагмент, связывающийся с целевым антигеном, и пептидную метку, с которой связывается CAR, или нуклеиновую кислоту для получения указанной второй РНК.

Воплощения нуклеиновой кислоты для генетической модификации иммунных эффекторных клеток для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), связывающегося с пептидной меткой, иммунные эффекторные клетки, генетически модифицированные для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), связывающегося с пептидной меткой, первая РНК, первый пептид или полипептид, вторая РНК и/или второй пептид или полипептид описаны в настоящем документе, например, в контексте способа по изобретению.

В одном аспекте изобретение относится к средству или композиции, описанным в настоящем документе (например, нуклеиновая кислота для генетической модификации иммунных эффекторных клеток, иммунные эффекторные клетки, генетически модифицированные для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), первая РНК, вторая РНК и/или набор) для применения в описанном в настоящем документе

способе.

Краткое описание чертежей

Фигура 1: Подход с модульными CAR-T-клетками

На фигуре представлена схематическая иллюстрация универсального подхода CAR-T, основанного на модульной паре взаимодействия на примере ALFA-tag/NbALFA. При этом создают стандартную и готовую к реализации на рынке клетку CART (1), которая несет на своей поверхности связывающий метку фрагмент (например, NbALFA VHH). Эти CAR-T-клетки вводятся пациенту, и они могут быть специфически размножены *in vivo* с помощью липоплексов РНК, кодирующих метку, слитую с закрепляющимся на мембране доменом белка (например, усеченным CLDN6) (2). Второй связывающий фрагмент, так называемый нацеливающий лиганд (НЛ), состоящий из ALFA-метки, слитой со специфичным для опухолевого антигена лигандом (например, scFv, VHH или Fab-фрагментом), вводят пациенту в виде РНК, составленной в виде липидных наночастиц (3). РНК транслируется *in vivo* в биспецифический белок, который высвобождается в кровоток. После того, как нацеливающий лиганд накапливается в опухоли на основе его специфического связывания с определенным опухолевым антигеном, он связывается с Т-клетками NbALFA-CAR, которые активируются, что приводит к специфическому лизису опухолевой клетки (4). Применяя разные нацеливающие лиганды, можно воздействовать на разные опухолевые антигены последовательно или параллельно с применением одного и того же клеточного продукта CART пациента.

Фигура 2: Адаптеры связываются с эффекторными клетками CAR+

Т-клетки Jurkat трансфицировали мРНК, кодирующей модульный CAR. Клетки, экспрессирующие модульный CAR, были снабжены растворимым адаптером и окрашены антителом, специфичным к адаптеру. На фигурах представлена частота и интенсивность обнаружения адаптера на поверхности модульных клеток, экспрессирующих CAR.

Фигура 3: Первичные Т-клетки человека могут экспрессировать модульный CAR

Первичные Т-клетки человека были активированы и впоследствии сконструированы для экспрессии модульного CAR с применением мРНК. Молекулы CAR окрашивали и экспрессию определяли с помощью проточной цитометрии.

Фигура 4: Первичные Т-клетки человека, экспрессирующие модульный CAR, могут быть оснащены растворимыми адаптерами

Модульные CAR Т-клетки были оснащены растворимым адаптером (100 нМ), созданным клетками, трансфицированными нуклеиновыми кислотами. Адаптер окрашивали специфическим антителом и экспрессию определяли с помощью способа

проточной цитометрии. На фигуре представлена частота и интенсивность обнаружения адаптера на поверхности модульных CAR, экспрессирующих Т-клетки.

Фигура 5: Модульная платформа CAR-T обеспечивает лизис опухолевых клеток

Модульные Т-клетки CAR с адаптером были помещены в совместную культуру с антиген-положительными (Ag⁺) опухолевыми клетками. Ответы CAR-T-клеток оценивали с применением методологии цитотоксичности, основанной на импедансе. Цитотоксичность была нормализована для опухолевых клеток, культивированных Т-клетками, не трансфицированными мРНК.

Фигура 6: Модульная CAR-опосредованная пролиферация, стимулируемая универсальным антигеном, трансфицированным в нДК

Незрелые дендритные клетки человека трансфицировали мРНК, кодирующей прикрепленный к мембране связывающий фрагмент. Одновременно Т-клетки трансфицировали модульной мРНК, кодирующей CAR, и окрашивали красителем для оценки пролиферации. Модульные клетки CAR-T и нДК, экспрессирующие CARVas, культивировали совместно. На фигурах 6А и В мембраносвязывающий фрагмент включает пептид ALFA, тогда как CAR включает VHH(aALFA). На фигуре 6А показано размножение сконструированных клеток CAR-T, оснащенных адаптерами, в ответ на обнаружение своей цели на нДК. Аналогично фигуре 6А измеряют пролиферацию модульных CAR, экспрессирующих Т-клетки человека. В настоящем документе в модульном CAR применяли VHH(aALFA) SEQ ID NO: 30, который имеет более высокое сродство к целевому антигену, экспрессируемому на поверхности нДК, чем VHH(aALFA)PE CAR, примененный на фигуре 6А. На фигурах 6С и D закрепленный на мембране связывающий фрагмент включает VHH(aALFA), тогда как CAR включает пептид ALFA.

Фигура 7: Модульные ALFA CAR-T, нагруженные CD19-специфичными адаптерами, опосредуют пролиферацию против трансфицированных CD19 нДК или первичных В-клеток человека.

Первичные Т-клетки человека трансфицировали модульной мРНК, кодирующей CAR, и окрашивали красителем для оценки пролиферации. Модульные Т-клетки CAR культивировали совместно с В-клетками (CD19⁺) или нДК, трансфицированными мРНК CD19. Пролиферацию оценивали с помощью проточной цитометрии.

Описание последовательностей

В следующей таблице представлен список некоторых последовательностей, упомянутых в настоящем документе.

Описание последовательностей		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
5'-UTR (hAg-Козак)		
1	5'-UTR	AACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC
3'-UTR (2hBg)		
2	3'-UTR	CUCGAGAGCUCGCUUUCUUGCUGUCCAAUUUCUAUUAAAGGUUCCUU UGUUCCCUAAGUCCAACUACUAAACUGGGGGGAUUAUUAUGAAGGGCCU UGAGCAUCUGGAUUCUGCCUAAUAAAAACAUUUAUUUUCAUUGCUG CGUCGAGAGCUCGCUUUCUUGCUGUCCAAUUUCUAUUAAAGGUUCCU UUGUUCCCUAAGUCCAACUACUAAACUGGGGGGAUUAUUAUGAAGGGCC UUGAGCAUCUGGAUUCUGCCUAAUAAAAACAUUUAUUUUCAUUGCUG GCGUCGAGACCUGGUCCAGAGUCGCUAGC
3'-UTR (элемент FI)		
3	3'-UTR	CUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCUUUCGUCUCCUGGG UACCCCGAGUCUCCCCGACCUCGGGUCCAGGUAUGCUCACCACCUCC ACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUCCAGACACCUCCCAAGCAC GCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGA AACAGCAGUGAUUAACCUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCU AUACUAACCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACC
A30L70		
4	A30L70	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAUAUGACUAAAAAA AA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Осуществление изобретения

Хотя настоящее изобретение подробно описано ниже, следует понимать, что оно не ограничивается конкретными методологиями, протоколами и реагентами, описанными в настоящем документе, поскольку они могут различаться. Также следует понимать, что терминология, применяемая в настоящем документе, предназначена только для описания конкретных воплощений и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют те же значения, которые обычно понимаются специалистом в данной области техники.

Предпочтительно, термины, применяемые в настоящем документе, определены, как описано в «A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)», H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland, (1995).

В практике настоящего изобретения будут применять, если не указано иное, традиционные способы химии, биохимии, клеточной биологии, иммунологии и способы рекомбинантной ДНК, которые объяснены в литературе в данной области техники (смотри, например, «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

Ниже будут описаны элементы настоящего изобретения. Эти элементы перечислены вместе с конкретными воплощениями, однако следует понимать, что их

можно комбинировать любым способом и в любом количестве для создания дополнительных воплощений. По-разному описанные примеры и воплощения не следует рассматривать как ограничивающие настоящее изобретение только явно описанными воплощениями. Следует понимать, что это описание раскрывает и охватывает воплощения, которые объединяют подробно описанные воплощения с любым количеством раскрытых элементов. Кроме того, любые перестановки и комбинации всех описанных элементов следует считать раскрытыми в этом описании, если из контекста не следует иное.

Термин «примерно» означает приблизительно или почти, а в контексте числового значения или диапазона, изложенного в настоящем документе в одном воплощении, означает $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 3\%$ от числового значения или диапазона, указанного или заявленного.

Выражения «a», «an», «the» и подобные отсылки (*прим.*: в англоязычном варианте документа предшествуют именам существительным), применяемые в контексте описания изобретения (особенно в контексте формулы изобретения), должны толковаться как указывающие как на единственное, так и на множественное число, если иное не указано в настоящем документе или явно не противоречит контексту. Перечисление диапазонов значений в настоящем документе предназначено просто для применения в качестве сокращенного способа индивидуального обращения к каждому отдельному значению, попадающему в диапазон. Если в настоящем документе не указано иное, то каждое отдельное значение включено в описание так, как если бы оно было указано в настоящем документе отдельно. Все способы, описанные в настоящем документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в настоящем документе или иным образом не противоречит контексту. Применение любых и всех примеров или примерных формулировок (например, «такой как»), представленных в настоящем документе, предназначено просто для лучшей иллюстрации изобретения и не накладывает ограничения на объем формулы изобретения. Никакие формулировки в описании не должны быть истолкованы как указывающие на какой-либо незаявленный элемент, существенный для осуществления изобретения.

Если явно не указано иное, термин «включающий» применяют в контексте настоящего документа для обозначения того, что дополнительные члены могут необязательно присутствовать в дополнение к членам списка, введенного словом «включающий». Однако в качестве конкретного варианта осуществления настоящего изобретения предполагается, что термин «включающий» охватывает возможность отсутствия дополнительных членов, т.е. для целей этого варианта осуществления

«включающий» следует понимать как имеющий значение «состоящий из» или «состоящий по существу из».

В тексте данного описания цитируются несколько документов. Каждый из документов, цитируемых в настоящем документе (включая все патенты, заявки на патенты, научные публикации, спецификации производителя, инструкции и т.д.), как выше, так и ниже, включен в настоящий документ посредством отсылки во всей своей полноте. Ничто в настоящем документе не должно быть истолковано как признание того, что настоящее изобретение не имело права предшествовать такому раскрытию.

Определения

Ниже будут предоставлены определения, которые применимы ко всем аспектам настоящего изобретения. Следующие термины имеют следующие значения, если не указано иное. Любые неопределенные термины имеют значения, признанные в данной области техники.

Такие термины, как «снижать», «уменьшать», «ингибировать» или «ухудшать», применяемые в настоящем документе, относятся к общему снижению или способности вызывать общее снижение в уровне, предпочтительно, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75% или даже больше. К этим терминам относится полное или практически полное ингибирование, т.е. снижение до нуля или практически до нуля.

Такие термины, как «увеличивать», «усиливать» или «превышать», предпочтительно, относятся к увеличению или усилению на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 200%, по меньшей мере 500% или даже больше.

Согласно изобретению термин «пептид» включает олиго- и полипептиды и относится к веществам, которые включают примерно две или более, примерно 3 или более, примерно 4 или более, примерно 6 или более, примерно 8 или более, примерно 10 или более, примерно 13 или более, примерно 16 или более, примерно 20 или более и вплоть до примерно 50, примерно 100 или примерно 150 последовательных аминокислот, связанных друг с другом посредством пептидных связей. Термин «белок» или «полипептид» относится к крупным пептидам, в особенности, пептидам, имеющим, по меньшей мере, примерно 150 аминокислот, но термины «пептид», «белок» и «полипептид» применяют в настоящем документе обычно как синонимы.

«Фрагмент» в отношении аминокислотной последовательности (пептида или белка) относится к части аминокислотной последовательности, т.е. к последовательности,

которая представляет собой аминокислотную последовательность, укороченную на N-конце и/или C-конце. Фрагмент, укороченный на C-конце (N-концевой фрагмент), можно получить, например, путем трансляции усеченной открытой рамки считывания, у которой отсутствует 3'-конец открытой рамки считывания. Фрагмент, укороченный на N-конце (C-концевой фрагмент), можно получить, например, путем трансляции усеченной открытой рамки считывания, в которой отсутствует 5'-конец открытой рамки считывания, при условии, что усеченная открытая рамка считывания включает стартовый кодон, который служит для инициации трансляции. Фрагмент аминокислотной последовательности включает, например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% аминокислотных остатков из аминокислотной последовательности. Фрагмент аминокислотной последовательности предпочтительно включает, по меньшей мере 6, в особенности, по меньшей мере 8, по меньшей мере 12, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 50 или, по меньшей мере 100 последовательных аминокислот из аминокислотной последовательности.

Под «вариантом» в настоящем документе подразумевают аминокислотную последовательность, которая отличается от родительской аминокислотной последовательности, по меньшей мере одной аминокислотной модификацией. Исходная аминокислотная последовательность может представлять собой аминокислотную последовательность природного происхождения или дикого типа (WT) или может представлять собой модифицированную версию аминокислотной последовательности дикого типа. Предпочтительно вариантная аминокислотная последовательность имеет, по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с исходной аминокислотной последовательностью, например, от 1 до примерно 20 аминокислотных модификаций и предпочтительно от 1 до примерно 10 или от 1 до примерно 5 аминокислотных модификаций по сравнению с родительским вариантом.

Под «диким типом», или «WT», или «нативным» в настоящем документе подразумевается аминокислотная последовательность, которая встречается в природе, включая аллельные вариации. Аминокислотная последовательность, пептид или белок дикого типа имеет аминокислотную последовательность, которая не была преднамеренно модифицирована.

Для целей настоящего изобретения «варианты» аминокислотной последовательности (пептида, белка или полипептида) включают варианты вставки аминокислот, варианты добавления аминокислот, варианты делеции аминокислот и/или варианты замены аминокислот. Термин «вариант» включает все мутанты, варианты

сплайсинга, посттрансляционно модифицированные варианты, конформации, изоформы, аллельные варианты, видовые варианты и видовые гомологи, в особенности, те, которые встречаются в природе. Термин «вариант» включает, в особенности, фрагменты аминокислотной последовательности.

Варианты вставки аминокислот включают вставки одной или двух или более аминокислот в конкретную аминокислотную последовательность. В случае вариантов аминокислотной последовательности, имеющих вставку, один или несколько аминокислотных остатков вставляются в конкретный участок аминокислотной последовательности, хотя также возможна случайная вставка с соответствующим скринингом полученного продукта. Варианты добавления аминокислот включают слияния на amino- и/или карбокси-концах одной или нескольких аминокислот, таких как 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 или более аминокислот. Варианты с делецией аминокислот характеризуются удалением одной или нескольких аминокислот из последовательности, например, удалением 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 или более аминокислот. Делеции могут находиться в любом положении белка. Варианты делеции аминокислот, которые включают делецию на N-концевом и/или C-концевом конце белка, также называются N-концевыми и/или C-концевыми вариантами усечения. Варианты замены аминокислот характеризуются тем, что, по меньшей мере один остаток в последовательности удаляется, а на его место вставляется другой остаток. Предпочтение отдается модификациям в положениях аминокислотной последовательности, которые не представляют собой консервативными между гомологичными белками или пептидами, и/или замене аминокислот другими аминокислотами, имеющими сходные свойства. Предпочтительно, аминокислотные замены в вариантах пептидов и белков представляют собой консервативные аминокислотные замены, т.е. замены одинаково заряженных или незаряженных аминокислот. Консервативная замена аминокислот включает замену одной аминокислоты из семейства аминокислот, родственных по боковым цепям. Встречающиеся в природе аминокислоты обычно делят на четыре семейства: кислые (аспартат, глутамат), основные (лизин, аргинин, гистидин), неполярные (аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан) и незаряженные полярные (глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин) аминокислоты. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда вместе классифицируют как ароматические аминокислоты. В одном воплощении консервативные аминокислотные замены включают замены в следующих группах:

глицин, аланин;

валин, изолейцин, лейцин;

аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота;
аспарагин, глутамин;
серин, треонин;
лизин, аргинин; и
фенилаланин, тирозин.

Предпочтительно степень сходства, предпочтительно идентичности между данной аминокислотной последовательностью и аминокислотной последовательностью, которая представляет собой вариант указанной данной аминокислотной последовательности, будет составлять, по меньшей мере примерно 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. Степень сходства или идентичности предпочтительно указывают для области аминокислот, которая составляет, по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90% или примерно 100% от всей длины эталонной аминокислотной последовательности. Например, если эталонная аминокислотная последовательность состоит из 200 аминокислот, то степень сходства или идентичности указана предпочтительно для, по меньшей мере примерно 20, по меньшей мере примерно 40, по меньшей мере примерно 60, по меньшей мере примерно 80, по меньшей мере примерно 100, по меньшей мере примерно 120, по меньшей мере примерно 140, по меньшей мере примерно 160, по меньшей мере примерно 180 или примерно 200 аминокислот, в некоторых воплощениях непрерывных аминокислот. В некоторых воплощениях, степень сходства или идентичности указана для всей длины эталонной аминокислотной последовательности. Выравнивание для определения сходства последовательностей, предпочтительно идентичности последовательностей, может быть выполнено с помощью известных в данной области техники инструментов, предпочтительно с помощью наилучшего выравнивания последовательностей, например, с помощью Align, с применением стандартных настроек, предпочтительно EMBOSS::needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5.

«Сходство последовательностей» означает процент аминокислот, которые либо идентичны, либо представляют собой консервативные аминокислотные замены. «Идентичность последовательностей» между двумя аминокислотными последовательностями указывает процент аминокислот, которые идентичны между последовательностями. «Идентичность последовательностей» между двумя последовательностями нуклеиновой кислоты указывает процент нуклеотидов, которые

идентичны между последовательностями.

Термины «% идентичного», «% идентичности» или подобные термины относятся, в особенности, к проценту нуклеотидов или аминокислот, которые идентичны при оптимальном выравнивании между сравниваемыми последовательностями. Указанный процент представляет собой чисто статистический процент, и различия между двумя последовательностями могут быть, но не обязательно, случайным образом распределены по всей длине сравниваемых последовательностей. Сравнение двух последовательностей обычно проводят путем сравнения последовательностей после оптимального выравнивания относительно сегмента или «окна сравнения» с целью идентификации локальных областей соответствующих последовательностей. Оптимальное выравнивание для сравнения может быть выполнено вручную или с помощью алгоритма локальной гомологии по Smith and Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482, с помощью алгоритма локальной гомологии по Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, с помощью алгоритма поиска по сходству по Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 2444, или с помощью компьютерных программ, применяющих указанные алгоритмы (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.). В некоторых воплощениях, процент идентичности двух последовательностей определяют с применением алгоритма BLASTN или BLASTP, доступного на сайте Национальном центре биотехнологической информации США (NCBI) (например, blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq). В некоторых воплощениях, параметры алгоритма, применяемые для алгоритма BLASTN на веб-сайте NCBI, включают следующие условия: (i) ожидаемый порог установлен на 10; (ii) длина сегмента установлена на 28; (iii) максимальное количество соответствий в диапазоне запроса установлено равным 0; (iv) баллы за соответствия/несоответствия установлены на 1, -2; (v) стоимость разрыва установлена на «Линейно»; и (vi) применен фильтр для областей низкой сложности. В некоторых воплощениях, параметры алгоритма, примененные для алгоритма BLASTP на веб-сайте NCBI, включают следующие условия: (i) ожидаемый порог установлен на 10; (ii) длина сегмента установлена на 3; (iii) максимальное количество соответствия в диапазоне запроса установлено равным 0; (iv) матрица установлена на BLOSUM62; (v) стоимость разрыва установлена на «существование»: 11 «продление»: 1; и (vi) условная композиционная корректировка матрицы оценок.

Процент идентичности получают путем определения количества идентичных позиций, которым соответствуют сравниваемые последовательности, деления этого числа

на количество сравниваемых позиций (например, количества позиций в эталонной последовательности) и умножения этого результата на 100.

В некоторых воплощениях, степень сходства или идентичности дана для участка, который составляет, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90% или примерно 100% всей длины эталонной последовательности. Например, если эталонная последовательность нуклеиновой кислоты состоит из 200 нуклеотидов, то степень идентичности указана для, по меньшей мере примерно 100, по меньшей мере примерно 120, по меньшей мере примерно 140, по меньшей мере примерно 160, по меньшей мере примерно 180 или примерно 200 нуклеотидов, в некоторых воплощениях непрерывных нуклеотидов. В некоторых воплощениях степень сходства или идентичности задается для всей длины эталонной последовательности.

Гомологичные аминокислотные последовательности согласно изобретению демонстрируют, по меньшей мере 40%, в особенности, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% и предпочтительно, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или, по меньшей мере 99% идентичности аминокислотных остатков.

Варианты аминокислотной последовательности, описанные в настоящем документе, могут быть легко получены специалистом, например, путем манипуляций с рекомбинантной ДНК. Манипуляции с последовательностями ДНК для получения пептидов или белков, имеющих замены, добавления, вставки или делеции, подробно описаны, например, в руководстве Sambrook et al. (1989). Кроме того, описанные в настоящем документе пептиды и варианты аминокислот могут быть легко получены с помощью известных способов синтеза пептидов, таких как, например, твердофазный синтез и подобные способы.

В одном из воплощений, фрагмент или вариант аминокислотной последовательности (пептида или белка) предпочтительно представляет собой «функциональный фрагмент» или «функциональный вариант». Термин «функциональный фрагмент» или «функциональный вариант» аминокислотной последовательности относится к любому фрагменту или варианту, проявляющему одно или несколько функциональных свойств, идентичных или сходных со свойствами аминокислотной последовательности, из которой он получен, т.е. он функционально эквивалентен. Что касается последовательностей связывающих агентов, таких как антитела, то одна конкретная функция представляет собой одну или несколько активностей связывания, проявляемых аминокислотной последовательностью, из которой получен фрагмент или

вариант. Термин «функциональный фрагмент» или «функциональный вариант», применяемый в настоящем документе, в особенности, относится к варианту молекулы или последовательности, которая включает аминокислотную последовательность, измененную одной или несколькими аминокислотами по сравнению с аминокислотной последовательностью родительской молекулы или последовательности и которая все еще способна выполнять одну или несколько функций исходной молекулы или последовательности, например, связываться с молекулой-мишенью. В одном из воплощений модификации аминокислотной последовательности родительской молекулы или последовательности существенно не влияют и не изменяют характеристики молекулы или последовательности. В различных воплощениях функция функционального фрагмента или функционального варианта может быть снижена, но все же присутствовать в значительной степени, например, связывание функционального варианта может составлять, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, или, по меньшей мере 90% исходной молекулы или последовательности. Однако в других воплощениях связывание функционального фрагмента или функционального варианта может быть усилено по сравнению с исходной молекулой или последовательностью.

Аминокислотная последовательность (пептид, белок или полипептид), «происходящая из» обозначенной аминокислотной последовательности (пептида, белка или полипептида), относится к месту происхождения первой аминокислотной последовательности. Предпочтительно, аминокислотная последовательность, полученная из конкретной аминокислотной последовательности, имеет аминокислотную последовательность, которая идентична, по существу идентична или гомологична этой конкретной последовательности или ее фрагменту. Аминокислотные последовательности, полученные из конкретной аминокислотной последовательности, могут быть вариантами этой конкретной последовательности или ее фрагмента. Например, специалисту в данной области техники будет понятно, что последовательности, подходящие для применения в настоящем документе, могут быть изменены таким образом, что они будут отличаться по последовательности от встречающихся в природе или нативных последовательностей, из которых они были получены, сохраняя при этом желаемую активность нативных последовательностей.

Применяемый в настоящем документе термин «обучающий материал» или «инструкции» включает публикацию, запись, диаграмму или любое другое средство выражения, которое можно применять для сообщения о полезности композиций и способов по изобретению. Обучающий материал набора по изобретению может,

например, быть прикреплен к контейнеру, который включает композиции по изобретению, или транспортироваться вместе с контейнером, который включает композиции. Альтернативно, обучающий материал может быть отправлен отдельно от контейнера с тем, чтобы обучающий материал и композиции использовались получателем совместно.

«Выделенный» означает измененный или выведенный из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественно присутствующие в живом животном, не представляют собой «выделенные» нуклеиновую кислоту или пептид, но та же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сосуществующих материалов в своем естественном состоянии, представляют собой «выделенные» нуклеиновую кислоту или пептид. Выделенные нуклеиновая кислота или белок могут существовать в существенно очищенной форме или могут существовать в ненативной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

Термин «рекомбинантный» в контексте настоящего изобретения означает «полученный посредством генной инженерии». Предпочтительно, чтобы «рекомбинантный объект», такой как рекомбинантная нуклеиновая кислота в контексте настоящего изобретения, не встречался в природе.

Термин «встречающийся в природе», примененный в настоящем документе, относится к тому факту, что объект можно найти в природе. Например, пептид или нуклеиновая кислота, которая присутствует в организме (включая вирусы) и которая может быть выделена из природного источника и которая не была намеренно модифицирована человеком в лаборатории, представляют собой встречающиеся в природе.

Термин «связывать» или «связывание» относится к нековалентному взаимодействию с мишенью. В одном из воплощений термин «связывать» или «связывание» относится к конкретному связыванию. Под термином «специфическое связывание» или «специфически связывает», как он используется в настоящем документе, подразумевают молекулу, такую как антитело или антигенный рецептор, которая распознает специфическую молекулу-мишень, но, по существу, не распознает и не связывает другие молекулы в образце или в субъекте. Например, антитело, которое специфически связывается с антигеном из одного вида, может также связываться с этим антигеном из одного или нескольких других видов. Однако такая межвидовая реактивность сама по себе не меняет классификацию антитела как специфического. В другом примере антитело, которое специфически связывается с антигеном, может также связываться с различными аллельными формами антигена. Однако такая перекрестная

реактивность сама по себе не меняет классификацию антитела как специфического.

В некоторых случаях термины «специфическое связывание» или «специфически связывать» могут быть применены в отношении взаимодействия антитела, белка или пептида со вторым химическим соединением, что означает, что взаимодействие зависит от присутствия конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа) химического соединения; например, антитело распознает и связывается с определенной белковой структурой, а не с белками в целом. Если антитело специфично к эпитопу «А», присутствие молекулы, включающей эпитоп А (или свободный, немеченый А), в реакции, включающей меченый «А» и антитело, уменьшит количество меченого А, связанного с антителом.

Термин «физиологический рН», как он используется в настоящем документе, относится к рН примерно 7,5.

Термин «генетическая модификация» или просто «модификация» включает трансфекцию клеток нуклеиновой кислотой. Термин «трансфекция» относится к введению нуклеиновых кислот, в особенности, РНК, в клетку. Для целей настоящего изобретения термин «трансфекция» также включает введение нуклеиновой кислоты в клетку или поглощение нуклеиновой кислоты такой клеткой, при этом клетка может присутствовать у субъекта, например, пациента. Таким образом, согласно настоящему изобретению клетка для трансфекции нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе, может присутствовать *in vitro* или *in vivo*, например, клетка может составлять часть органа, ткани и/или организма пациента. Согласно изобретению трансфекция может быть временной или стабильной. Для некоторых применений трансфекции достаточно, чтобы трансфицированный генетический материал экспрессировался лишь временно. РНК можно трансфицировать в клетки для временной экспрессии закодированного ею белка. Поскольку нуклеиновая кислота, введенная в процессе трансфекции, обычно не интегрируется в ядерный геном, то чужеродная нуклеиновая кислота будет разбавлена в результате митоза или деградирована. Клетки, позволяющие эписомальную амплификацию нуклеиновых кислот, значительно снижают скорость разведения. Если желательно, чтобы трансфицированная нуклеиновая кислота действительно оставалась в геноме клетки и ее дочерних клеток, должна произойти стабильная трансфекция. Такая стабильная трансфекция может быть достигнута путем применения для трансфекции систем на основе вирусов или систем на основе транспозонов. Обычно клетки, которые генетически модифицированы для экспрессии антигенного рецептора, стабильно трансфицируются нуклеиновой кислотой, кодирующей антигенный рецептор. Обычно нуклеиновую кислоту, кодирующую активирующее соединение, и/или нуклеиновую

кислоту, кодирующую соединение-ярлык временно трансфицируют в клетки. РНК можно трансфицировать в клетки для временной экспрессии закодированного ею белка.

Первичная мишень

Термин «первичная мишень», применяемый в настоящем изобретении, относится к мишени, которая должна быть связана или иным образом адресована, например, в терапевтическом методе.

Первичная мишень может быть выбрана из любых подходящих мишеней в организме человека или животного и может представлять собой клетку, патоген или паразита или может присутствовать в клетке, патогене или паразите.

Согласно конкретному воплощению первичная мишень представляет собой структуру, такую как белок, присутствующий на поверхности клетки-мишени, такой как антиген клеточной поверхности или рецептор клеточной поверхности. Первичная мишень может активироваться во время заболевания, например, при инфекции или раке. В пораженных тканях маркеры могут отличаться от маркеров здоровых тканей и открывают уникальные возможности для терапии, в особенности, таргетной терапии.

В некоторых воплощениях первичная мишень или просто «мишень» представляет собой ассоциированный с заболеванием антиген, такой как опухолевый антиген, вирусный антиген или бактериальный антиген.

Термин «ассоциированный с заболеванием антиген» применяют в самом широком смысле для обозначения любого антигена, связанного с заболеванием. Антигены, ассоциированные с заболеванием, могут быть связаны с инфицированием микробами, обычно микробными антигенами, или ассоциированы с раком, обычно с опухолями.

В некоторых воплощениях первичная мишень или просто «мишень» представляет собой опухолевый антиген. В контексте настоящего изобретения термин «опухолевый антиген» или «опухолеассоциированный антиген» относится к белкам, которые в нормальных условиях специфически экспрессируются в ограниченном количестве тканей и/или органов или на определенных стадиях развития, например, опухолевой антиген может в нормальных условиях специфически экспрессироваться в ткани желудка, предпочтительно, в слизистой оболочке желудка, в репродуктивных органах, например, в семенниках, в трофобластической ткани, например, в плаценте, или в клетках зародышевой линии, и экспрессируются или aberrantly экспрессируются в одной или нескольких опухолевых или раковых тканях. В этом контексте «ограниченное количество» означает предпочтительно не более 3, более предпочтительно, не более 2. Опухолевые антигены в контексте настоящего изобретения включают, например, антигены дифференцировки, предпочтительно, антигены дифференцировки, специфичные

для типа клеток, т.е. белки, которые в нормальных условиях специфически экспрессируются в определенном типе клеток на определенной стадии дифференцировки, антигены рака/семенников, т.е. белки, которые в нормальных условиях специфически экспрессируются в семенниках, а иногда и в плаценте, и специфичные антигены зародышевой линии. В контексте настоящего изобретения опухолевый антиген предпочтительно связан с клеточной поверхностью раковой клетки и предпочтительно не экспрессируется или очень редко экспрессируется в нормальных тканях. Предпочтительно опухолевый антиген или аберрантная экспрессия опухолевого антигена идентифицирует раковые клетки. В контексте настоящего изобретения опухолевый антиген, который экспрессируется раковой клеткой у субъекта, например, у пациента, страдающего раковым заболеванием, предпочтительно представляет собой собственный белок у указанного субъекта. В предпочтительных воплощениях опухолевый антиген в контексте настоящего изобретения экспрессируется в нормальных условиях конкретно в ткани или органе, который является несущественным, т.е. в тканях или органах, которые при повреждении иммунной системой не приводят к смерти субъекта, или в органах или структурах тела, которые недоступны или едва доступны иммунной системе. Предпочтительно, аминокислотная последовательность опухолевого антигена идентична у опухолевого антигена, который экспрессируется в нормальных тканях, и опухолевого антигена, который экспрессируется в раковых тканях.

Примеры опухолевых антигенов включают p53, ART-4, BAGE, бета-катенин/m, Bcr-abL CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, белки клеточной поверхности семейства клаудинов, такие как CLAUDIN-6, CLAUDIN-18.2 и CLAUDIN-12, c-MYC, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gap100, HAGE, HER-2/neu, HPV-E7, HPV-E6, HAST-2, hTERT (or hTRT), LAGE, LDLR/FUT, MAGE-A, предпочтительно MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, or MAGE-A12, MAGE-B, MAGE-C, MART-1/Melan-A, MC1R, миозин/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NF1, NY-ESO-1, NY-BR-1, p190 минор BCR-abL, Pm1/RARa, PRAME, протеиназа 3, PSA, PSM, RAGE, RU1 or RU2, SAGE, SART-1 или SART-3, SCGB3A2, SCP1, SCP2, SCP3, SSX, SURVIVIN, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TPTE и WT. Особенно предпочтительные опухолевые антигены включают CLAUDIN-18.2 (CLDN18.2) и CLAUDIN-6 (CLDN6).

В соответствии с изобретением иммунные эффекторные клетки могут быть специфично доставлены к мишени, такой как клетка-мишень, путем обеспечения соединению-ярылку фрагмента, который связывается с мишенью, например, с антигеном

на клетках-мишенях. Соединение-ярлык дополнительно включает связывающий фрагмент для иммунных эффекторных клеток для объединения мишени и иммунных эффекторных клеток.

Соединение-ярлык

Согласно изобретению, кодируемое РНК «соединение-ярлык» применяют для образования соединения, такого как нековалентное соединение, между первичной мишенью, например, клеткой-мишенью или антигеном на клетках-мишенях, и соединением-ярлыком. Соединение-ярлык может образовывать связь, например, нековалентную связь, с иммунными эффекторными клетками. Кодируемое РНК соединение-ярлык также называется в настоящем документе «РибоДокер» («RiboDocker»).

В одном из воплощений, соединение-ярлык включает «первичный нацеливающий фрагмент», также называемый «связывающим фрагментом, связывающимся с мишенью», в особенности, «связывающим фрагментом, связывающимся с мишенью на клетках-мишенях», или «связывающим фрагментом, связывающимся с целевым антигеном», который способен связываться с представляющей интерес первичной мишенью. Термин «фрагмент первичного нацеливания», применяемый в настоящем изобретении, относится к фрагменту соединения-ярлика, который связывается с первичной мишенью. Такие нацеливающие фрагменты обычно представляют собой фрагменты, которые обладают сродством к мишеням клеточной поверхности (например, мембранным рецепторам) или структурным белкам (например, амилоидным бляшкам). Эти фрагменты могут представлять собой любой пептид или белок (например, антитела или фрагменты антител), связывающиеся с первичной мишенью. Конкретные варианты реализации подходящих фрагментов первичного нацеливания для применения в настоящем документе включают пептиды и антитела, связывающие антиген клеточной поверхности. Пептиды или белки, которые связываются с рецептором, представляют собой другие примеры фрагментов первичного нацеливания.

Первичный нацеливающий фрагмент предпочтительно связывается с высокой специфичностью и/или высоким сродством, и связь с первичной мишенью предпочтительно стабильна внутри организма.

Чтобы обеспечить специфическое нацеливание на вышеперечисленные первичные мишени, фрагмент первичного нацеливающего соединения может включать соединения, включая, помимо прочего, антитела, фрагменты антител, например, домены Fab2, Fab, scFV, VHH, и другие белки или пептиды.

Согласно конкретному воплощению настоящего изобретения первичная мишень

представляет собой рецептор, и подходящие фрагменты первичного нацеливания включают, помимо прочего, лиганд такого рецептора или его часть, которая все еще связывается с рецептором, например, рецептор-связывающий пептид в случае рецептор-связывающих белков-лигандов.

Другие примеры фрагментов первичного нацеливания белковой природы включают интерфероны, например, альфа-, бета- и гамма-интерферон, интерлейкины и белковые факторы роста, такие как трансформирующий фактор роста (TGF) или фактор роста тромбоцитов (PDGF).

Согласно следующему конкретному воплощению изобретения первичная мишень и фрагмент первичного нацеливания выбираются так, чтобы привести к специфическому или усиленному нацеливанию на ткань или заболевание, такое как рак или инфекция. Этого можно достичь путем выбора первичных мишеней с экспрессией, специфичной для ткани, клетки или заболевания. Например, опухолевые антигены могут сверхэкспрессироваться в различных типах опухолевых клеток, в то время как они не экспрессируются или экспрессируются в более низких количествах в нормальных клетках.

Соединение-ярлык дополнительно включает группу, которая служит «вторичной мишенью», т.е. частью соединения-ярлика, которая обеспечивает партнера по связыванию для иммунных эффекторных клеток. Связывающий фрагмент, включенный в докет-соединении, связывающемся с иммунными эффекторными клетками («вторичная мишень»), и связывающий фрагмент (т.е. антигенный рецептор), включенный в иммунные эффекторные клетки, связывающиеся с соединением-ярлыком («вторичный нацеливающий фрагмент»), связываются друг с другом.

В одном из воплощений, соединение-ярлык включает слитый белок, который включает связывающий домен, связывающийся с первичной мишенью, и связывающий домен, связывающийся с вторичным нацеливающим фрагментом на иммунных эффекторных клетках.

Термин «слитый белок», как он используется в настоящем документе, относится к полипептиду или белку, содержащему две или более субъединицы. Предпочтительно, слитый белок представляет собой трансляционное слияние двух или более субъединиц. Трансляционное слияние можно создать с помощью генетической инженерии, путем слияния кодирующей нуклеотидной последовательности одной субъединицы в рамке считывания с кодирующей нуклеотидной последовательностью дополнительной субъединицы. Субъединицы могут перемежаться линкером.

В одном из воплощений, соединение-ярлык включает одну пептидную цепь. В одном из воплощений, одна пептидная цепь включает фрагмент антитела, связывающийся

с первичной мишенью, и пептидный фрагмент, связывающийся с вторичным нацеливающим фрагментом (т.е. антигенным рецептором) на иммунных эффекторных клетках. В одном из воплощений, фрагменты антител представляют собой VHH, scFv или их смесь.

В одном из воплощений, вторичная мишень, включенная в соединение-ярлык, включает пептид или белок, например, пептидную метку, а вторичным нацеливающим фрагментом, т.е. антигенным рецептором, включенным в иммунные эффекторные клетки, включает связующее соединение, например, фрагмент антитела, связывающийся с пептидом или белком.

В одном из воплощений, система вторичная мишень/вторичный нацеливающий фрагмент, применяемая в настоящем документе, включает систему эпитопной метки/связующего соединения.

В одном из воплощений, система эпитопной метки/связующего соединения включает эпитопную метку, включающую последовательность SRLEEELRRRLTE, а связующее соединение включает домен VHH верблюда, включающий последовательность CDR1 GVTISALNAMAMG, последовательность CDR2 AVSERGNAM и последовательность CDR3 LEDRVDSFHDY. В одном из воплощений система эпитопная метка/связующее соединение включает эпитопную метку, включающую последовательность SRLEEELRRRLTE, а связующее соединение включает домен VHH верблюда, включающий аминокислотную последовательность EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGVTISALNAMAMGWYRQAPGERRVMVA AVSERGNAMYRESVQGRFTVTRDFTNKMVSLQMDNLKPEDTAVYYCHVLEDRVDSFHDYWGQGTQ VTVSS, аминокислотная последовательность, включающая, по меньшей мере 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% или 80% идентичности указанной аминокислотной последовательности или фрагмент указанной аминокислотной последовательности или аминокислотной последовательности, имеющий, по меньшей мере 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% или 80% идентичности указанной аминокислотной последовательности.

Как он используется в настоящем документе, термин «эпитопная метка» относится к аминокислотному участку, с которым может связываться антитело или белковая молекула с антителоподобной функцией.

В одном из воплощений, соединение-ярлык включает сигнальный пептид, например, N-концевой сигнальный пептид, который обеспечивает секрецию соединения-ярлыка из клетки, экспрессирующей РНК.

Активирующее соединение

Настоящее изобретение дополнительно включает активирующее соединение для

повышения эффективности иммунных эффекторных клеток, таких как Т-клетки.

Как описано в настоящем документе, иммунные эффекторные клетки, сконструированные с помощью рецептора антигена, могут быть предоставлены субъекту путем введения иммунных эффекторных клеток, сконструированных с помощью рецептора антигена, или путем создания у субъекта иммунных эффекторных клеток, сконструированных с помощью рецептора антигена. В одном из воплощений у субъекта, получающего лечение, вырабатываются иммунные эффекторные клетки, сконструированные с применением антигенных рецепторов. Такая генерация *in vivo* обычно обеспечивает субъекту лишь небольшие количества иммунных эффекторных клеток, сконструированных с помощью антигенных рецепторов. Однако ожидается, что эти небольшие количества иммунных эффекторных клеток, сконструированных с применением антигенных рецепторов, будут терапевтически эффективными благодаря сильному стимулирующему эффекту, достигаемому путем предоставления активирующего соединения для антигенного рецептора. Как правило, иммунные эффекторные клетки, сконструированные с помощью антигенного рецептора, могут быть предоставлены субъекту в субтерапевтических количествах, поскольку способы, описанные в настоящем документе, дополнительно предусматривают введение активирующего соединения, содержащего фрагмент, с которым связываются иммунные эффекторные клетки, описанные в настоящем документе, при этом указанное связывание приводит к активации и/или размножению иммунных эффекторных клеток. В одном из воплощений иммунные эффекторные клетки посредством антигенного рецептора связываются с активирующим соединением, когда оно присутствует на клетках вторичных лимфоидных органов, таких как антигенпрезентирующие клетки, в особенности, дендритные клетки.

В одном из воплощений во всех аспектах изобретения РНК, кодирующая активирующее соединение, экспрессируется в клетках субъекта, обеспечивая компонент для связывания с антигенным рецептором, экспрессируемым иммунными эффекторными клетками, причем указанное связывание приводит к стимуляции, праймированию и/или размножению иммунных эффекторных клеток.

Активирующее соединение включает фрагмент, с которым могут связываться иммунные эффекторные клетки. В некоторых воплощениях активирующее соединение включает фрагмент, который соответствует вторичной мишени соединения-ярлыка или его фрагмента или варианта, с которым способны связываться иммунные эффекторные клетки, например, пептидную метку, как описано в настоящем документе.

Активирующее соединение может дополнительно включать фрагмент, который

представляет собой фрагмент, с которым могут связываться иммунные эффекторный клетки, на поверхности клетки, например, на клеточной поверхности антигенпрезентирующих клеток. Такая группировка может включать мембранный белок, например, трансмембранный белок или рецептор. Соответственно, активирующее соединение может включать слитый белок, включающий фрагмент, с которым могут связываться иммунные эффекторные клетки (например, пептидную метку), и фрагмент, который представляет собой фрагмент, с которым могут связываться иммунные эффекторные клетки на поверхности клетки (например, мембранный белок). Фрагмент, с которым могут связываться иммунные эффекторные клетки, обычно присутствует на поверхности клетки, т.е. на внешней стороне клетки.

В одном из воплощений, РНК, кодирующую активирующее соединение, вводят для обеспечения (после экспрессии РНК соответствующими клетками-мишенями) активирующего соединения для стимуляции, праймирования и/или размножения иммунных эффекторных клеток. Иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, стимулированные, праймированные и/или размноженные у пациента, способны распознавать посредством соединения-ярылка популяцию клеток-мишеней или ткань-мишень, экспрессирующую антиген, что приводит к уничтожению пораженных клеток. В одном из воплощений РНК, кодирующая активирующее соединение, нацелена на вторичные лимфоидные органы.

Термин «активация» или «стимуляция», как он используется в настоящем документе, относится к состоянию иммунной эффекторной клетки, такой как Т-клетка, которая была достаточно стимулирована, чтобы вызвать обнаружимую клеточную пролиферацию. Активация также может быть связана с инициацией сигнальных путей, индуцированной выработкой цитокинов и обнаруживаемыми эффекторными функциями. Термин «активированные иммунные эффекторные клетки» относится, среди прочего, к иммунным эффекторным клеткам, которые подвергаются клеточному делению.

Термин «праймирование» относится к процессу, при котором иммунная эффекторная клетка, такая как Т-клетка, впервые контактирует со своим специфическим антигеном и вызывает дифференцировку в эффекторные клетки, такие как эффекторные Т-клетки.

Термин «клональная экспансия» или «размножение» относится к процессу, в котором размножается конкретный объект. В контексте настоящего изобретения этот термин предпочтительно применяют в контексте иммунологического ответа, при котором лимфоциты стимулируются антигеном, пролиферируют и амплифицируются специфические лимфоциты, распознающие указанный антиген. Предпочтительно

клональная экспансия приводит к дифференцировке лимфоцитов.

В общем, активирующее соединение экспрессируется на клеточной поверхности таким образом, что его фрагмент, связывающий антигенный рецептор, доступен для связывания с антигенным рецептором, экспрессируемым иммунными эффекторными клетками.

Термин «экспрессируется на поверхности клетки» или «ассоциируется с поверхностью клетки» означает, что молекула, такая как рецептор или антиген, связана с плазматической мембраной клетки и расположена на ней, в которой, по меньшей мере часть молекулы обращена к внеклеточному пространству указанной клетки и доступна снаружи указанной клетки, например, с помощью антигенного рецептора, расположенного снаружи клетки. В этом контексте часть предпочтительно состоит из, по меньшей мере 4, предпочтительно, по меньшей мере 8, предпочтительно, по меньшей мере 12, более предпочтительно, по меньшей мере 20 аминокислот. Связывание может быть прямым или косвенным. Например, связывание может осуществляться посредством одного или нескольких трансмембранных доменов, одного или нескольких липидных якорей или взаимодействия с любым другим белком, липидом, сахаридом или другой структурой, которая может быть обнаружена на внешнем листке плазматической мембраны клетки. Например, молекула, связанная с поверхностью клетки, может представлять собой трансмембранный белок, имеющий внеклеточную часть, или может быть белком, связанным с поверхностью клетки путем взаимодействия с другим белком, который представляет собой трансмембранный белок.

Термин «клеточная поверхность» или «поверхность клетки» применяют в соответствии с его обычным значением в данной области техники и, таким образом, он включает внешнюю часть клетки, которая доступна для связывания белками и другими молекулами. Антиген экспрессируется на поверхности клеток, если он расположен на поверхности указанных клеток и доступен для связывания, например, антигенспецифическими антителами, добавленными к клеткам. В одном воплощении антиген, экспрессируемый на поверхности клеток, представляет собой интегральный мембранный белок, имеющий внеклеточную часть, распознаваемую рецептором антигена.

Термин «внеклеточная часть» или «экзодомен» в контексте настоящего изобретения относится к части молекулы, такой как белок, которая обращена во внеклеточное пространство клетки и предпочтительно доступна снаружи указанной клетки, например, путем связывания молекул, таких как антитела, расположенных вне клетки.

Иммунные эффекторнeые клетки

Применяемые в настоящем документе иммунные эффекторнeые клетки включают вторичный нацеливающий фрагмент. Этот вторичный нацеливающий фрагмент также в настоящем документе называют химерным антигенным рецептором (CAR) или просто антигенным рецептором. Вторичный нацеливающий фрагмент относится к части иммунных эффекторнeых клеток, которая образует партнера по связыванию для связывающего фрагмента для иммунных эффекторнeых клеток, включенных в активирующее соединение, и/или для вторичной мишени, включенной в соединение-ярылок. Иммунные эффекторнeые клетки предпочтительно способны обеспечивать или вызывать желаемый эффект, например, терапевтический эффект.

Иммунные эффекторнeые клетки, применяемые в соответствии с настоящим изобретением и в которые могут быть введены нуклеиновые кислоты (ДНК или РНК), кодирующие антигенные рецепторы, включают, в частности, иммунные эффекторнeые клетки, такие как клетки с литическим потенциалом, в частности, лимфоидные клетки, и предпочтительно представляют собой Т-клетки, в частности, цитотоксические лимфоциты, предпочтительно выбранные из цитотоксических Т-клеток, естественных клеток-киллеров (NK) и клеток-киллеров, активируемых лимфокинами (LAK). При активации каждый из этих цитотоксических лимфоцитов запускает разрушение клеток-мишеней. Например, цитотоксические Т-клетки вызывают разрушение клеток-мишеней одним или обоими из следующих способов. Во-первых, после активации Т-клетки выделяют цитотоксины, такие как перфорин, гранзимы и гранулизин. Перфорин и гранулизин создают поры в клетке-мишени, а гранзимы проникают в клетку и запускают каспазный каскад в цитоплазме, который индуцирует апоптоз (запрограммированную клеточную смерть) клетки. Во-вторых, апоптоз может быть индуцирован посредством взаимодействия лиганда Fas-Fas между Т-клетками и клетками-мишенями. Клетки, применяемые в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно представляют собой аутологичные клетки, хотя можно применять и гетерологичные клетки или аллогенные клетки.

Термин «эффекторнeые функции» в контексте настоящего изобретения включает любые функции, опосредованные компонентами иммунной системы, которые приводят, например, к уничтожению пораженных клеток, таких как опухолевые клетки, или к ингибированию роста опухоли и/или ингибирование развития опухоли, включая ингибирование диссеминации опухоли и метастазирования. Предпочтительно эффекторнeые функции в контексте настоящего изобретения представляют собой эффекторнeые функции, опосредованные Т-клетками. Такие функции включают в случае

Т-хелперной клетки (Т-клетки $CD4^+$) высвобождение цитокинов и/или активацию $CD8^+$ лимфоцитов (CTL) и/или В-клеток, а в случае CTL элиминацию клеток, т.е. клеток, характеризующихся экспрессией антигена, например, посредством апоптоза или перфорин-опосредованного лизиса клеток, продукции цитокинов, таких как IFN-g и TNF- α , и специфического цитолитического уничтожения клеток-мишеней, экспрессирующих антиген.

Термин «иммунная эффекторная клетка» или «иммунореактивная клетка» в контексте настоящего изобретения относится к клетке, которая осуществляет эффекторные функции во время иммунной реакции. «Иммунная эффекторная клетка» в одном из воплощений способна связывать антиген (например, пептидный антиген), такой как антиген, представленный активирующим соединением и соединением-ярыком в качестве вторичной мишени. Например, иммунные эффекторные клетки включают Т-клетки (цитотоксические Т-клетки, Т-хелперы, инфильтрирующие опухоль Т-клетки), В-клетки, естественные клетки-киллеры, нейтрофилы, макрофаги и дендритные клетки. Предпочтительно в контексте настоящего изобретения «иммунные эффекторные клетки» представляют собой Т-клетки, предпочтительно, $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клетки, наиболее предпочтительно, $CD8^+$ Т-клетки. Согласно изобретению термин «иммунная эффекторная клетка» также включает клетку, которая может созреть в иммунную клетку (такую как Т-клетка, в особенности, Т-хелперная клетка или цитолитическая Т-клетка) при подходящей стимуляции. Иммунные эффекторные клетки включают $CD34^+$ гемопоэтические стволовые клетки, незрелые и зрелые Т-клетки, а также незрелые и зрелые В-клетки. Дифференцировка предшественников Т-клеток в цитолитические Т-клетки при воздействии антигена аналогична клональной селекции иммунной системы.

Иммунные эффекторные клетки, применяемые согласно изобретению, могут экспрессировать эндогенный антигенный рецептор, такой как Т-клеточный рецептор или В-клеточный рецептор, или могут не иметь экспрессии эндогенного антигенного рецептора.

«Лимфоидная клетка» представляет собой клетку, которая, необязательно, после подходящей модификации, например, после переноса антигенного рецептора, такого как TCR или CAR, способна вызывать иммунный ответ, такой как клеточный иммунный ответ, или клетку-предшественник такой клетки, и включает лимфоциты, предпочтительно Т-лимфоциты, лимфобласты и плазматические клетки. Лимфоидная клетка может представлять собой иммунную эффекторную клетку, как описано в настоящем документе. Предпочтительная лимфоидная клетка представляет собой Т-клетку, которая может быть модифицирована для экспрессии рецептора антигена на

поверхности клетки. В одном из воплощений лимфоидная клетка лишена эндогенной экспрессии Т-клеточного рецептора.

Термины «Т-клетка» и «Т-лимфоцит» применяют в настоящем документе взаимозаменяемо и включают Т-хелперные клетки ($CD4^+$ Т-клетки) и цитотоксические Т-клетки (CTL, $CD8^+$ Т-клетки), которые включают цитолитические Т-клетки.

Т-клетки принадлежат к группе лейкоцитов, известных как лимфоциты, и играют центральную роль в клеточном иммунитете. Их можно отличить от других типов лимфоцитов, таких как В-клетки и естественные клетки-киллеры, по наличию специального рецептора на их клеточной поверхности, называемого Т-клеточными рецепторами (TCR). Тимус представляет собой основной орган, ответственный за созревание Т-клеток. Было обнаружено несколько различных подмножеств Т-клеток, каждое из которых выполняет свою функцию.

Т-хелперные клетки помогают другим лейкоцитам в иммунологических процессах, включая созревание В-клеток в плазматические клетки и активацию цитотоксических Т-клеток и макрофагов, среди других функций. Эти клетки также известны как $CD4^+$ Т-клетки, поскольку они экспрессируют гликопротеин CD4 на своей поверхности. Т-хелперы активируются, когда им презентуются пептидные антигены молекулами МНС класса II, которые экспрессируются на поверхности антигенпрезентирующих клеток (APC). После активации они быстро делятся и выделяют небольшие белки, называемые цитокинами, которые регулируют или способствуют активному иммунному ответу.

Цитотоксические Т-клетки разрушают инфицированные вирусом клетки и опухолевые клетки, а также участвуют в отторжении трансплантата. Эти клетки также известны как $CD8^+$ Т-клетки, поскольку они экспрессируют гликопротеин CD8 на своей поверхности. Эти клетки узнают свои цели путем связывания с антигеном, связанным с МНС класса I, который присутствует на поверхности почти каждой клетки организма.

«Регуляторные Т-клетки» или «Трег» представляют собой субпопуляцию Т-клеток, которые модулируют иммунную систему, поддерживают толерантность к аутоантигенам и предотвращают аутоиммунные заболевания. Трег обладают иммуносупрессивным действием и обычно подавляют или снижают индукцию и пролиферацию эффекторных Т-клеток. Трег экспрессируют биомаркеры CD4, FoxP3 и CD25.

В соответствии с настоящим документом, термин «наивные Т-клетки» относится к зрелым Т-клеткам, которые, в отличие от активированных Т-клеток или Т-клеток памяти, не встретили родственный антиген на периферии. Наивные Т-клетки обычно характеризуются поверхностной экспрессией L-селектина (CD62L), отсутствием маркеров активации CD25, CD44 или CD69 и отсутствием изоформы памяти CD45RO.

Как он используется в настоящем документе, термин «Т-клетки памяти» относится к подгруппе или субпопуляции Т-клеток, которые ранее встречались со своим родственным антигеном и реагировали на него. При второй встрече с антигеном Т-клетки памяти могут воспроизводиться, вызывая более быстрый и сильный иммунный ответ, чем в первый раз, когда иммунная система реагировала на антиген. Т-клетки памяти могут представлять собой либо $CD4^+$, либо $CD8^+$ и обычно экспрессируют CD45RO.

Согласно изобретению термин «Т-клетка» также включает клетку, которая может созреть в Т-клетку при подходящей стимуляции.

Большинство Т-клеток имеют Т-клеточный рецептор (TCR), существующий в виде комплекса нескольких белков. Фактический рецептор Т-клеток состоит из двух отдельных пептидных цепей, которые производятся из независимых генов альфа- и бета-рецепторов Т-клеток (TCR α и TCR β) и называются цепями α - и β -TCR. $\gamma\delta$ Т-клетки (гамма-дельта Т-клетки) представляют собой небольшую подгруппу Т-клеток, которые обладают отдельным Т-клеточным рецептором (TCR) на своей поверхности. Однако в $\gamma\delta$ Т-клетках TCR состоит из одной γ -цепи и одной δ -цепи. Эта группа Т-клеток встречается гораздо реже (2% от общего числа Т-клеток), чем $\alpha\beta$ Т-клетки.

Все Т-клетки происходят из гемопоэтических стволовых клеток костного мозга. Гематопоэтические предшественники, происходящие из гемопоэтических стволовых клеток, заселяют тимус и размножаются за счет клеточного деления, образуя большую популяцию незрелых тимоцитов. Самые ранние тимоциты не экспрессируют ни CD4, ни CD8 и поэтому классифицируются как дважды негативные ($CD4^-CD8^-$) клетки. По мере своего развития они становятся дважды положительными тимоцитами ($CD4^+CD8^+$) и, наконец, созревают до одиночных положительных ($CD4^+CD8^-$ или $CD4^-CD8^+$) тимоцитов, которые затем высвобождаются из тимуса в периферические ткани.

Т-клетки обычно можно получить *in vitro* или *ex vivo*, применяя стандартные процедуры. Например, Т-клетки можно выделить из костного мозга, периферической крови или фракции костного мозга или периферической крови млекопитающего, такого как пациент, с применением коммерчески доступной системы разделения клеток. Альтернативно, Т-клетки могут быть получены из родственных или неродственных людей, животных, отличных от человека, клеточных линий или культур. Образец, включающий Т-клетки, может, например, представлять собой мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК).

Как он используется в настоящем документе, термин «НК-клетка» или «естественная клетка-киллер» относится к подгруппе лимфоцитов периферической крови, определяемой экспрессией CD56 или CD16 и отсутствием Т-клеточного рецептора. Как

предусмотрено в настоящем документе, НК-клетку также можно дифференцировать из стволовой клетки или клетки-предшественника.

Рецептор антигена

Описанные в настоящем документе иммунные эффекторные клетки могут быть генетически модифицированы *ex vivo/in vitro* или *in vivo* у субъекта, подвергающегося лечению, для экспрессии антигенного рецептора, такого как антиген, связывающий химерный антигенный рецептор (CAR), на активирующем соединении и на соединении-ярылке соответственно. В одном из воплощений модификация экспрессии антигенного рецептора происходит *ex vivo/in vitro*. Впоследствии модифицированные клетки можно вводить пациенту.

Терапия с переносом адоптивных клеток с применением Т-клеток, сконструированных с помощью CAR, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы, представляет собой многообещающее противораковое терапевтическое средство, поскольку Т-клетки, модифицированные CAR, могут быть сконструированы так, чтобы нацеливаться практически на любой опухолевый антиген, предпочтительно МНС-независимым способом. Например, Т-клетки пациента могут быть генетически сконструированы (генетически модифицированы) для экспрессии CAR, специфически направленных на антигены опухолевых клеток пациента, а затем введены обратно пациенту.

Описанное в настоящем документе изобретение не ограничивается применением аутологичных иммунных эффекторных клеток.

Согласно этому изобретению иммунные эффекторные клетки могут быть генетически модифицированы для экспрессии рецептора антигена. Иммунные эффекторные клетки могут быть генетически модифицированы *ex vivo* или *in vivo* для экспрессии антигенного рецептора. Такая генетическая модификация может быть осуществлена *ex vivo* или *in vitro*, а затем иммунные эффекторные клетки могут быть введены субъекту, нуждающемуся в лечении, или может быть осуществлена *in vivo* у субъекта, нуждающегося в лечении.

В различных воплощениях субъекту, подлежащему лечению, вводят иммунные эффекторные клетки либо от субъекта, подлежащего лечению, либо от другого субъекта. Введенные иммунные эффекторные клетки могут быть генетически модифицированы *ex vivo* перед введением или генетически модифицированы *in vivo* у субъекта. В одном из воплощений иммунные эффекторные клетки представляют собой эндогенные клетки субъекта, подлежащего лечению, и клетки, генетически модифицированные *in vivo* у субъекта для экспрессии антигенного рецептора, описанного в настоящем документе.

Согласно изобретению термин «CAR» (или «химерный антигенный рецептор») представляет собой синоним терминов «химерный Т-клеточный рецептор» и «искусственный Т-клеточный рецептор» и относится к искусственному рецептору, содержащему одну молекулу или комплекс молекулы, которые распознают целевую структуру, т.е. связываются с целевой структурой, (например, антиген) (например, путем связывания антигенсвязывающего домена с антигеном) и могут придавать специфичность иммунной эффекторной клетке, такой как Т-клетка, экспрессирующая указанный CAR на поверхности клетки. Такие клетки не обязательно требуют процессинга и презентации антигена для распознавания, а скорее могут распознавать предпочтительно со специфичностью любой антиген. Предпочтительно, распознавание целевой структуры с помощью CAR приводит к активации иммунной эффекторной клетки, экспрессирующей указанный CAR. CAR может включать одну или несколько белковых единиц, причем указанные белковые единицы включают один или несколько доменов, как описано в настоящем документе. Термин «CAR» не включает рецепторы Т-клеток.

CAR включает специфичный для мишени связывающий элемент, иначе называемый антигенсвязывающим фрагментом или антигенсвязывающим доменом, который обычно представляет собой часть внеклеточного домена CAR. В частности, CAR по изобретению нацеливает антиген на активирующее соединение и соединение-ярлык.

В одном из воплощений изобретения, антигенсвязывающий домен включает переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина (VH) со специфичностью к антигену и переменную область легкой цепи иммуноглобулина (VL) со специфичностью к антигену. В одном из воплощений иммуноглобулин представляет собой антитело. В одном из воплощений указанная переменная область тяжелой цепи (VH) и соответствующая переменная область легкой цепи (VL) соединены посредством пептидного линкера. Предпочтительно часть антигенсвязывающего фрагмента в CAR представляет собой scFv. В одном из воплощений антигенсвязывающий домен включает домен VHH.

CAR разработан так, чтобы включать трансмембранный домен, слитый с внеклеточным доменом CAR. В одном из воплощений трансмембранный домен не связан естественным образом ни с одним из доменов CAR. В одном из воплощений трансмембранный домен естественным образом связан с одним из доменов CAR. В одном из воплощений трансмембранный домен модифицируют путем замены аминокислот, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами одного и того же или разных поверхностных мембранных белков, чтобы минимизировать взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса. Трансмембранный домен

может быть получен либо из природного, либо из синтетического источника. Если источник представляет собой природный источник, то домен может быть получен из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области, имеющие конкретное применение в настоящем изобретении, могут происходить из (т.е. включать, по меньшей мере трансмембранную область (трансмембранные области)) альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Альтернативно, трансмембранный домен может быть синтетическим, и в этом случае он будет включать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. Предпочтительно триплет фенилаланина, триптофана и валина будет обнаружен на каждом конце синтетического трансмембранного домена.

В некоторых случаях CAR изобретения включает шарнирный домен, который образует связь между трансмембранным доменом и внеклеточным доменом.

Цитоплазматический домен или иначе внутриклеточный сигнальный домен CAR отвечает за активацию, по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки, в которую помещен CAR. Термин «эффекторная функция» относится к специализированной функции клетки. Эффекторной функцией Т-клетки, например, может быть цитолитическая активность или хелперная активность, включая секрецию цитокинов. Таким образом, термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к части белка, которая преобразует сигнал эффекторной функции и направляет клетку на выполнение специализированной функции. Хотя обычно можно применять весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости применять всю цепь. До тех пор, пока используют усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, такая укороченная часть может быть применена вместо интактной цепи, при условии, что она передает сигнал эффекторной функции. Таким образом, термин «внутриклеточный сигнальный домен» включает любую укороченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для передачи сигнала эффекторной функции.

Известно, что сигналов, генерируемых только через TCR, недостаточно для полной активации Т-клетки и что также необходим вторичный или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация Т-клеток опосредована двумя различными классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, которые инициируют антигензависимую первичную активацию через TCR (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и теми, которые действуют антиген-независимым образом, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал

(вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности).

В одном из воплощений, CAR включает первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность, полученную из CD3-дзета. Кроме того, цитоплазматический домен CAR может включать сигнальный домен CD3-дзета в сочетании с костимулирующей сигнальной областью.

Возможность отнесения чего-либо к домену костимуляции ограничена только наличием у этого способности усиливать пролиферацию и выживаемость клетки после связывания целевого фрагмента с помощью CAR. Подходящие домены костимуляции включают CD28, CD137 (4-1BB), член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR), CD134 (OX40), член суперсемейства рецепторов TNFR, и CD278 (ICOS), костимулирующую молекулу суперсемейства CD28, экспрессируемую на активированных Т-клетках. Специалисту в данной области техники будет понятно, что варианты последовательностей этих отмеченных костимуляционных доменов можно применять без негативного воздействия на изобретение, при этом варианты обладают той же или сходной активностью, что и домен, на котором они смоделированы. Такие варианты будут иметь, по меньшей мере примерно 80% идентичности последовательности аминокислотной последовательности домена, из которого они произошли. В некоторых воплощениях изобретения конструкции CAR включают два домена совместной стимуляции. Хотя конкретные комбинации включают все возможные варианты четырех отмеченных доменов, конкретные примеры включают CD28⁺CD137 (4-1BB) и CD28⁺CD134 (OX40).

Цитоплазматические сигнальные последовательности внутри цитоплазматической сигнальной части CAR могут быть связаны друг с другом в случайном или заданном порядке. Необязательно, связь может образовывать короткий олиго- или полипептидный линкер, предпочтительно, длиной от 2 до 10 аминокислот. Дублет глицин-серин обеспечивает особенно подходящий линкер.

В одном из воплощений, CAR включает сигнальный пептид, который направляет образующийся белок в эндоплазматический ретикулум. В одном из воплощений сигнальный пептид предшествует антигенсвязывающему домену. В одном из воплощений сигнальный пептид происходит из иммуноглобулина, такого как IgG.

CAR может включать вышеуказанные домены вместе в форме слитого белка. Такие слитые белки обычно включают антигенсвязывающий домен, один или несколько доменов костимуляции и сигнальную последовательность, связанную в направлении от N-конца к C-концу. Однако CAR по настоящему изобретению не ограничиваются этим расположением, и другие варианты приемлемы и включают связывающий домен,

сигнальный домен и один или несколько доменов совместной стимуляции. Понятно, что поскольку связывающий домен должен быть свободным для связывания антигена, размещение связывающего домена в слитом белке обычно будет таким, чтобы обеспечить отображение области на внешней стороне клетки. Таким же образом, поскольку костимуляционные и сигнальные домены служат для индукции активности и пролиферации цитотоксических лимфоцитов, слитый белок обычно отображает эти два домена внутри клетки.

В одном из воплощений молекула CAR состоит из:

- i) домена связывания целевого антигена (например, эпитопной метки);
- ii) трансмембранного домена; и
- iii) внутриклеточного домена, который включает костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета.

В одном из воплощений, антигенсвязывающий домен включает scFv. В одном из воплощений, трансмембранный домен включает трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи рецептора Т-клетки, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD160, CD19, IL2R бета, IL2R гамма, IL7Ra, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D и NKG2C, или его функциональный вариант. В одном из воплощений, трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD8 α . В одном из воплощений антигенсвязывающий домен соединен с трансмембранным доменом шарнирным доменом. В одном из воплощений шарнирный домен представляет собой шарнирный домен CD8 α .

В одном из воплощений, молекулы CAR изобретения включает:

- i) целевой антигенсвязывающий домен;
- ii) шарнирный домен CD8 α ;
- iii) трансмембранный домен CD8 α ; и
- iv) внутриклеточный домен, который включает костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета.

Для введения антигенных рецепторов, таких как конструкции CAR, в клетки, такие как Т-клетки, можно применять различные способы для получения клеток, генетически модифицированных для экспрессии антигенных рецепторов. Такие способы включают трансфекцию ДНК не на вирусной основе, трансфекцию РНК не на вирусной основе, например, трансфекцию мРНК, системы на основе транспозонов и системы на основе вирусов. Трансфекция ДНК на невирусной основе имеет низкий риск инсерционного мутагенеза. Системы на основе транспозонов могут интегрировать трансгены более эффективно, чем плазмиды, не включающие интегрирующего элемента. Вирусные системы включают применение γ -ретровирусов и лентивирусных векторов. Гамма-ретровирусы относительно легко производить, они эффективно и надолго трансдуцируют Т-клетки и предварительно доказали свою безопасность с точки зрения интеграции в первичные Т-клетки человека. Лентивирусные векторы также эффективно и навсегда трансдуцируют Т-клетки, но их производство обходится дороже. Они также потенциально более безопасны, чем системы на основе ретровирусов.

«Лентивирус» согласно настоящему документу относится к роду семейства Retroviridae. Лентивирусы уникальны среди ретровирусов, поскольку способны инфицировать неделящиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической информации в ДНК клетки-хозяина, поэтому представляют собой один из наиболее эффективных способов векторной доставки генов. ВИЧ, SIV и FIV представляют собой примерами лентивирусов. Векторы, полученные из лентивирусов, предлагают средства для достижения значительного уровня переноса генов *in vivo*.

В одном из воплощений Т-клетки или предшественники Т-клеток трансфицируют либо *ex vivo*, либо *in vivo* нуклеиновой кислотой, кодирующей рецептор антигена. В одном из воплощений может быть применена комбинация трансфекции *ex vivo* и *in vivo*. В одном из воплощений Т-клетки или предшественники Т-клеток происходят от субъекта, подлежащего лечению. В одном из воплощений всех аспектов изобретения Т-клетки или предшественники Т-клеток происходят от субъекта, который отличается от субъекта, подлежащего лечению.

CAR Т-клетки могут быть получены *in vivo* и, следовательно, почти мгновенно, с применением наночастиц, нацеленных на Т-клетки. Например, наночастицы на основе поли(β -аминоэфира) могут быть связаны с фрагментами F(ab) анти-CD3 ϵ для связывания с CD3 на Т-клетках. При связывании с Т-клетками эти наночастицы подвергаются эндоцитозу. Их содержимое, например, плазмидная ДНК, кодирующая противоопухолевый антиген CAR, может быть направлена в ядро Т-клетки благодаря включению пептидов, содержащих последовательности, ассоциированные с

микротрубочками (MTAS) и сигналы ядерной локализации (NLS). Включение транспозонов, фланкирующих кассету экспрессии гена CAR, и отдельной плазмиды, кодирующей гиперактивную транспозазу, может обеспечить эффективную интеграцию вектора CAR в хромосомы. Такая система, которая позволяет производить CAR T-клетки *in vivo* после инфузии наночастиц, описана в работе Smith et al. (2017) Nat. Nanotechnol. 12:813-820.

Кроме того, T-клетки CD19-CAR можно генерировать непосредственно *in vivo* с применением лентивирусного вектора CD8-LV, специально нацеленного на CD8⁺ клетки человека (Pfeiffer A. et al., EMBO Mol. Med. Nov;10(11), 2018, 9158).

Другая возможность заключается в применении способа CRISPR/Cas9 для намеренного размещения кодирующей последовательности CAR в определенном локусе. Например, существующие T-клеточные рецепторы (TCR) могут быть нокаутированы, одновременно нокаутируя CAR и помещая его под динамический регуляторный контроль эндогенного промотора, в противном случае это привело бы к умеренной экспрессии TCR; сравните, например, Euyquem et al. (2017) Nature 543:113-117.

В одном из воплощений, клетки, генетически модифицированные для экспрессии антигенного рецептора, стабильно или временно трансфицируют нуклеиновой кислотой, кодирующей антигенный рецептор. Таким образом, нуклеиновая кислота, кодирующая рецептор антигена, интегрирована или не интегрирована в геном клетки.

В одном из воплощений клетки, генетически модифицированные для экспрессии антигенного рецептора, инактивируют для экспрессии эндогенного T-клеточного рецептора и/или эндогенного HLA.

В одном из воплощений, клетки, описанные в настоящем документе, могут быть аутологичным, аллогенным или сингенным субъекту, подлежащему лечению. В одном из воплощений, настоящее изобретение предусматривает извлечение клеток у пациента и последующую повторную доставку клеток пациенту. В одном из воплощений, настоящее изобретение не предусматривает удаление клеток у пациента. В последнем случае выполняются все этапы генетической модификации клеток *in vivo*.

Термин «аутологичный» применяют для описания всего, что происходит от одного и того же субъекта. Например, «аутологичный трансплантат» относится к трансплантату ткани или органов, полученных от одного и того же субъекта. Такие процедуры выгодны, поскольку они преодолевают иммунологический барьер, который в противном случае приводит к отторжению.

Термин «аллогенный» применяют для описания всего, что получено от разных особей одного и того же вида. Говорят, что два или более индивидуума аллогенны друг

другу, если гены в одном или нескольких локусах не идентичны.

Термин «сингенный» применяют для описания всего, что получено от индивидуумов или тканей, имеющих идентичные генотипы, т.е. однойцевых близнецов или животных одной и той же инбредной линии, или их тканей.

Термин «гетерологичный» применяют для описания чего-либо, состоящего из множества различных элементов. Например, перенос костного мозга одного человека другому человеку представляет собой гетерологичный трансплантат. Гетерологичный ген представляет собой ген, полученный из источника, отличного от субъекта.

Связывающие фрагменты и агенты

Настоящее изобретение описывает связывающие фрагменты или агенты, такие как антитела или производные антител.

Термин «эпитоп» относится к части или фрагменту молекулы или антигена, который распознается связывающим агентом. Например, эпитоп может распознаваться антителом или любым другим связывающим белком. Эпитоп может включать непрерывную или прерывистую часть антигена и может включать от примерно 5 до примерно 100, например от примерно 5 до примерно 50, более предпочтительно от примерно 8 до примерно 30, наиболее предпочтительно от примерно 8 до примерно 25 аминокислот, например, длина эпитопа может предпочтительно составлять 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот. В одном из воплощений длина эпитопа составляет от примерно 10 до примерно 25 аминокислот. Термин «эпитоп» включает структурные эпитопы.

Термин «иммуноглобулин» относится к классу структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L) низкомолекулярных цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, причем все четыре соединены между собой дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо изучена. Смотри, например, *Fundamental Immunology Ch. 7* (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Вкратце, каждая тяжелая цепь обычно состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе как VH или V_H) и константной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе как CH или C_H). Константная область тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Шарнирная область представляет собой область между доменами CH1 и CH2 тяжелой цепи и обладает высокой гибкостью. Дисульфидные связи в шарнирной области представляют собой часть взаимодействия между двумя тяжелыми цепями в молекуле IgG. Каждая легкая цепь обычно состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно в настоящем документе как VL или V_L) и константной области

легкой цепи (сокращенно в настоящем документе как CL или CL). Константная область легкой цепи обычно состоит из одного домена CL. Области VH и VL могут быть далее подразделены на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или форме структурно определенных петель), также называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающимися с более консервативными областями, называемые рамочными регионами (FR). Каждая область VH и VL обычно состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (смотри также Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). Если иное не указано или не противоречит контексту, то ссылки на положения аминокислот в константных областях в настоящем изобретении соответствуют EU-нумерации (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 May;63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. 1991 NIH Publication No. 91-3242). В общем, CDR, описанные в настоящем документе, определены по Кабату.

Термин «аминокислота, соответствующая положению...», как он используется в настоящем документе, относится к номеру положения аминокислоты в тяжелой цепи человеческого IgG1. Соответствующие положения аминокислот в других иммуноглобулинах можно найти путем сопоставления с IgG1 человека. Таким образом, аминокислота или сегмент в одной последовательности, которая «соответствует» аминокислоте или сегменту в другой последовательности, представляет собой аминокислоту или сегмент, который выравнивается с другой аминокислотой или сегментом с применением стандартной программы выравнивания последовательностей, такой как ALIGN, ClustalW или аналогичной, обычно с настройками по умолчанию и имеет, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или, по меньшей мере 95% идентичности тяжелой цепи человеческого IgG1. В данной области техники считается хорошо известным, как выравнивать последовательность или сегмент в последовательности и тем самым определить положение в последовательности, соответствующее положению аминокислоты согласно настоящему изобретению.

Термин «антитело» (Ab) в контексте настоящего изобретения относится к молекуле иммуноглобулина, фрагменту молекулы иммуноглобулина или производному любого из них, которые обладают способностью связываться, предпочтительно специфически связываться, с антигеном. В одном из воплощений связывание происходит в типичных физиологических условиях с периодом полураспада в значительные периоды времени, например, по меньшей мере примерно 30 минут, по меньшей мере примерно 45 минут, по меньшей мере примерно один час, по меньшей мере примерно два часа, по меньшей мере

примерно четыре часа, по меньшей мере примерно 8 часов, по меньшей мере примерно 12 часов, примерно 24 часов или более, примерно 48 часов или более, примерно 3, 4, 5, 6, 7 или более дней и т.д. или любые другие соответствующие функционально определенный период (например, время, достаточное для индукции, стимулирования, усиления и/или модуляции физиологического ответа, связанного со связыванием антитела с антигеном). Вариабельные участки тяжелой и легкой цепей молекулы иммуноглобулина содержат связывающий домен, взаимодействующий с антигеном. Термин «антигенсвязывающая область», «связывающая область» или «связывающий домен», применяемый в настоящем документе, относится к области или домену, который взаимодействует с антигеном и обычно включает как область VH, так и область VL. Термин «антитело», применяемый в настоящем документе, включает не только моноспецифические антитела, но также мультиспецифические антитела, которые включают множество, например, два или более, например, три или более различных антигенсвязывающих областей. Константные области антител (Abs) могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q, первый компонент классического пути активации комплемента. Как указано выше, термин «антитело», как он используется в настоящем документе, если иное не указано или явно не противоречит контексту, включает фрагменты антитела, которые представляют собой антигенсвязывающие фрагменты, т.е. сохраняют способность специфически связываться с антигеном, и производные антитела, т.е. конструкции, полученные из антитела. Показано, что антигенсвязывающую функцию антитела могут выполнять фрагменты полноразмерного антитела. Примеры антигенсвязывающих фрагментов, охватываемых термином «антитело», включают (i) Fab' или Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, или моновалентное антитело, как описано в WO2007059782 (Genmab); (ii) F(ab')₂-фрагменты, бивалентные фрагменты, включающие два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий по существу из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий по существу из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al., *Nature* **341**, 544-546 (1989)), который состоит по существу из домена VH и также называется доменом антитела (Holt et al; *Trends Biotechnol.* 2003 Nov; **21**(11):484-90); (vi) полученное от верблюдовых или молекулы нанотел (Revets et al; *Expert Opin Biol Ther.* 2005 Jan; **5**(1):111-24) and (vii) выделенную область, определяющую комплементарность (CDR). Более того, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединить с помощью рекомбинантных способов синтетическим линкером, который

позволяет создавать из них единую белковую цепь, в которой VL и VH-области спариваются с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), см., например, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) и Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Такие одноцепочечные антитела включены в термин «антитело», если иное не указано или явно не указано в контексте. Хотя такие фрагменты обычно включают в понятие антитела, они все вместе и каждый независимо представляют собой уникальные особенности настоящего изобретения, демонстрируя различные биологические свойства и полезность. Эти и другие полезные фрагменты антител в контексте настоящего изобретения, а также биспецифические форматы таких фрагментов обсуждают далее в настоящем документе. Также следует понимать, что термин «антитело», если не указано иное, также включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAbs), антителоподобные полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела, и фрагменты антител, сохраняющие способность специфически связываться с антигеном (антигенсвязывающие фрагменты), полученные любым известным способом, таким как ферментативное расщепление, пептидный синтез и рекомбинантные способы.

Фраза «одноцепочечный Fv» или «scFv» относится к антителу, в котором переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL) традиционного двухцепочечного антитела соединены с образованием одной цепи. Необязательно между двумя цепями вставляют линкер (обычно пептид), чтобы обеспечить правильное сворачивание и создание активного сайта связывания.

Однодоменное антитело, также известное как нанотело, представляет собой фрагмент антитела, состоящий из одного мономерного переменного домена антитела. В одном из воплощений однодоменное антитело представляет собой переменный домен (VH) антитела с тяжелой цепью. Они называются фрагментами VH_H. Как и целое антитело, однодоменное антитело способно избирательно связываться со специфическим антигеном. Первые однодоменные антитела были созданы на основе антител с тяжелой цепью, обнаруженных у верблюдовых. У хрящевых рыб также есть антитела с тяжелой цепью (IgNAR, «рецептор нового антигена иммуноглобулина»), из которых можно получить однодоменные антитела, называемые фрагментами VNAR. Альтернативный подход заключается в разделении димерных переменных доменов общего иммуноглобулина G (IgG) человека или мышей на мономеры. Хотя большинство исследований однодоменных антител в настоящее время основано на переменных доменах тяжелых цепей, также было показано, что нанотела, полученные из легких цепей, специфически связываются с целевыми эпитопами.

Антитело может иметь любой изотип. Как он используется в настоящем документе, термин «изотип» относится к классу иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. Когда конкретный изотип, например IgG1, упоминают в настоящем документе, этот термин не ограничивается конкретной последовательностью изотипа, например, определенной последовательностью IgG1, но применяют для указания того, что антитело по последовательности ближе к этому изотипу, например IgG1, чем к другим изотипам. Таким образом, например, антитело IgG1 по изобретению может представлять собой вариант последовательности природного антитела IgG1, включая вариации константных областей.

В различных воплощениях антитело представляет собой антитело IgG1, более конкретно IgG1, изотип каппа, или IgG1, изотип лямбда (т.е. IgG1, κ , λ), антитело IgG2a (например, IgG2a, κ , λ), антитело IgG2b (например, IgG2b, κ , λ), антитело IgG3 (например, IgG3, κ , λ) или антитело IgG4 (например, IgG4, κ , λ).

Термин «моноклональное антитело», применяемый в настоящем документе, относится к препарату молекул антител одномолекулярного состава. Композиция моноклональных антител демонстрирует единственную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу. Соответственно, термин «моноклональное антитело человека» относится к антителам, проявляющим единственную специфичность связывания, которые имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие моноклональные антитела могут быть получены с помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного или трансхромосомного животного, отличного от человека, такого как трансгенная мышь, имеющая геном, включающий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи, слитые с иммортализованной клеткой.

Термин «химерное антитело», примененный в настоящем документе, относится к антителу, в котором переменная область получена из вида, отличного от человека (например, полученного от грызунов), а константная область получена из другого вида, такого как человек. Химерные моноклональные антитела для терапевтического применения разрабатываются для снижения иммуногенности антител. Термины «переменная область» или «переменный домен», применяемые в контексте химерных антител, относятся к области, которая включает CDR и каркасные области как тяжелой, так и легкой цепей иммуноглобулина. Химерные антитела могут быть получены с применением стандартных ДНК-технологий, как описано в Sambrook et al., 1989,

Molecular Cloning: A laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ch. 15. Химерное антитело может представлять собой генетически или ферментативно сконструированное рекомбинантное антитело. Специалисту в данной области техники известно, как получить химерное антитело, и, таким образом, создание химерного антитела согласно настоящему изобретению может быть выполнено другими способами, кроме описанных в настоящем документе.

Термин «гуманизированное антитело», примененный в настоящем документе, относится к генно-инженерному антителу, происходящему не от человека, которое включает константные домены антитела человека и переменные домены, происходящие не от человека, модифицированные так, чтобы они содержали высокий уровень гомологии последовательностей с переменными доменами человека. Этого можно достичь путем трансплантации шести определяющих комплементарность областей (CDR) антитела, происходящего не от человека, которые вместе образуют сайт связывания антигена, на гомологичную человеческую акцепторную каркасную область (FR) (смотри WO92/22653 и EP0629240). Чтобы полностью восстановить аффинность связывания и специфичность родительского антитела, может потребоваться замена каркасных остатков родительского антитела (т.е. антитела, происходящего не от человека) на человеческие каркасные области (обратные мутации). Моделирование структурной гомологии может помочь идентифицировать аминокислотные остатки в каркасных областях, которые важны для связывающих свойств антитела. Таким образом, гуманизированное антитело может включать CDR-последовательности, происходящие не от человека, в первую очередь человеческие каркасные области, необязательно включающие одну или несколько обратных аминокислотных мутаций в аминокислотную последовательность, происходящую не от человека, и полностью человеческие константные области. Необязательно, для получения гуманизированного антитела с предпочтительными характеристиками, такими как аффинность и биохимические свойства, могут быть применены дополнительные модификации аминокислот, которые не обязательно представляют собой обратные мутации.

Термин «человеческое антитело», примененный в настоящем документе, относится к антителам, имеющим переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, вызванные случайным или сайт-специфичным мутагенезом *in vitro* или соматическими мутациями *in vivo*). Однако термин «человеческое антитело», примененный в настоящем документе, не

предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, таких как мышь или крыса, были трансплантированы на человеческие каркасные последовательности. Человеческие моноклональные антитела могут быть получены различными способами, включая общепринятую методику получения моноклональных антител, например, стандартную технологию гибридизации соматических клеток по Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Хотя процедуры гибридизации соматических клеток в принципе предпочтительны, можно применять и другие способы получения моноклональных антител, например, вирусную или онкогенную трансформацию В-лимфоцитов или способы фагового дисплея с применением библиотек генов антител человека. Мышиная система представляет собой подходящую животную систему для получения гибридом, секретирующих человеческие моноклональные антитела. Получение гибридомы у мышей представляет собой хорошо отработанную процедуру. Протоколы иммунизации и способы выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны в данной области техники. Также известны партнеры по слиянию (например, клетки мышинной миеломы) и процедуры слияния. Таким образом, человеческие моноклональные антитела могут, например, быть получены с применением трансгенных или трансхромосомных мышей или крыс, несущих части иммунной системы человека, а не системы мыши или крысы. Соответственно, в одном из воплощений человеческое антитело получают от трансгенного животного, такого как мышь или крыса, несущего последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека вместо последовательностей иммуноглобулина животного. В таких воплощениях антитело происходит из последовательностей иммуноглобулина зародышевого типа человека, введенных животному, но конечная последовательность антитела представляет собой результат дальнейшей модификации указанных последовательностей иммуноглобулина зародышевого типа человека за счет соматических гипермутаций и созревания аффинности с помощью механизма эндогенных антител животного, смотри, например, Mendez et al. 1997 *Nat Genet.* 15(2):146-56.

При применении в настоящем документе, если это не противоречит контексту, термин «Fab-плечо», «связывающее плечо» или «плечо» включает одну пару тяжелая цепь-легкая цепь, и его применяют в настоящем документе взаимозаменяемо с термином «полумолекула».

Термин «полноразмерный», когда он применяют в контексте антитела, указывает, что антитело не представляет собой фрагмент, а содержит все домены конкретного изотипа, обычно встречающиеся для этого изотипа в природе, например, домены VH, CH1, CH2, CH3, шарнир, VL и CL для антитела IgG1.

При применении в настоящем документе, если это не противоречит контексту, термин «область Fc» относится к области антитела, состоящей из двух последовательностей Fc тяжелых цепей иммуноглобулина, причем указанные последовательности Fc включают, по меньшей мере шарнирную область, домен CH2 и домен CH3.

Как он используется в настоящем документе, термины «связывающий» или «способный к связыванию» в контексте связывания антитела с заданным антигеном или эпитопом обычно представляют собой связывание со аффинностью, соответствующей K_D примерно 10^{-7} М или менее, например, примерно 10^{-8} М или менее, например, примерно 10^{-9} М или менее, примерно 10^{-10} М или менее или примерно 10^{-11} М или даже меньше, при определении с помощью Интерферометрии биослоя (BLI) или, например, при определении с применением технология поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в приборе VIAcore 3000 с применением антигена в качестве лиганда и антитела в качестве анализа. Антитело связывается с заранее определенным антигеном со сродством, соответствующим K_D , который, по меньшей мере в десять раз ниже, например, по меньшей мере в 100 раз ниже, например, по меньшей мере в 1000 раз ниже, например, по меньшей мере в 10 000 раз ниже, например, по меньшей мере в 100 000 раз ниже, чем его сродство к связыванию с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от заранее определенного антигена или близкородственного антигена. Количество, с которым аффинность ниже, зависит от K_D антитела, так что, когда K_D антитела очень низкое (т.е. антитело высокоспецифично), то степень, в которой сродство к антигену ниже, чем сродство к неспецифическому антигену, может быть, по меньшей мере в 10 000 раз.

Термин « k_d » (сек^{-1}), применяемый в настоящем документе, относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Указанное значение также называется значением k_{off} .

Термин « K_D » (М), примененный в настоящем документе, относится к константе равновесия диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Настоящее изобретение также предусматривает антитела, включающие функциональные варианты областей VL, областей VH или одного или нескольких CDR антител, описанных в настоящем документе. Функциональный вариант VL, VH или CDR, применяемый в контексте антитела, по-прежнему позволяет антителу сохранять, по меньшей мере значительную часть (по меньшей мере, примерно 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более) аффинности и/или специфичности/селективности «эталонного» или «родительского» антитела и в некоторых случаях такое антитело может быть связано с

большой аффинностью, селективностью и/или специфичностью, чем исходное антитело.

Такие функциональные варианты обычно сохраняют значительную идентичность последовательности родительского антитела.

Типичные варианты включают те, которые отличаются от областей VH, и/или VL, и/или CDR последовательностей родительских антител главным образом консервативными заменами; например, вплоть до 10, например, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замена в варианте представляют собой замены консервативных аминокислотных остатков.

Функциональные варианты последовательностей антител, описанных в настоящем документе, таких как области VL или области VH, или последовательности антител, имеющие определенную степень гомологии или идентичности с последовательностями антител, описанными в настоящем документе, такие как области VL или области VH, предпочтительно включают модификации или вариации последовательностей, не представляющих собой CDR, в то время как последовательности CDR предпочтительно остаются неизменными.

Термин «специфичность», применяемый в настоящем документе, имеет следующее значение, если ему не противоречит контекст. Два антитела обладают «одинаковой специфичностью», если они связываются с одним и тем же антигеном и одним и тем же эпитопом.

Термины «конкурирует» и «конкуренция» могут относиться к конкуренции между первым антителом и вторым антителом к одному и тому же антигену. Альтернативно, «конкурирует» и «конкуренция» могут также относиться к конкуренции между антителом и эндогенным лигандом за связывание с соответствующим рецептором эндогенного лиганда. Если антитело предотвращает связывание эндогенного лиганда с его рецептором, говорят, что такое антитело блокирует эндогенное взаимодействие лиганда с его рецептором и, следовательно, конкурирует с эндогенным лигандом. Специалисту в данной области техники хорошо известно, как проверить конкуренцию антител за связывание с целевым антигеном. Пример такого способа представляет собой, так называемый анализ перекрестной конкуренции, который можно, например, проводить способом ELISA или способом проточной цитометрии. Альтернативно, конкуренцию можно определить с помощью интерферометрии биослоя.

Антитела, которые конкурируют за связывание с антигеном-мишенью, могут связывать различные эпитопы антигена, при этом эпитопы расположены настолько близко друг к другу, что связывание первого антитела с одним эпитопом предотвращает связывание второго антитела с другим эпитопом. Однако в других ситуациях два разных антитела могут связываться с одним и тем же эпитопом антигена и конкурировать за

связывание в анализе конкурентного связывания. Считается, что такие антитела, связывающиеся с одним и тем же эпитопом, имеют одинаковую специфичность. Таким образом, в одном из воплощений считается, что антитела, связывающиеся с одним и тем же эпитопом, связываются с одними и теми же аминокислотами на молекуле-мишени. То, что антитела связываются с одним и тем же эпитопом на целевом антигене, может быть определено с помощью стандартных экспериментов по аланиновому сканированию или экспериментов по кристаллизации антитело-антиген, известных специалисту в данной области техники. Предпочтительно антитела или связывающие домены, связывающиеся с разными эпитопами, не конкурируют друг с другом за связывание с соответствующими эпитопами.

Как описано выше, в данной области техники описаны различные форматы антител. Связывающий агент по настоящему изобретению в принципе может включать антитело любого изотипа. Выбор изотипа обычно будет определяться желаемыми Fc-опосредованными эффекторными функциями, такими как индукция ADCC, или потребностью в антителе, лишенном Fc-опосредованной эффекторной функции («инертное» антитело). Типичными изотипами представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Можно применять любую из константных областей легкой цепи человека, каппа или лямбда. Эффекторная функция антител по настоящему изобретению может быть изменена путем переключения изотипа, например, на антитела IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM для различных терапевтических применений. В одном из воплощений обе тяжелые цепи антитела по настоящему изобретению относятся к изотипу IgG1, например IgG1,к. Необязательно, тяжелая цепь может быть модифицирована в шарнире и/или области CH3, как описано в других местах настоящего документа.

Предпочтительно, каждая из антигенсвязывающих областей или доменов включает переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), причем каждая из указанных переменных областей включает три последовательности CDR, CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и четыре каркасные последовательности: FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно. Кроме того, предпочтительно антитело включает две константные области тяжелой цепи (CH) и две константные области легкой цепи (CL).

В одном из воплощений, связывающий агент включает полноразмерное антитело, такое как полноразмерное антитело IgG1.

В другом воплощении, связывающий агент включает фрагмент антитела, такой как Fab' или Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, моновалентное антитело, такое как описано в WO2007059782 (Genmab), фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fd, фрагмент Fv, фрагмент dAb, верблюдовые или нанотела, или

изолированную область, определяющую комплементарность (CDR).

Термин «связывающий агент» в контексте настоящего изобретения относится к любому агенту, способному связываться с желаемыми антигенами. В некоторых воплощениях связывающий агент представляет собой или включает антитело, фрагмент антитела или любой другой связывающий белок или любую их комбинацию.

Термин «связывающий фрагмент» в контексте настоящего изобретения относится к любому фрагменту, группе или домену, способному связываться с желаемыми антигенами. В некоторых воплощениях связывающий фрагмент представляет собой или включает антитело, фрагмент антитела или любой другой связывающий белок или любую их комбинацию.

Нуклеиновые кислоты

Термин «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота», как он используется в настоящем документе, включает ДНК и РНК, такие как геномная ДНК, кДНК, мРНК, молекулы, полученные рекомбинантным путем и химически синтезированные. Нуклеиновая кислота может быть одноцепочечной или двухцепочечной. РНК включает транскрибируемую *in vitro* РНК (IVT РНК) или синтетическую РНК. Согласно изобретению полинуклеотид предпочтительно выделяют.

Нуклеиновые кислоты могут включаться в вектор. Термин «вектор», как он используется в настоящем документе, включает любые векторы, известные специалисту в данной области техники, включая плазмидные векторы, космидные векторы, фаговые векторы, такие как фаг лямбда, вирусные векторы, такие как ретровирусные, аденовирусные или бакуловирусные векторы, или искусственные хромосомные векторы, такие как бактериальные искусственные хромосомы (BAC), дрожжевые искусственные хромосомы (YAC) или искусственные хромосомы P1 (PAC). Указанные векторы включают векторы экспрессии, а также векторы клонирования. Векторы экспрессии включают плазмиды, а также вирусные векторы и обычно включают желаемую кодирующую последовательность и соответствующие последовательности ДНК, необходимые для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине (например, бактериях, дрожжах, растении, насекомом или млекопитающем) или в системах экспрессии *in vitro*. Векторы клонирования обычно применяют для конструирования и амплификации определенного желаемого фрагмента ДНК, и в них могут отсутствовать функциональные последовательности, необходимые для экспрессии желаемых фрагментов ДНК.

В одном из воплощений всех аспектов изобретения, РНК, кодирующая активирующее соединение, описанное в настоящем документе, экспрессируется в клетках

субъекта, обработанных для получения активирующего соединения. Если активирующее соединение включает более одной полипептидной цепи, разные полипептидные цепи могут кодироваться одной и той же или разными молекулами РНК.

В одном из воплощений всех аспектов изобретения, РНК, кодирующая соединение-ярлык, описанное в настоящем документе, экспрессируется в клетках субъекта, получающего соединение-ярлык. Если соединение-ярлык включает более одной полипептидной цепи, разные полипептидные цепи могут кодироваться одной и той же или разными молекулами РНК.

Описанные в настоящем документе нуклеиновые кислоты могут представлять собой рекомбинантные и/или выделенные молекулы.

В настоящем описании термин «РНК» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая включает рибонуклеотидные остатки. В предпочтительных воплощениях РНК включает все или большинство рибонуклеотидных остатков. Как он используется в настоящем документе, термин «рибонуклеотид» относится к нуклеотиду с гидроксильной группой в 2'-положении β -D-рибофуранозильной группы. РНК включает, помимо прочего, двухцепочечную РНК, одноцепочечную РНК, изолированную РНК, такую как частично очищенная РНК, по существу чистую РНК, синтетическую РНК, РНК, полученную рекомбинантным путем, а также модифицированную РНК, которая отличается от встречающейся в природе РНК добавлением, делецией, заменой и/или изменением одного или нескольких нуклеотидов. Такие изменения могут относиться к добавлению ненуклеотидного материала к внутренним нуклеотидам РНК или к концу(концам) РНК. В настоящем документе также предполагается, что нуклеотиды в РНК могут быть нестандартными нуклеотидами, такими как химически синтезированные нуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды. В настоящем описании эти измененные РНК считаются аналогами встречающихся в природе РНК.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения РНК представляет собой информационную РНК (мРНК), которая относится к транскрипту РНК, кодирующему пептид или белок. По нормам, установленным в данной области техники, мРНК обычно включает 5'-нетранслируемую область (5'-UTR), область, кодирующую пептид, и 3'-нетранслируемую область (3'-UTR). В некоторых воплощениях РНК получают путем транскрипции *in vitro* или химического синтеза. В одном из воплощений мРНК производится путем транскрипции *in vitro* с применением матрицы ДНК, где ДНК относится к нуклеиновой кислоте, включающей дезоксирибонуклеотиды.

В одном из воплощений РНК представляет собой транскрибируемую *in vitro* РНК (IVT-РНК) и может быть получена путем транскрипции *in vitro* соответствующей матрицы

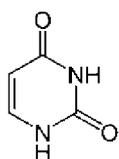
ДНК. Промотором для контроля транскрипции может быть любой промотор любой РНК-полимеразы. ДНК-матрица для транскрипции *in vitro* может быть получена путем клонирования нуклеиновой кислоты, в частности, кДНК, и введения ее в подходящий вектор для транскрипции *in vitro*. кДНК может быть получена путем обратной транскрипции РНК.

В некоторых воплощениях настоящего раскрытия, РНК представляет собой «репликонную РНК» или просто «репликон», в частности, «самореплицирующуюся РНК» или «самоамплифицирующуюся РНК». В одном особенно предпочтительном воплощении репликон или самореплицирующуюся РНК получают из вирусной оцРНК или включает элементы, полученные из вирусной оцРНК, в частности, вирусной оцРНК с положительной цепью, такого как оцРНК альфавируса. Альфавирусы представляют собой типичных представителей РНК-вирусов с положительной цепью. Альфавирусы реплицируются в цитоплазме инфицированных клеток (обзор жизненного цикла альфавирусов смотри в работе José et al., *Future Microbiol.*, 2009, vol. 4, pp. 837-856). Общая длина генома многих альфавирусов обычно колеблется от 11 000 до 12 000 нуклеотидов, а геномная РНК обычно имеет 5'-кэп и 3'-поли(А)-хвост. Геном альфавирусов кодирует неструктурные белки (участвующие в транскрипции, модификации и репликации вирусной РНК, а также в модификации белков) и структурные белки (образующие вирусную частицу). В геноме обычно имеются две открытые рамки считывания (ORF). Четыре неструктурных белка (nsP1-nsP4) обычно кодируются вместе первой ORF, начинающейся около 5'-конца генома, тогда как структурные белки альфавируса кодируются вместе второй ORF, которая находится ниже первой ORF и простирается вблизи 3'-конца генома. Обычно первая ORF больше второй ORF, причем соотношение составляет примерно 2:1. В клетках, инфицированных альфавирусом, с геномной РНК транслируется только последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая неструктурные белки, тогда как генетическая информация, кодирующая структурные белки, транслируется с субгеномного транскрипта, который представляет собой молекулу РНК, напоминающую эукариотическую информационную РНК ((мРНК); Gould et al., 2010, *Antiviral Res.*, vol. 87 pp. 111-124). После заражения, то есть на ранних стадиях жизненного цикла вируса, (+)-цепочечная геномная РНК непосредственно действует как информационная РНК для трансляции открытой рамки считывания, кодирующей неструктурный полипротеин (nsP1234). Векторы, полученные из альфавирусов, были предложены для доставки чужеродной генетической информации в клетки-мишени или организмы-мишени. В простых подходах открытая рамка считывания, кодирующая структурные белки альфавирусов, заменяется открытой рамкой

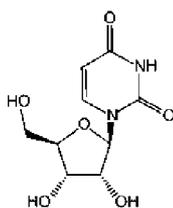
считывания, кодирующей интересующий белок. Системы транскрипции на основе альфавирусов основаны на элементах нуклеотидной последовательности альфавируса на двух отдельных молекулах нуклеиновой кислоты: одна молекула нуклеиновой кислоты кодирует вирусную репликазу, а другая молекула нуклеиновой кислоты способна реплицироваться указанной репликазой в транс-положении (отсюда и название транскрипционная система). Транс-репликация требует присутствия обеих этих молекул нуклеиновой кислоты в данной клетке-хозяине. Молекула нуклеиновой кислоты, способная реплицироваться с помощью транс-репликазы, должна включать определенные элементы альфавирусной последовательности, чтобы обеспечить распознавание и синтез РНК альфавирусной репликазой.

В одном из воплощений, РНК, описанная в настоящем документе, может включать модифицированные нуклеозиды. В некоторых воплощениях РНК включает модифицированный нуклеозид вместо, по меньшей мере одного (например, каждого) уридина.

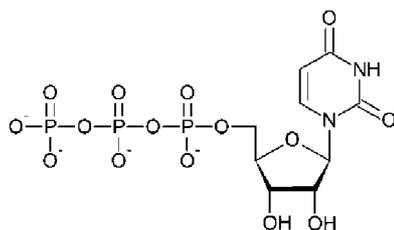
Термин «урацил», как он используется в настоящем документе, описывает одно из нуклеиновых оснований, которые могут встречаться в нуклеиновой кислоте РНК. Урацил имеет следующую структуру:



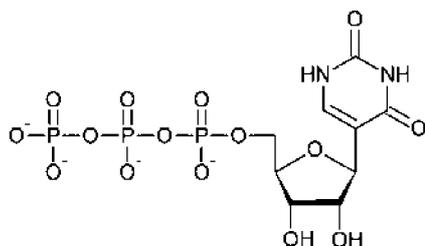
Термин «уридин», как он используется в настоящем документе, описывает один из нуклеозидов, которые могут встречаться в РНК. Уридин имеет следующую структуру:



УТР (уридин-5'-трифосфат) имеет следующую структуру:

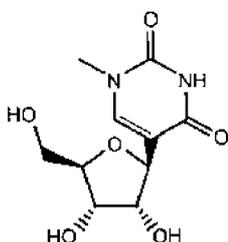


Псевдо-УТР (псевдоуридин-5'-трифосфат) имеет следующую структуру:

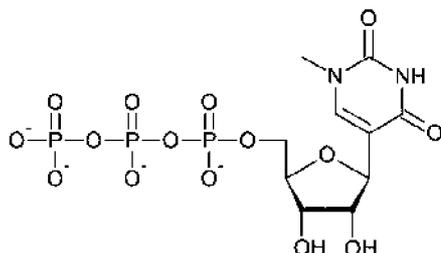


«Псевдоуридин» представляет собой один из примеров модифицированного нуклеозида, который представляет собой изомер уридина, где урацил присоединен к пентозному кольцу через углерод-углеродную связь вместо гликозидной связи азот-углерод.

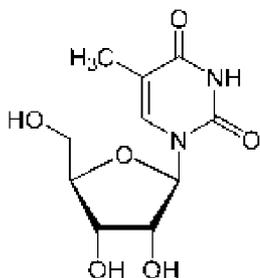
Другим примером модифицированного нуклеозида представляет собой N1-метилпсевдоуридин (m1Ψ), который имеет структуру:



N1-метил-псевдо-UTP имеет следующую структуру:



Другим примером модифицированного нуклеозида представляет собой 5-метилуридин (m5U), который имеет структуру:



В некоторых воплощениях, один или несколько уридинов в описанной в настоящем документе РНК заменены модифицированным нуклеозидом. В некоторых воплощениях модифицированный нуклеозид представляет собой модифицированный уридин.

В некоторых воплощениях, РНК включает модифицированный нуклеозид вместо, по меньшей мере одного уридина. В некоторых воплощениях, РНК включает модифицированный нуклеозид вместо каждого уридина.

В некоторых воплощениях, модифицированный нуклеозид независимо выбран из псевдоуридина (ψ), N1-метилпсевдоуридина ($m^1\psi$) и 5-метилуридина (m^5U). В некоторых воплощениях модифицированный нуклеозид включает псевдоурин (ψ). В некоторых воплощениях модифицированный нуклеозид включает N1-метил-псевдоурин ($m^1\psi$). В некоторых воплощениях модифицированный нуклеозид включает 5-метилуридин (m^5U). В некоторых воплощениях РНК могут включать более одного типа модифицированных нуклеозидов, и модифицированные нуклеозиды независимо выбирают из псевдоуридина (ψ), N1-метилпсевдоуридина ($m^1\psi$) и 5-метилуридина (m^5U). В некоторых воплощениях модифицированные нуклеозиды включают псевдоурин (ψ) и N1-метилпсевдоурин ($m^1\psi$). В некоторых воплощениях модифицированные нуклеозиды включают псевдоурин (ψ) и 5-метилуридин (m^5U). В некоторых воплощениях модифицированные нуклеозиды включают N1-метилпсевдоурин ($m^1\psi$) и 5-метилуридин (m^5U). В некоторых воплощениях модифицированные нуклеозиды включают псевдоурин (ψ), N1-метилпсевдоурин ($m^1\psi$) и 5-метилуридин (m^5U).

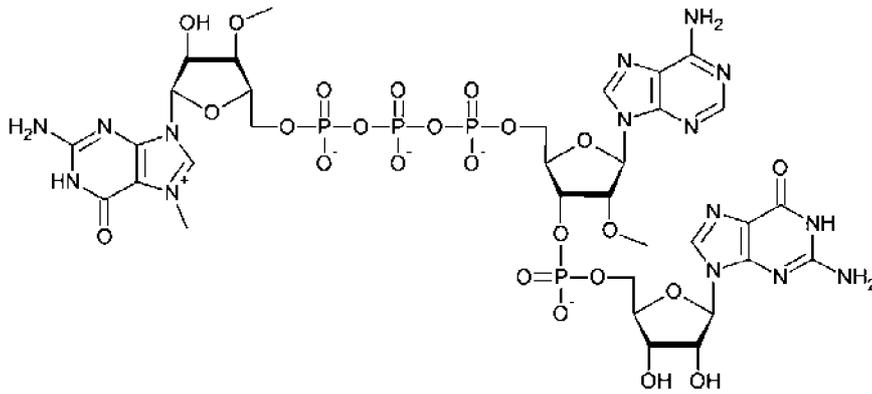
В некоторых воплощениях, модифицированный нуклеозид, заменяющий один или несколько, например, весь уридин в РНК, может представлять собой любой один или несколько из 3-метилуридина (m^3U), 5-метоксиуридина (mo^5U), 5-азауридина, 6-азауридин, 2-тио-5-азауридин, 2-тиоуридин (s^2U), 4-тиоуридин (s^4U), 4-тио-псевдуридин, 2-тио-псевдуридин, 5-гидроксиуридин (ho^5U), 5-аминоаллилуридин, 5-галогенуридин (например, 5-йодуридин или 5-бромурин), уридин-5-оксиуксусная кислота (cmo^5U), метиловый эфир уридина-5-оксиуксусной кислоты ($mcmo^5U$), 5-карбоксиметилуридин (cm^5U), 1-карбоксиметилпсевдуридин, 5-карбоксихидроксиметилуридин (chm^5U), метиловый эфир 5-карбоксихидроксиметилуридина ($mchm^5U$), 5-метоксикарбонилметилуридин (mcm^5U), 5-метоксикарбонилметил-2-тио-уридин (mcm^5s^2U), 5-аминометил-2-тиоуридин (nm^5s^2U), 5-метиламинометилуридин (mnm^5U), 1-этилпсевдуридин, 5-метиламинометил-2-тиоуридин (mnm^5s^2U), 5-метиламинометил-2-селеноуридин (mnm^5se^2U), 5-карбамоилметилуридин (ncm^5U), 5-карбоксиметиламинометилуридин ($cmnm^5U$), 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин ($cmnm^5s^2U$), 5-пропинилуридин, 1-пропинил-псевдуридин, 5-тауринометилуридин (τm^5U), 1-тауринометил-псевдуридин, 5-тауринометил-2-тиоуридин (τm^5s^2U), 1-тауринометил-4-тио-псевдуридин), 5-метил-2-тио-уридин (m^5s^2U), 1-метил-4-тио-псевдуридин ($m^1s^4\psi$), 4-тио-1-метил-псевдуридин, 3-метил-псевдуридин ($m^3\psi$), 2-тио-1-метил-псевдуридин, 1-метил-1-деаза-псевдуридин, 2-тио-1-метил-1-деаза-псевдуридин, дигидроуридин (D), дигидропсевдуридин, 5,6-дигидроуридин, 5-метилдигидроуридин (m^5D), 2-тио-дигидроуридин, 2-тио-дигидропсевдуридин, 2-метоксиуридин, 2-метокси-4-тиоуридин, 4-

метокси-псевдуридин, 4-метокси-2-тио-псевдуридин, N1-метил-псевдуридин, 3-(3-амино-3-карбоксивпропил)уридин ($аср^3U$), 1-метил-3-(3-амино-3-карбоксивпропил)псевдуридин ($аср^3 \psi$), 5-(изопентениламинометил)уридин (inm^5U), 5-(изопентениламинометил)-2-тиоуридин (inm^5s^2U), α -тиоуридин, 2'-О-метилуридин (Um), 5,2'-О-диметилуридин (m^5Um), 2'-О-метилпсевдуридин (ψm), 2-тио-2'-О-метилуридин (s^2Um), 5-метоксикарбонилметил-2'-О-метилуридин (mcm^5Um), 5-карбамоилметил-2'-О-метилуридин (ncm^5Um), 5-карбоксиметиламинометил-2'-О-метилуридин ($cmnm^5Um$), 3,2'-О-диметилуридин (m^3Um), 5-(изопентениламинометил)-2'-О-метилуридин (inm^5Um), 1-тиоуридин, дезокситимидин, 2'-F-ара-уридин, 2'-F-уридин, 2'-ОН-ара-уридин, 5-(2-карбометоксивинил)уридин, 5-[3-(1-E-пропениламино)уридин или любой другой модифицированный уридин, известный в данной области техники.

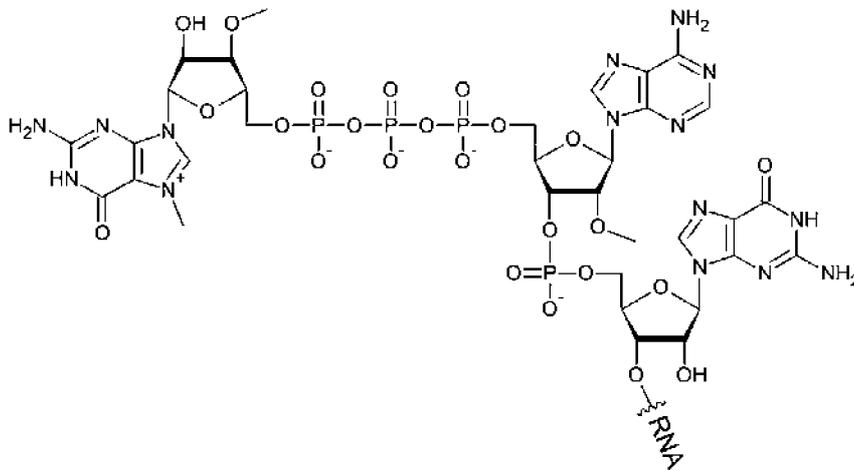
В одном из воплощений РНК включает другие модифицированные нуклеозиды или включает дополнительные модифицированные нуклеозиды, например, модифицированный цитидин. Например, в одном из воплощений в РНК 5-метилцитидин частично или полностью, предпочтительно полностью, заменен цитидином. В одном из воплощений РНК включает 5-метилцитидин и один или несколько веществ, выбранных из псевдоуридина (ψ), N1-метилпсевдоуридина ($m^1\psi$) и 5-метилуридина (m^5U). В одном из воплощений РНК включает 5-метилцитидин и N1-метил-псевдоуридин ($m^1\psi$). В некоторых воплощениях РНК включает 5-метилцитидин вместо каждого цитидина и N1-метилпсевдуридин ($m^1\psi$) вместо каждого уридина.

В некоторых воплощениях, РНК согласно настоящему изобретению включает 5'-кэп. В одном из воплощений РНК в настоящем раскрытии не имеет непокрытых 5'-трифосфатов. В одном из воплощений РНК может быть модифицирована аналогом с 5'-кэпом. Термин «5'-кэп» относится к структуре, расположенной на 5'-конце молекулы мРНК, и обычно состоит из гуанозинового нуклеотида, соединенного с мРНК через 5'-5'-трифосфатную связь. В одном из воплощений этот гуанозин метилирован в 7-м положении. Предоставление РНК с 5'-кэпом или аналогом 5'-кэпа может быть достигнуто путем транскрипции *in vitro*, при которой 5'-кэп котранскрипционно экспрессируется в цепь РНК, или может быть присоединен к РНК посттранскрипционно с помощью кэпирующих ферментов.

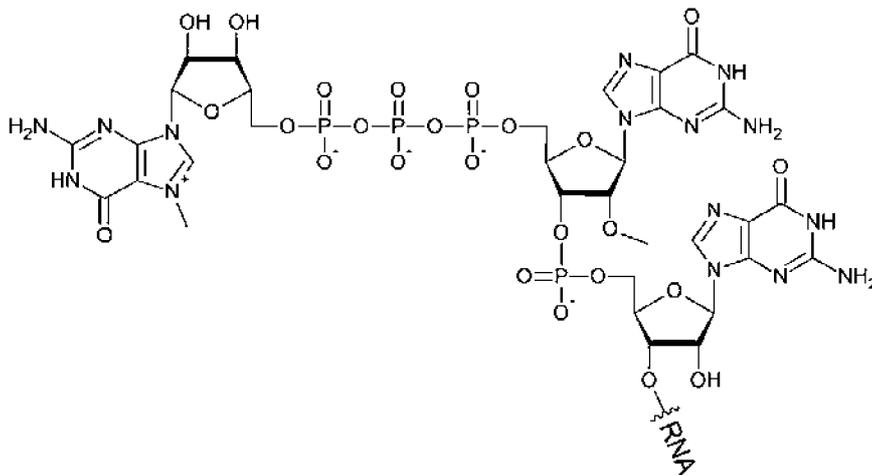
В некоторых воплощениях, строительный блок РНК представляет собой $m_2^{7,3'}\text{-}^0\text{Gppp}(m_1^{2'-O})\text{ApG}$ (также иногда называемый $m_2^{7,3'}\text{-}^0\text{G}(5')\text{ppp}(5')m_1^{2'-O}\text{ApG}$), который имеет следующую структуру:



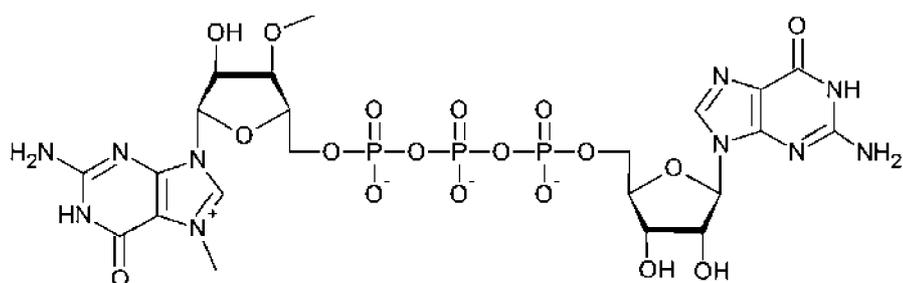
Ниже приведен пример РНК Cap1, которая включает РНК и $m_2^{7,3}G(5')ppp(5')m^{2'-}$
 $^{\circ}ApG$:



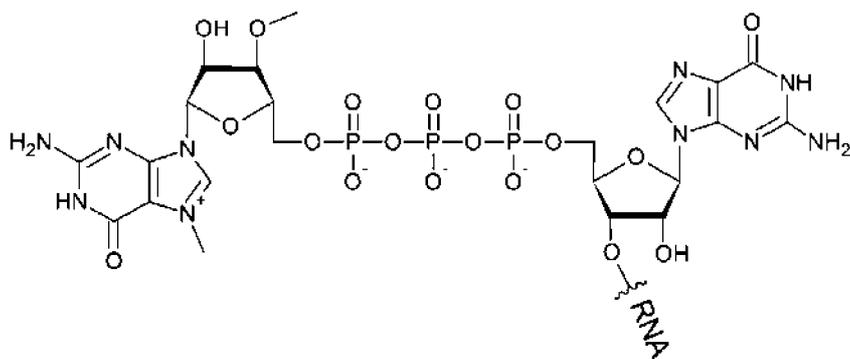
Ниже приведен еще один пример РНК Cap1 (без аналога кэпа):



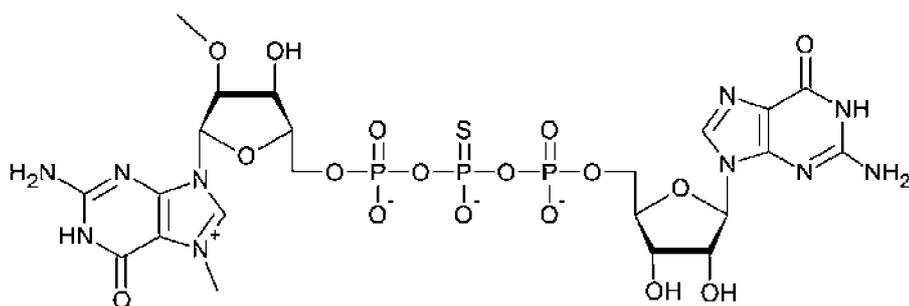
В некоторых воплощениях, РНК модифицируется с помощью структур «Cap0», применяя, в одном из воплощений, аналог антиреверсивного кэпа (ARCA Cap ($m_2^{7,3}G(5')ppp(5')G$)), имеющий структуру:



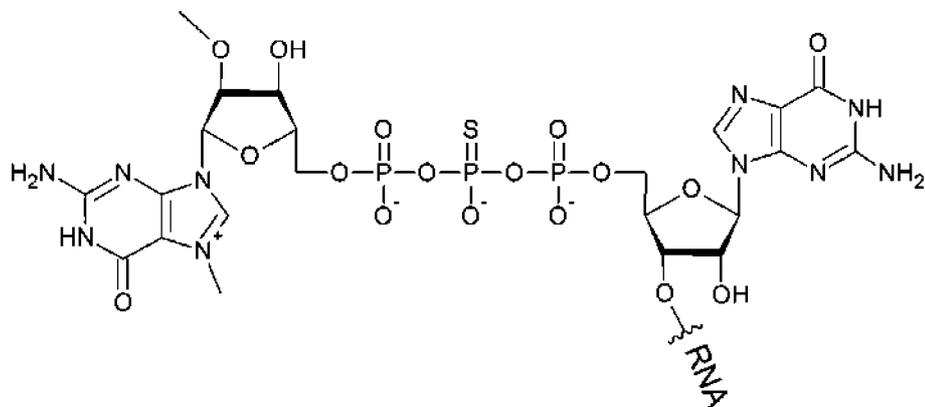
Ниже приведен пример РНК Cap0, включающей РНК и $m_2^{7,3'}G(5')ppp(5')G$:



В некоторых воплощениях, структуры «Cap0» генерируют с применением аналога кэпа Beta-S-ARCA ($m_2^{7,2'}G(5')ppSp(5')G$), имеющего структуру:



Ниже приведен пример РНК Cap0, включающей Beta-S-ARCA ($m_2^{7,2'}G(5')ppSp(5')G$) и RNA:



Диастереомер «D1» бета-S-ARCA или «бета-S-ARCA(D1)» представляет собой диастереомер бета-S-ARCA, который элюируется первым на колонке ВЭЖХ по сравнению с диастереомером D2 бета-S-ARCA (бета-S-ARCA(D2)) и, таким образом,

имеет более короткое время удерживания (см. WO 2011/015347, включенную в настоящий документ посредством отсылки).

Особенно предпочтительный кэп представляет собой beta-S-ARCA(D1) ($m_2^{7,2'-O}GppSpG$) or $m_2^{7,3'-O}Gppp(m_1^{2'-O})ApG$.

В некоторых воплощениях, РНК согласно настоящему изобретению включает 5'-UTR и/или 3'-UTR. Термин «нетранслируемая область» или «UTR» относится к области молекулы ДНК, которая транскрибируется, но не транслируется в аминокислотную последовательность, или к соответствующей области молекулы РНК, такой как молекула мРНК. Нетранслируемая область (UTR) может находиться на 5'-конце (вверху) от открытой рамки считывания (5'-UTR) и/или 3' (ниже по ходу транскрипции) от открытой рамки считывания (3'-UTR). 5'-UTR, если она присутствует, расположена на 5'-конце, выше стартового кодона области, кодирующей белок. 5'-UTR находится ниже 5'-кэпа (если он присутствует), например, непосредственно примыкает к 5'-кэпу. 3'-UTR, если она присутствует, расположена на 3'-конце, ниже терминирующего кодона области, кодирующей белок, но термин «3'-UTR» предпочтительно не включает последовательность поли(А). Таким образом, 3'-UTR находится выше последовательности поли(А) (если она присутствует), например, непосредственно соседствует с последовательностью поли(А).

В некоторых воплощениях, РНК включает 5'-UTR, включающую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% или 80% идентичности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1.

В некоторых воплощениях, РНК включает 3'-UTR, включающую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2 или 3, или нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% или 80% идентичности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2 или 3.

Особенно предпочтительная 5'-UTR включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1. Особенно предпочтительная 3'-UTR включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2 или 3.

В некоторых воплощениях, РНК согласно настоящему изобретению включает 3'-поли(А) последовательность.

Термин «последовательность поли(А)» или «хвост поли-А», как используется в настоящем документе, относится к непрерывной или прерывистой последовательности аденилатных остатков, которая обычно расположена на 3'-конце молекулы РНК. Последовательности поли(А) известны специалистам в данной области техники и могут

следовать за 3'-UTR в описанных в настоящем документе РНК. Непрерывная последовательность поли(А) характеризуется последовательными аденилатными остатками. В природе типична непрерывная последовательность поли(А). РНК, раскрытые в настоящем документе, могут иметь последовательность поли(А), присоединенную к свободному 3'-концу РНК с помощью независимой от матрицы РНК-полимеразы после транскрипции, или последовательность поли(А), кодируемую ДНК и транскрибируемую зависимой от матрицы РНК-полимеразой.

Было продемонстрировано, что последовательность поли(А) длиной примерно 120 А-нуклеотидов оказывает благотворное влияние на уровни РНК в трансфицированных эукариотических клетках, а также на уровни белка, который транслируется из открытой рамки считывания, которая присутствует выше (5') последовательности поли(А) (*Holtkamp et al.*, 2006, *Blood*, vol. 108, pp. 4009-4017).

Последовательность поли(А) может иметь любую длину. В некоторых воплощениях последовательность поли(А) включает, по существу состоит из или состоит из, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 80 или, по меньшей мере от 100 и вплоть до 500, вплоть до 400, вплоть до 300, вплоть до 200 или вплоть до 150 А-нуклеотидов и, в частности, примерно 120 А-нуклеотидов. В этом контексте термин «по существу состоит из» означает, что большинство нуклеотидов в последовательности поли(А), обычно, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере, 99% по числу нуклеотидов в последовательности поли(А) представляют собой нуклеотиды А, но допускается, чтобы оставшиеся нуклеотиды представляли собой нуклеотиды, отличные от нуклеотидов А, такие как U-нуклеотиды (уридилат), G-нуклеотиды (гуанилат) или C-нуклеотиды (цитидилат). В этом контексте термин «состоит из» означает, что все нуклеотиды в последовательности поли(А), т.е. 100% по количеству нуклеотидов в последовательности поли(А), представляют собой А-нуклеотиды. Термин «нуклеотид А» или «А» относится к аденилату.

В некоторых воплощениях, последовательность поли(А) присоединяется во время транскрипции РНК, например, во время получения транскрибируемой *in vitro* РНК на основе матрицы ДНК, включающей повторяющиеся нуклеотиды dT (дезокситимидилат) в цепи, комплементарной кодирующей цепи. Последовательность ДНК, кодирующая последовательность поли(А) (кодирующую цепь), называется кассетой поли(А).

В некоторых воплощениях, кассета поли(А), присутствующая в кодирующей цепи ДНК, по существу состоит из нуклеотидов dA, но прерывается случайной

последовательностью из четырех нуклеотидов (dA, dC, dG и dT). Такая случайная последовательность может иметь длину от 5 до 50, от 10 до 30 или от 10 до 20 нуклеотидов. Такая кассета раскрыта в WO 2016/005324 A1, включенной в настоящий документ посредством отсылки. Любая кассета из поли(A), раскрытая в WO 2016/005324 A1, может быть применена в настоящем изобретении. Кассета поли(A), которая по существу состоит из нуклеотидов dA, но прерывается случайной последовательностью, имеющей равное распределение четырех нуклеотидов (dA, dC, dG, dT) и длиной, например, от 5 до 50 нуклеотидов, показывает: на уровне ДНК подразумевается постоянное размножение плазмидной ДНК в *E. coli*, которое все еще связано на уровне РНК с полезными свойствами в отношении поддержания стабильности РНК и эффективности трансляции. Следовательно, в некоторых воплощениях последовательность поли(A), содержащаяся в описанной в настоящем документе молекуле РНК, по существу состоит из нуклеотидов A, но прерывается случайной последовательностью из четырех нуклеотидов (A, C, G, U). Такая случайная последовательность может иметь длину от 5 до 50, от 10 до 30 или от 10 до 20 нуклеотидов.

В некоторых воплощениях, никакие нуклеотиды, кроме нуклеотидов A, не фланкируют последовательность поли(A) на ее 3'-конце, т.е. последовательность поли(A) не маскируется и не сопровождается на ее 3'-конце нуклеотидом, отличным от A.

В некоторых воплощениях последовательность поли(A) может включать, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 80 или, по меньшей мере 100 и вплоть до 500, вплоть до 400, вплоть до 300, вплоть до 200 или вплоть до 150 нуклеотидов. В некоторых воплощениях поли(A)-последовательность может по существу состоять из, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 80 или, по меньшей мере от 100 и вплоть до 500, вплоть до 400, вплоть до 300, вплоть до 200 или вплоть до 150 нуклеотидов. В некоторых воплощениях поли(A)-последовательность может состоять из, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 80 или по меньшей мере, 100 и вплоть до 500, вплоть до 400, вплоть до 300, вплоть до 200 или вплоть до 150 нуклеотидов. В некоторых воплощениях последовательность поли(A) включает, по меньшей мере 100 нуклеотидов. В некоторых воплощениях последовательность поли(A) включает примерно 150 нуклеотидов. В некоторых воплощениях последовательность поли(A) включает примерно 120 нуклеотидов.

В некоторых воплощениях, РНК включает последовательность поли(A), включающую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4, или нуклеотидную

последовательность, имеющую, по меньшей мере 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% или 80% идентичности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 4.

Особенно предпочтительная последовательность поли(А) включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4.

Согласно изобретению активирующее соединение предпочтительно вводят в виде одноцепочечной мРНК с 5'-концом, которая транслируется в соответствующий белок при попадании в клетки субъекта, которому вводят РНК. Предпочтительно РНК включает структурные элементы, оптимизированные для максимальной эффективности РНК в отношении стабильности и эффективности трансляции (5'-кэп, 5'-UTR, 3'-UTR, поли(А)-последовательность).

Согласно описанию соединение-ярлык предпочтительно вводят в виде одноцепочечной мРНК с 5'-концом, которая транслируется в соответствующий белок при попадании в клетки субъекта, которому вводят РНК. Предпочтительно РНК включает структурные элементы, оптимизированные для максимальной эффективности РНК в отношении стабильности и эффективности трансляции (5'-кэп, 5'-UTR, 3'-UTR, поли(А)-последовательность).

В одном из воплощений, beta-S-ARCA(D1) применяют в качестве специфической кэпирующей структуры на 5'-конце РНК. В одном из воплощений, $m_2^{7,3'-O}Gppp(m_1^{2'-O})ApG$ применяют в качестве специфической кэпирующей структуры на 5'-конце РНК. В одном из воплощений, последовательность 5'-UTR получают из мРНК альфа-глобина человека, и она не обязательно имеет оптимизированную «последовательность Козак» для повышения эффективности трансляции. В одном из воплощений комбинация двух элементов последовательности (элемент FI), полученных из мРНК «аминоконцевого энхансера расщепления» (AES) (называемой F) и митохондриально кодируемой 12S рибосомальной РНК (называемой I), помещают между кодирующей последовательностью и последовательность поли(А) для обеспечения более высоких максимальных уровней белка и длительного сохранения мРНК. Они были идентифицированы с помощью процесса отбора *ex vivo* последовательностей, которые придают стабильность РНК и увеличивают общую экспрессию белка (смотри WO 2017/060314, включенную в настоящий документ посредством ссылки). В одном из воплощений две повторяющиеся 3'-UTR, полученные из мРНК бета-глобина человека, помещаются между кодирующей последовательностью и последовательностью поли(А), чтобы гарантировать более высокие максимальные уровни белка и длительное сохранение мРНК. В одном из воплощений применяют поли(А)-последовательность длиной 110 нуклеотидов, состоящую из участка из 30 остатков аденозина, за которым следует линкерная

последовательность из 10 нуклеотидов и еще 70 остатков аденозина. Эта последовательность поли(А) была разработана для повышения стабильности РНК и эффективности трансляции.

В одном из воплощений всех аспектов изобретения, РНК, кодирующая активирующее соединение, экспрессируется в клетках субъекта, обработанных для получения активирующего соединения. В одном из воплощений всех аспектов изобретения РНК временно экспрессируется в клетках субъекта. В одном из воплощений всех аспектов изобретения РНК представляет собой РНК, транскрибируемую *in vitro*. В одном из воплощений всех аспектов изобретения экспрессия активирующего соединения происходит на поверхности клетки, т.е. активирующее соединение остается связанным с клеткой.

В одном из воплощений всех аспектов изобретения, РНК, кодирующая соединение-ярлык, экспрессируется в клетках субъекта, получающего соединение-ярлык. В одном из воплощений всех аспектов изобретения РНК временно экспрессируется в клетках субъекта. В одном из воплощений всех аспектов изобретения РНК представляет собой РНК, транскрибируемую *in vitro*. В одном из воплощений всех аспектов изобретения экспрессия соединения-ярлыка происходит во внеклеточное пространство, т.е. соединение-ярлык секретируется.

В контексте настоящего открытия термин «транскрипция» относится к процессу, при котором генетический код в последовательности ДНК транскрибируется в РНК. Впоследствии РНК можно транслировать в пептид или белок.

Согласно настоящему изобретению термин «транскрипция» включает «транскрипцию *in vitro*», причем термин «транскрипция *in vitro*» относится к процессу, в котором РНК, в частности, мРНК, синтезируется *in vitro* в бесклеточной системе, предпочтительно с применением соответствующих клеточных экстрактов. Предпочтительно, чтобы для генерации транскриптов применяли клонирующие векторы. Эти векторы клонирования обычно обозначаются как векторы транскрипции и согласно настоящему изобретению охватываются термином «вектор». Согласно настоящему изобретению РНК, применяемая в настоящем изобретении, предпочтительно представляет собой транскрибируемую *in vitro* РНК (IVT-РНК) и может быть получена путем транскрипции *in vitro* соответствующей ДНК-матрицы. Промотором для контроля транскрипции может быть любой промотор любой РНК-полимеразы. Конкретными примерами РНК-полимераз представляют собой РНК-полимеразы Т7, Т3 и SP6. Предпочтительно, транскрипция *in vitro* согласно изобретению контролируется промотором Т7 или SP6. ДНК-матрица для транскрипции *in vitro* может быть получена

путем клонирования нуклеиновой кислоты, в частности, кДНК, и введения ее в подходящий вектор для транскрипции *in vitro*. кДНК может быть получена путем обратной транскрипции РНК.

Что касается РНК, то термин «экспрессия» или «трансляция» относится к процессу в рибосомах клетки, посредством которого цепь мРНК направляет сборку последовательности аминокислот для образования пептида или белка.

В одном из воплощений, после введения описанной в настоящем документе РНК, например, в виде липидных частиц РНК, по меньшей мере часть РНК доставляется в клетку для экспрессии. В одном из воплощений, по меньшей мере часть РНК доставляется в цитозоль клетки-мишени. В одном из воплощений РНК транслируется клеткой-мишенью для производства пептида или белка, который она кодирует.

«Кодирование» относится к внутреннему свойству конкретных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить матрицами для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих либо определенную последовательность нуклеотидов, либо определенную последовательность нуклеотидов (т.е. рРНК, тРНК и мРНК) или определенную последовательность аминокислот и вытекающие из этого биологические свойства. Таким образом, ген кодирует белок, если транскрипция и трансляция мРНК, соответствующей этому гену, приводит к образованию белка в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно представлена в списках последовательностей, так и некодирующая цепь, применяемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, можно назвать кодирующей белок или другой продукт этого гена или кДНК.

В одном из воплощений, активирующее соединение, кодирующее РНК, которое следует вводить согласно изобретению, не представляет собой иммуногенное соединение.

В одном из воплощений, РНК-кодирующее соединение-ярлык, которое следует вводить согласно изобретению, не представляет собой иммуногенное соединение.

Термин «неиммуногенная РНК», как он используется в настоящем документе, относится к РНК, которая не индуцирует ответ иммунной системы при введении, например, млекопитающему, или индуцирует более слабый ответ, чем тот, который был бы индуцирован той же РНК, которая отличается только тем, что она не подвергалась модификациям и обработкам, которые делают неиммуногенную РНК неиммуногенной, т.е. той, которая была бы индуцирована стандартной РНК (stdРНК). В одном предпочтительном варианте неиммуногенная РНК, которую в настоящем документе также

называют модифицированной РНК (модРНК), становится неиммуногенной путем включения в РНК модифицированных нуклеозидов, подавляющих РНК-опосредованную активацию рецепторов врожденного иммунитета в РНК и удаляющих двухцепочечную РНК (дцРНК).

Для придания неиммуногенной РНК неиммуногенности путем включения модифицированных нуклеозидов можно применять любой модифицированный нуклеозид, при условии, что он снижает или подавляет иммуногенность РНК. Модифицированные нуклеозиды, подавляющие РНК-опосредованную активацию рецепторов врожденного иммунитета, особенно предпочтительны. В одном из воплощений модифицированные нуклеозиды включают замену одного или нескольких уридинов нуклеозидом, включающим модифицированное азотистое основание. В одном из воплощений модифицированное азотистое основание представляет собой модифицированный урацил. В одном из воплощений нуклеозид, включающий модифицированное азотистое основание, выбирают из группы, состоящей из 3-метилуридина (m^3U), 5-метоксиуридина (mo^5U), 5-азауридина, 6-азауридина, 2-тио-5-азауридина, 2-тиоуридина (s^2U), 4-тиоуридина (s^4U), 4-тио-псевдуридина, 2-тио-псевдуридина, 5-гидроксиуридина (ho^5U), 5-аминоаллил-уридина, 5-галоидуридина (например, 5-йодуридина или 5-бромуридина), уридин-5-оксиуксусной кислоты (cmo^5U), метилового эфира уридина-5-оксиуксусной кислоты (cmo^5U), 5-карбоксиметилуридина (cm^5U), 1-карбоксиметилпсевдуридина, 5-карбоксигидроксиметилуридина (chm^5U), метилового эфира 5-карбоксигидроксиметилуридина ($mchm^5U$), 5-метоксикарбонилметилуридина (mcm^5U), 5-метоксикарбонилметил-2-тиоуридина (mcm^5s^2U), 5-аминометил-2-тиоуридина (nm^5s^2U), 5-метиламинометилуридина (mnm^5U), 1-этилпсевдуридина, 5-метиламинометил-2-тиоуридина (mnm^5s^2U), 5-метиламинометил-2-селено-уридина (mnm^5se^2U), 5-карбамоилметилуридина (ncm^5U), 5-карбоксиметиламинометилуридина ($cmnm^5U$), 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоуридина ($cmnm^5s^2U$), 5-пропинилуридина, 1-пропинилпсевдуридина, 5-тауринометилуридина (tm^5U), 1-тауринометилпсевдуридина, 5-тауринометил-2-тиоуридина (tm^5s^2U), 1-тауринометил-4-тио-псевдуридина, 5-метил-2-тиоуридина (m^5s^2U), 1-метил-4-тио-псевдуридина ($m^1s^4\psi$), 4-тио-1-метил-псевдуридина, 3-метил-псевдуридина ($m^3\psi$), 2-тио-1-метил-псевдуридина, 1-метил-1-деза-псевдоуридина, 2-тио-1-метил-1-деза-псевдоуридина, дигидроуридина (D), дигидропсевдуридина, 5,6-дигидроуридина, 5-метилдигидроуридина (m^5D), 2-тио-дигидроуридина, 2-тио-дигидропсевдуридина, 2-метоксиуридина, 2-метокси-4-тиоуридина, 4-метоксипсевдуридина, 4-метокси-2-тиопсевдуридина, N1-метилпсевдуридина, 3-(3-амино-3-карбоксипропил)уридина (acp^3U), 1-метил-3-(3-амино-3-карбоксипропил)псевдуридина

(аср³ψ), 5-(изопентениламинометил)уридина (inm⁵U), 5-(изопентениламинометил)-2-тиоуридина (inm⁵s²U), α-тиоуридина, 2'-О-метилуридина (Um), 5,2'-О-диметилуридина (m⁵Um), 2'-О-метилпсевдуридина (ψm), 2-тио-2'-О-метилуридина (s²Um), 5-метоксикарбонилметил-2'-О-метилуридина (mcm⁵Um), 5-карбамоилметил-2'-О-метилуридина (ncm⁵Um), 5-карбоксиметиламинометил-2'-О-метилуридина (cmnm⁵Um), 3,2'-О-диметилуридина (m³Um), 5-(изопентениламинометил)-2'-О-метилуридина (inm⁵Um), 1-тиоуридина, дезокситимидина, 2'-F-ара-уридина, 2'-F-уридина, 2'-ОН-ара-уридина, 5-(2-карбометоксивинил)уридина и 5-[3-(1-E-пропениламино)уридина. В одном особенно предпочтительном варианте нуклеозид, включающий модифицированное азотистое основание, представляет собой псевдоуридин (ψ), N1-метилпсевдуридин (m1ψ) или 5-метилуридин (m⁵U), в частности, N1-метилпсевдуридин.

В одном из воплощений, замена одного или нескольких уридинов нуклеозидом, включающим модифицированное азотистое основание, включает замену, по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% уридинов.

Во время синтеза мРНК путем транскрипции *in vitro* (IVT) с применением РНК-полимеразы T7 образуются значительные количества aberrantных продуктов, в том числе двухцепочечной РНК (дцРНК), из-за нетрадиционной активности фермента. дсРНК индуцирует воспалительные цитокины и активирует эффекторные ферменты, что приводит к ингибированию синтеза белка. дцРНК можно удалить из РНК, такой как IVT РНК, например, с помощью ионно-парной обращенно-фазовой ВЭЖХ с применением непористой или пористой матрицы полистирол-дивинилбензола С-18 (PS-DVB). В качестве альтернативы можно применять ферментативный способ с применением РНКазы III *E. coli*, которая специфически гидролизует дцРНК, но не оцРНК, тем самым удаляя примеси дцРНК из препаратов РНК IVT. Кроме того, дцРНК можно отделить от оцРНК с помощью целлюлозного материала. В одном из воплощений препарат РНК контактирует с целлюлозным материалом, и оцРНК отделяется от целлюлозного материала в условиях, которые позволяют связывать дцРНК с целлюлозным материалом и не позволяют связывать оцРНК с целлюлозным материалом.

В контексте настоящего документа термин «удалять» или «удаление» относится к характеристике популяции первых веществ, таких как неиммуногенная РНК, отделенной от соседней популяции вторых веществ, таких как дцРНК, где популяция первых веществ не обязательно лишена второго вещества, а популяция вторых веществ не обязательно

лишена первого вещества. Однако совокупность первых веществ, характеризующаяся удалением совокупности вторых веществ, имеет заметно более низкое содержание вторых веществ по сравнению с неразделенной смесью первого и второго веществ.

В одном из воплощений, удаление дсРНК из неиммуногенной РНК включает удаление дсРНК, такое, что менее 10%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2%, менее 1%, менее 0,5%, менее 0,3% или менее 0,1% РНК в композиции неиммуногенной РНК представляет собой дцРНК. В одном из воплощений неиммуногенная РНК не включает или практически не включает дсРНК. В некоторых воплощениях композиция неиммуногенной РНК включает очищенный препарат одноцепочечной модифицированной нуклеозидами РНК. Например, в некоторых воплощениях очищенный препарат одноцепочечной нуклеозидмодифицированной РНК по существу не включает двухцепочечной РНК (дцРНК). В некоторых воплощениях очищенный препарат составляет, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или, по меньшей мере 99,9% одноцепочечной нуклеозидмодифицированной РНК по отношению ко всем другим молекулам нуклеиновой кислоты (ДНК, дцРНК и т.д.).

В одном из воплощений, неиммуногенная РНК транслируется в клетке более эффективно, чем стандартная РНК с той же последовательностью. В одном из воплощений трансляция усиливается в 2 раза по сравнению с его неизменным аналогом. В одном из воплощений трансляция усиливается в 3 раза. В одном из воплощений трансляция усиливается в 4 раза. В одном из воплощений трансляция усиливается в 5 раз. В одном из воплощений трансляция усиливается в 6 раз. В одном из воплощений трансляция усиливается в 7 раз. В одном из воплощений трансляция усиливается в 8 раз. В одном из воплощений трансляция усиливается в 9 раз. В одном из воплощений трансляция усиливается в 10 раз. В одном из воплощений трансляция усиливается в 15 раз. В одном из воплощений трансляция усиливается в 20 раз. В одном из воплощений трансляция усиливается в 50 раз. В одном из воплощений трансляция усиливается в 100 раз. В одном из воплощений трансляция усиливается в 200 раз. В одном из воплощений трансляция усиливается в 500 раз. В одном из воплощений трансляция усиливается в 1000 раз. В одном из воплощений трансляция увеличивается в 2000 раз. В одном из воплощений коэффициент увеличивается в 10-1000 раз. В одном из воплощений коэффициент увеличивается в 10-100 раз. В одном из воплощений коэффициент увеличивается в 10-200 раз. В одном из воплощений коэффициент увеличивается в 10-300 раз. В одном из воплощений коэффициент увеличивается в 10-500 раз. В одном из

воплощений коэффициент увеличивается в 20-1000 раз. В одном из воплощений коэффициент увеличивается в 30-1000 раз. В одном из воплощений коэффициент увеличивается в 50-1000 раз. В одном из воплощений коэффициент увеличивается в 100-1000 раз. В одном из воплощений коэффициент увеличивается в 200-1000 раз. В одном из воплощений трансляция усиливается на любое другое значительное количество или диапазон количеств.

В одном из воплощений, неиммуногенная РНК проявляет значительно меньшую врожденную иммуногенность, чем стандартная РНК с той же последовательностью. В одном из воплощений неиммуногенная РНК проявляет врожденный иммунный ответ, который в 2 раза меньше, чем ее немодифицированный аналог. В одном из воплощений врожденная иммуногенность снижается в 3 раза. В одном из воплощений врожденная иммуногенность снижается в 4 раза. В одном из воплощений врожденная иммуногенность снижается в 5 раз. В одном из воплощений врожденная иммуногенность снижается в 6 раз. В одном из воплощений врожденная иммуногенность снижается в 7 раз. В одном из воплощений врожденная иммуногенность снижается в 8 раз. В одном из воплощений врожденная иммуногенность снижается в 9 раз. В одном из воплощений врожденная иммуногенность снижается в 10 раз. В одном из воплощений врожденная иммуногенность снижается в 15 раз. В одном из воплощений врожденная иммуногенность снижается в 20 раз. В одном из воплощений врожденная иммуногенность снижается в 50 раз. В одном из воплощений врожденная иммуногенность снижается в 100 раз. В одном из воплощений врожденная иммуногенность снижается в 200 раз. В одном из воплощений врожденная иммуногенность снижается в 500 раз. В одном из воплощений врожденная иммуногенность снижается в 1000 раз. В одном из воплощений врожденная иммуногенность снижается в 2000 раз.

Термин «проявляет значительно меньшую врожденную иммуногенность» относится к обнаруживаемому снижению врожденной иммуногенности. В одном из воплощений этот термин относится к уменьшению, при котором можно вводить эффективное количество неиммуногенной РНК, не вызывая обнаруживаемого врожденного иммунного ответа. В одном из воплощений этот термин относится к уменьшению, при котором неиммуногенная РНК может быть введена повторно, не вызывая врожденного иммунного ответа, достаточного для заметного снижения продукции белка, кодируемого неиммуногенной РНК. В одном из воплощений снижение таково, что неиммуногенную РНК можно вводить повторно, не вызывая врожденного иммунного ответа, достаточного для устранения обнаруживаемой продукции белка, кодируемого неиммуногенной РНК.

«Иммуногенность» представляет собой способность чужеродного вещества, такого как РНК, провоцировать иммунный ответ в организме человека или другого животного. Врожденная иммунная система представляет собой компонент иммунной системы, который относительно неспецифичен и непосредствен. Это один из двух основных компонентов иммунной системы позвоночных, наряду с адаптивной иммунной системой.

Как он используется в настоящем документе «эндогенный» относится к любому материалу, полученному из организма, клетки, ткани или системы или произведенному внутри него.

Как он используется в настоящем документе, термин «экзогенный» относится к любому материалу, введенному или произведенному вне организма, клетки, ткани или системы.

Термин «экспрессия», как он используется в настоящем документе, определяют как транскрипция и/или трансляция конкретной нуклеотидной последовательности.

Как применены в настоящем документе, термины «связанный», «слитый» или «слияние» применяют как взаимозаменяемые. Эти термины относятся к объединению двух или более элементов, компонентов или доменов.

Оптимизация кодонов / Увеличение содержания G/C

В некоторых воплощениях, аминокислотная последовательность активирующего соединения, описанная в настоящем документе, и/или аминокислотная последовательность соединения-ярлыка, описанного в настоящем документе, кодируется кодирующей последовательностью, которая оптимизирована по кодонам и/или содержание G/C в которой увеличено по сравнению с кодирующей последовательностью дикого типа. Это также включает воплощения, в которых одна или более областей последовательности кодирующей последовательности оптимизированы по кодонам и/или увеличены в содержании G/C по сравнению с соответствующими областями последовательности кодирующей последовательности дикого типа. В одном из воплощений оптимизация кодонов и/или увеличение содержания G/C предпочтительно не меняет последовательность кодируемой аминокислотной последовательности.

Термин «оптимизированный по кодонам» относится к изменению кодонов в кодирующей области молекулы нуклеиновой кислоты, чтобы отразить типичное применение кодонов в организме-хозяине без предпочтительного изменения аминокислотной последовательности, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты. В контексте настоящего изобретения кодирующие области предпочтительно оптимизированы по кодонам для оптимальной экспрессии у субъекта, подлежащего лечению с применением описанных в настоящем документе молекул РНК. Оптимизация

кодонов основана на открытии того, что эффективность трансляции также определяется различной частотой появления тРНК в клетках. Таким образом, последовательность РНК может быть изменена таким образом, что кодоны, для которых доступны часто встречающиеся тРНК, вставляются вместо «редких кодонов».

В некоторых воплощениях изобретения, содержание гуанозина/цитозина (G/C) в кодирующей области РНК, описанной в настоящем документе, увеличено по сравнению с содержанием G/C в соответствующей кодирующей последовательности РНК дикого типа, где аминокислотная последовательность, кодируемая РНК, предпочтительно не модифицирована по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой РНК дикого типа. Эта модификация последовательности РНК основана на том факте, что последовательность любой области РНК, подлежащей трансляции, важна для эффективной трансляции этой мРНК. Последовательности, имеющие повышенное содержание G (гуанозина)/C (цитозина), более стабильны, чем последовательности, имеющие повышенное содержание A (аденозина)/U (урацила). В связи с тем, что одну и ту же аминокислоту кодируют несколько кодонов (так называемая вырожденность генетического кода), можно определить наиболее благоприятные по стабильности кодоны (так называемое альтернативное применение кодонов). В зависимости от аминокислоты, кодируемой РНК, существуют различные возможности модификации последовательности РНК по сравнению с ее последовательностью дикого типа. В частности, кодоны, которые включают нуклеотиды A и/или U, могут быть модифицированы путем замены этих кодонов другими кодонами, которые кодируют те же аминокислоты, но не включают A и/или U или включают меньшее количество нуклеотидов A и/или U.

В различных воплощениях, содержание G/C кодирующей области РНК, описанной в настоящем документе, увеличивают на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55% или даже более по сравнению с содержанием G/C кодирующей области РНК дикого типа.

Частицы, содержащие нуклеиновую кислоту

Описанные в настоящем документе нуклеиновые кислоты, такие как РНК, кодирующая активирующее соединение, и/или РНК, кодирующая соединение-ярлык, можно вводить в виде частиц.

В контексте настоящего раскрытия термин «частица» относится к структурированному объекту, образованному молекулами или молекулярными комплексами. В одном из воплощений термин «частица» относится к микро- или наноразмерной структуре, такой как микро- или наноразмерная компактная структура, диспергированная в среде. В одном из воплощений частица представляет собой частицу,

содержащую нуклеиновую кислоту, такую как частица, включающая ДНК, РНК или их смесь.

В образовании частиц участвуют электростатические взаимодействия между положительно заряженными молекулами, такими как полимеры и липиды, и отрицательно заряженной нуклеиновой кислотой. Это приводит к комплексообразованию и спонтанному образованию частиц нуклеиновой кислоты. В одном из воплощений частица нуклеиновой кислоты представляет собой наночастицу.

В настоящем описании термин «наночастица» относится к частице, средний диаметр которой подходит для парентерального введения.

«Частица нуклеиновой кислоты» может быть применена для доставки нуклеиновой кислоты в интересующий участок-мишень (например, клетку, ткань, орган и т.п.). Частица нуклеиновой кислоты может быть образована по меньшей мере из одного катионного или катионно ионизируемого липида или липидоподобного материала, по меньшей мере одного катионного полимера, такого как протамин, или его смеси и нуклеиновой кислоты. Частицы нуклеиновой кислоты включают составы на основе липидных наночастиц (ЛНЧ) и липоплекса (ЛПКС).

Не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что катионный или катионно ионизируемый липид или липидоподобный материал и/или катионный полимер объединяются вместе с нуклеиновой кислотой с образованием агрегатов, и эта агрегация приводит к образованию коллоидно стабильных частиц.

В одном из воплощений, описанные в настоящем документе частицы дополнительно включают, по меньшей мере один липид или липидоподобный материал, отличный от катионного или катионно ионизируемого липида или липидоподобного материала, по меньшей мере один полимер, отличный от катионного полимера, или их смесь.

В некоторых воплощениях, частицы нуклеиновой кислоты включают более одного типа молекул нуклеиновой кислоты, причем молекулярные параметры молекул нуклеиновой кислоты могут быть похожими или отличаться друг от друга, например, в отношении молярной массы или фундаментальных структурных элементов, таких как молекулярная архитектура, кэпирование, кодирующие области или другие характеристики.

Частицы нуклеиновой кислоты, описанные в настоящем документе, могут иметь средний диаметр, который в одном из воплощений колеблется от примерно 30 нм до примерно 1000 нм, от примерно 50 нм до примерно 800 нм, от примерно 70 нм до примерно 600 нм, от примерно 90 нм до примерно 400 нм или от примерно 100 нм до

примерно 300 нм.

Частицы нуклеиновой кислоты, описанные в настоящем документе, могут иметь индекс полидисперсности менее чем примерно 0,5, менее чем примерно 0,4, менее чем примерно 0,3 или примерно 0,2 или менее. Например, частицы нуклеиновой кислоты могут иметь индекс полидисперсности в диапазоне от примерно 0,1 до примерно 0,3 или от примерно 0,2 до примерно 0,3.

Что касается липидных частиц РНК, то соотношение N/P дает соотношение азотистых групп в липиде к числу фосфатных групп в РНК. Это коррелирует с соотношением зарядов, поскольку атомы азота (в зависимости от pH) обычно заряжены положительно, а фосфатные группы – отрицательно. Соотношение N/P, при котором существует равновесие зарядов, зависит от pH. Липидные составы часто образуются при соотношении N/P от четырех до двенадцати, поскольку положительно заряженные наночастицы считаются благоприятными для трансфекции. В этом случае РНК считают полностью связанной с наночастицами.

Описанные в настоящем документе частицы нуклеиновой кислоты можно получить с применением широкого спектра способов, которые могут включать получение коллоида, по меньшей мере из одного катионного или катионно ионизируемого липида или липидоподобного материала и/или, по меньшей мере одного катионного полимера и смешивание коллоида с нуклеиновой кислотой для получения частиц нуклеиновой кислоты.

Термин «коллоид», применяемый в настоящем документе, относится к типу гомогенной смеси, в которой дисперсные частицы не оседают. Нерастворимые частицы в смеси микроскопические, их размер составляет от 1 до 1000 нанометров. Смесь можно назвать коллоидом или коллоидной суспензией. Иногда термин «коллоид» относится только к частицам смеси, а не ко всей суспензии.

Для получения коллоидов, включающих, по меньшей мере один катионный или катионно ионизируемый липид или липидоподобный материал и/или, по меньшей мере один катионный полимер, в настоящем документе применимы способы, которые традиционно применяют для получения липосомальных везикул и соответствующим образом адаптированы. Наиболее часто применяемые способы получения липосомальных везикул включают следующие основные стадии: (i) растворение липидов в органических растворителях, (ii) сушка полученного раствора и (iii) гидратация высушенного липида (с применением различных водных сред).

При методе пленочной гидратации липиды сначала растворяют в подходящем органическом растворителе и высушивают с образованием тонкой пленки на дне колбы.

Полученную липидную пленку гидратируют в соответствующей водной среде с получением липосомальной дисперсии. Кроме того, может быть включена дополнительная стадия по уменьшению размера.

Обращённо-фазовое выпаривание представляет собой альтернативный способ получения липосомальных везикул за счет пленочной гидратации, заключающемся в образовании водно-масляной эмульсии между водной фазой и органической фазой, содержащей липиды. Для гомогенизации системы требуется кратковременная обработка этой смеси ультразвуком. Удаление органической фазы при пониженном давлении дает молочный гель, который впоследствии превращается в липосомальную суспензию.

Термин «способ инъекции в этаноле» относится к процессу, при котором раствор этанола, включающий липиды, быстро вводят в водный раствор через иглу. Это действие диспергирует липиды по всему раствору и способствует образованию липидной структуры, например, образованию липидных везикул, такому как образование липосом. Как правило, частицы РНК-липopleкса, описанные в настоящем документе, можно получить путем добавления РНК к коллоидной липосомальной дисперсии. С применением способа инъекции в этаноле такая дисперсия коллоидных липосом в одном из воплощений формируется следующим образом: раствор этанола, содержащий липиды, такие как катионные липиды и дополнительные липиды, впрыскивается в водный раствор при перемешивании. В одном из воплощений, описанные в настоящем документе частицы РНК-липopleкса можно получить без этапа экструзии.

Термин «экструдирование» или «экструзия» относится к созданию частиц, имеющих фиксированный профиль поперечного сечения. В частности, это относится к уменьшению размера частицы, при котором частица проходит через фильтры с определенными порами.

Другие способы, не включающие органических растворителей, также могут быть применены согласно настоящему изобретению для получения коллоида.

ЛНЧ обычно включают четыре компонента: ионизируемые катионные липиды, нейтральные липиды, такие как фосфолипиды, стероид, такой как холестерин, и липид, конъюгированный с полимером, такой как полиэтиленгликоль-(ПЭГ)-липиды. Каждый компонент отвечает за защиту полезной нагрузки и обеспечивает эффективную внутриклеточную доставку. ЛНЧ можно получить путем быстрого смешивания липидов, растворенных в этаноле, с нуклеиновой кислотой в водном буфере.

Термин «средний диаметр» относится к среднему гидродинамическому диаметру частиц, измеренному методом динамического рассеяния лазерного света (ДРС) с анализом

данных с применением так называемого кумулянтного алгоритма, который в качестве результатов дает так называемый $Z_{\text{средний}}$ с размерностью длины и индексом полидисперсности (ПИ), который представляет собой безразмерный параметр (Koppel, D., J. Chem. Phys. 57, 1972, pp 4814-4820, ISO 13321). В настоящем документе «средний диаметр», «диаметр» или «размер» частиц применяют как синонимы этого значения $Z_{\text{средний}}$.

«Индекс полидисперсности» предпочтительно рассчитывают на основе измерений динамического светорассеяния с помощью так называемого кумулянтного анализа, как упомянуто в определении «среднего диаметра». При определенных предпосылках его можно принять как меру распределения ансамбля наночастиц по размерам.

Ранее были описаны различные типы частиц, содержащих нуклеиновую кислоту, которые подходят для доставки нуклеиновой кислоты в форме частиц (например, Kaczmarek, J. C. et al., 2017, Genome Medicine 9, 60). Для невирусных средств доставки нуклеиновой кислоты инкапсуляция нуклеиновой кислоты наночастицами физически защищает нуклеиновую кислоту от деградации и, в зависимости от конкретного химического состава, может способствовать клеточному поглощению и выходу из эндосом.

Настоящее изобретение описывает частицы, включающие нуклеиновую кислоту, по меньшей мере один катионный или катионно ионизируемый липид или липидоподобный материал и/или, по меньшей мере один катионный полимер, которые связываются с нуклеиновой кислотой с образованием частиц нуклеиновой кислоты, и композиции, включающие такие частицы. Частицы нуклеиновой кислоты могут включать нуклеиновую кислоту, которая образует комплекс в различных формах за счет нековалентных взаимодействий с частицей. Описанные в настоящем документе частицы не представляют собой вирусные частицы, в частности, инфекционные вирусные частицы, т.е. они не способны вирусно инфицировать клетки.

Подходящие катионные или катионно ионизируемые липиды или липидоподобные материалы и катионные полимеры представляют собой те, которые образуют частицы нуклеиновой кислоты и включены в термин «частицеобразующие компоненты» или «частицеобразующие агенты». Термин «компоненты, образующие частицы» или «агенты, образующие частицы» относится к любым компонентам, которые связываются с нуклеиновой кислотой с образованием частиц нуклеиновой кислоты. Такие компоненты включают любой компонент, который может быть частью частиц нуклеиновой кислоты.

Катионный полимер

Учитывая их высокую степень химической гибкости, полимеры обычно применяют

для основанной на наночастицах доставки. Обычно катионные полимеры применяют для электростатической конденсации отрицательно заряженной нуклеиновой кислоты в наночастицы. Эти положительно заряженные группы часто состоят из аминов, которые меняют свое состояние протонирования в диапазоне pH от 5,5 до 7,5, что, как считается, приводит к ионному дисбалансу, который приводит к разрыву эндосом. Полимеры, такие как поли-L-лизин, полиамидоамин, протамин и полиэтиленимин, а также встречающиеся в природе полимеры, такие как хитозан, применяли для доставки нуклеиновых кислот, и их применяют в качестве катионных полимеров в настоящем документе. Кроме того, некоторые исследователи синтезировали полимеры специально для доставки нуклеиновых кислот. Поли(β -аминоэфир), в частности, получили широкое применение для доставки нуклеиновых кислот благодаря простоте их синтеза и биоразлагаемости. Такие синтетические полимеры также применяют в настоящем документе в качестве катионных полимеров.

Термин «полимер», как он используется в настоящем документе, имеет свое обычное значение, т.е. молекулярную структуру, включающую одну или несколько повторяющихся единиц (мономеров), соединенных ковалентными связями. Все повторяющиеся звенья могут быть идентичными, а в некоторых случаях в полимере может присутствовать более одного типа повторяющихся звеньев. В некоторых случаях полимер имеет биологическое происхождение, т.е. представляет собой биополимер, такой как белок. В некоторых случаях в полимере также могут присутствовать дополнительные фрагменты, например, нацеленные фрагменты, такие как описанные в настоящем документе.

Если в полимере присутствует более одного типа повторяющихся звеньев, то полимер называют «сополимером». Следует понимать, что примененный в настоящем документе полимер может быть сополимером. Повторяющиеся звенья, образующие сополимер, могут располагаться любым образом. Например, повторяющиеся звенья могут быть расположены в случайном порядке, в чередующемся порядке или в виде «блочного» сополимера, т.е. состоящего из одной или более областей, каждая из которых включает первую повторяющуюся единицу (например, первый блок) и одну или более областей, каждая из которых включает вторую повторяющуюся единицу (например, второй блок) и т.д. Блок-сополимеры могут иметь два (диблок-сополимер), три (триблок-сополимер) или более количества отдельных блоков.

В некоторых воплощениях, полимер представляет собой биосовместимый полимер. Биосовместимые полимеры представляют собой полимеры, которые обычно не приводят к значительной гибели клеток при умеренных концентрациях. В некоторых воплощениях,

биосовместимый полимер представляет собой биоразлагаемый полимер, т.е. полимер способен разлагаться химически и/или биологически в физиологической среде, например, в организме.

В некоторых воплощениях, полимер может представлять собой протамин или полиалкиленимин, в частности, протамин.

Термин «протамин» относится к любому из различных сильноосновных белков с относительно низкой молекулярной массой, которые богаты аргинином и связаны, в частности, с ДНК вместо соматических гистонов в сперматозоидах различных животных (например, рыб). В частности, термин «протамин» относится к белкам, обнаруженным в сперме рыб, которые представляют собой сильноосновные белки, которые растворимы в воде, не коагулируются при нагревании и при гидролизе выделяют главным образом аргинин. В очищенной форме их применяют в составе инсулина длительного действия и для нейтрализации антикоагулянтного действия гепарина.

Согласно изобретению термин «протамин», как используется в настоящем документе, означает любую аминокислотную последовательность протамина, полученную или извлеченную из природных или биологических источников, включая ее фрагменты и мультимерные формы указанной аминокислотной последовательности или ее фрагмента, а также (синтезированные) полипептиды, которые представляют собой искусственные полипептиды и специально разработаны для конкретных целей и не могут быть выделены из нативных или биологических источников.

В одном из воплощений, полиалкиленимин включает полиэтиленимин и/или полипропиленимин, предпочтительно, полиэтиленимин. Полиэтиленимин (PEI) представляет собой предпочтительный полиалкиленимин. Средняя молекулярная масса PEI предпочтительно составляет от $0,75 \cdot 10^2$ до 10^7 Да, предпочтительно от 1000 до 10^5 Да, более предпочтительно от 10000 до 40000 Да, более предпочтительно от 15000 до 30000 Да, еще более предпочтительно от 20000 до 25000 Да.

Согласно изобретению линейный полиалкиленимин, такой как линейный полиэтиленимин (PEI), представляет собой предпочтительный полиалкиленимин.

Катионные полимеры (включая поликатионные полимеры), рассматриваемые для применения в настоящем документе, включают любые катионные полимеры, которые способны электростатически связывать нуклеиновую кислоту. В одном из воплощений, катионные полимеры, предусмотренные для применения в настоящем документе, включают любые катионные полимеры, с которыми может быть связана нуклеиновая кислота, например, путем образования комплексов с нуклеиновой кислотой или образования везикул, в которых нуклеиновая кислота заключена или инкапсулирована.

Частицы, описанные в настоящем документе, также могут включать полимеры, отличные от катионных полимеров, т.е. некатионные полимеры и/или анионные полимеры. В совокупности анионные и нейтральные полимеры называют в настоящем документе некатионными полимерами.

Липид и липидоподобный материал

Термины «липид» и «липидоподобный материал» в широком смысле определяют в настоящем документе как молекулы, которые включают один или несколько гидрофобных фрагментов или групп и необязательно также один или несколько гидрофильных фрагментов или групп. Молекулы, включающие гидрофобные и гидрофильные фрагменты, также часто называют амфифилами. Липиды обычно плохо растворимы в воде. В водной среде амфифильная природа позволяет молекулам самоорганизовываться в организованные структуры и различные фазы. Одна из этих фаз состоит из липидных бислоев, поскольку они присутствуют в везикулах, мультиламеллярных/одноламеллярных липосомах или мембранах в водной среде. Гидрофобность может быть обеспечена включением аполярных групп, которые включают, помимо прочего, длинноцепочечные насыщенные и ненасыщенные алифатические углеводородные группы и такие группы, замещенные одной или несколькими ароматическими, циклоалифатическими или гетероциклическими группами. Гидрофильные группы могут включать полярные и/или заряженные группы и включать углеводы, фосфатные, карбоксильные, сульфатные, аминок-, сульфгидрильные, нитро-, гидроксильные и другие подобные группы.

Как используется в настоящем документе, термин «амфифильный» относится к молекуле, имеющей как полярную часть, так и неполярную часть. Часто амфифильное соединение имеет полярную головку, прикрепленную к длинному гидрофобному хвосту. В некоторых воплощениях, полярная часть растворима в воде, тогда как неполярная часть нерастворима в воде. Кроме того, полярная часть может иметь либо формальный положительный заряд, либо формальный отрицательный заряд. Альтернативно, полярная часть может иметь как формальный положительный, так и отрицательный заряд и представлять собой цвиттер-ион или внутреннюю соль. Для целей изобретения амфифильное соединение может представлять собой, помимо прочего, один или множество природных или не природных липидов и липидоподобных соединений.

Термин «липидоподобный материал», «липидоподобное соединение» или «липидоподобная молекула» относится к веществам, которые структурно и/или функционально связаны с липидами, но не могут рассматриваться как липиды в строгом смысле. Например, этот термин включает соединения, которые способны образовывать

амфифильные слои, поскольку они присутствуют в везикулах, многослойных/однослойных липосомах или мембранах в водной среде, и включает поверхностно-активные вещества или синтезированные соединения как с гидрофильными, так и с гидрофобными фрагментами. Вообще говоря, этот термин относится к молекулам, которые включают гидрофильные и гидрофобные фрагменты с различной структурной организацией, которые могут быть или не быть похожими на структуру липидов. Как он используется в настоящем документе, термин «липид» следует понимать как охватывающий как липиды, так и липидоподобные материалы, если иное не указано в настоящем документе или явно не противоречит контексту.

Конкретные примеры амфифильных соединений, которые могут быть включены в амфифильный слой, включают, помимо прочего, фосфолипиды, аминоклипиды и сфинголипиды.

В некоторых воплощениях, амфифильное соединение представляет собой липид. Термин «липид» относится к группе органических соединений, которые характеризуются тем, что нерастворимы в воде, но растворимы во многих органических растворителях. В целом липиды можно разделить на восемь категорий: жирные кислоты, глицеролипиды, глицерофосфолипиды, сфинголипиды, сахаролипиды, поликетиды (полученные в результате конденсации кетоацильных субъединиц), стероловые липиды и преноловые липиды (полученные в результате конденсации изопреновых субъединиц). Хотя термин «липид» иногда применяют как синоним жиров, жиры представляют собой подгруппу липидов, называемую триглицеридами. Липиды также включают такие молекулы, как жирные кислоты и их производные (включая три-, ди-, моноглицериды и фосфолипиды), а также метаболиты, включающие стерол, такие как холестерин.

Жирные кислоты или остатки жирных кислот представляют собой разнообразную группу молекул, состоящих из углеводородной цепи, оканчивающейся группой карбоновой кислоты; такое расположение придает молекуле полярный гидрофильный конец и неполярный гидрофобный конец, нерастворимый в воде. Углеродная цепь, обычно имеющая длину от четырех до 24 атомов углерода, может быть насыщенной или ненасыщенной и может быть присоединена к функциональным группам, содержащим кислород, галогены, азот и серу. Если жирная кислота включает двойную связь, существует возможность цис- или транс-геометрической изомерии, что существенно влияет на конфигурацию молекулы. Цис-двойные связи заставляют цепь жирной кислоты изгибаться, и этот эффект усугубляется увеличением количества двойных связей в цепи. Другие основные классы липидов в категории жирных кислот представляют собой жирные эфиры и жирные амиды.

Глицеролипиды состоят из моно-, ди- и тризамещенных глицеринов, наиболее известными из которых представляют собой триэфиры жирных кислот глицерина, называемые триглицеридами. Слово «триацилглицерин» иногда применяют как синоним слова «триглицерид». В этих соединениях каждая из трех гидроксильных групп глицерина этерифицирована, как правило, разными жирными кислотами. Дополнительные подклассы глицеролипидов представлены гликозилглицеринами, для которых характерно наличие одного или нескольких остатков сахаров, присоединенных к глицерину посредством гликозидной связи.

Глицерофосфолипиды представляют собой амфипатические молекулы (содержащие как гидрофобные, так и гидрофильные области), которые содержат глицериновое ядро, связанное с двумя «хвостами» жирных кислот сложноэфирными связями и с одной «головной» группой сложноэфирной связью фосфата. Примеры глицерофосфолипидов, обычно называемых фосфолипидами (хотя сфингомиелины также классифицируются как фосфолипиды), представляют собой фосфатидилхолин (также известный как PC, GPCCho или лецитин), фосфатидилэтаноламин (PE или GPEtn) и фосфатидилсерин (PS или GPSer).

Сфинголипиды представляют собой сложное семейство соединений, имеющих общую структурную особенность – основную цепь сфингоидного основания. Основное основание сфингоида у млекопитающих обычно называют сфингозином. Церамиды (N-ацил-сфингоидные основания) представляют собой основной подкласс производных сфингоидных оснований с жирной кислотой, связанной с амидом. Жирные кислоты обычно представляют собой насыщенными или мононенасыщенными с длиной цепи от 16 до 26 атомов углерода. Основные фосфосфинголипиды млекопитающих представляют собой сфингомиелины (церамиды фосфохолины), тогда как у насекомых в основном включаются церамиды фосфоэтаноламины, а у грибов – фитоцерамиды фосфоинозитолы и головные группы, содержащие маннозу. Гликосфинголипиды представляют собой разнообразное семейство молекул, состоящих из одного или нескольких остатков сахара, связанных гликозидной связью со сфингоидным основанием. Примерами представляют собой простые и сложные гликосфинголипиды, такие как цереброзиды и ганглиозиды.

Стероловые липиды, такие как холестерин и его производные или токоферол и его производные, представляют собой важный компонент мембранных липидов наряду с глицерофосфолипидами и сфингомиелинами.

Сахаролипиды представляют собой соединения, в которых жирные кислоты непосредственно связаны с основной цепью сахара, образуя структуры, совместимые с бислоями мембран. В сахаролипидах моносахарид заменяет глицериновую основу,

присутствующую в глицеролипидах и глицерофосфолипидах. Наиболее известными сахаролипидами представляют собой ацилированные предшественники глюкозамина липида А, входящего в состав липополисахаридов грамотрицательных бактерий. Типичные молекулы липида А представляют собой дисахариды глюкозамина, которые включают до семи жирно-ацильных цепей. Минимальный липополисахарид, необходимый для роста *E. coli*, представляет собой Kdo₂-липид А, гексаацилированный дисахарид глюкозамина, который гликозилирован двумя остатками 3-дезоксид-маннооктулозоновой кислоты (Kdo).

Поликетиды синтезируются путем полимеризации ацетильных и пропионильных субъединиц с помощью классических ферментов, а также итерационных и мультимодульных ферментов, которые имеют механизмы химической реакции, общие с синтазами жирных кислот. Они включают большое количество вторичных метаболитов и натуральных продуктов животного, растительного, бактериального, грибкового и морского происхождения и имеют большое структурное разнообразие. Многие поликетиды представляют собой циклические молекулы, основные цепи которых часто модифицируются путем гликозилирования, метилирования, гидроксильирования, окисления или других процессов.

Согласно изобретению липиды и липидоподобные материалы могут быть катионными, анионными или нейтральными. Нейтральные липиды или липидоподобные материалы существуют в незаряженной или нейтральной цвиттер-ионной форме при выбранном рН.

Катионные или катионно ионизируемые липиды или липидоподобные материалы

Частицы нуклеиновой кислоты, описанные в настоящем документе, могут включать, по меньшей мере один катионный или катионно ионизируемый липид или липидоподобный материал в качестве агента, образующего частицы. Катионные или катионно ионизируемые липиды или липидоподобные материалы, предусмотренные для применения в настоящем документе, включают любые катионные или катионно ионизируемые липиды или липидоподобные материалы, которые способны электростатически связывать нуклеиновую кислоту. В одном из воплощений, катионные или катионно ионизируемые липиды или липидоподобные материалы, предусмотренные для применения в настоящем документе, могут быть связаны с нуклеиновой кислотой, например, путем образования комплексов с нуклеиновой кислотой или образования везикул, в которых нуклеиновая кислота заключена или инкапсулирована.

Термин «катионный липид» или «катионный липидоподобный материал» Как используется в настоящем документе, относится к липиду или липидоподобному

материалу, имеющему суммарный положительный заряд. Катионные липиды или липидоподобные материалы связывают отрицательно заряженную нуклеиновую кислоту посредством электростатического взаимодействия. Как правило, катионные липиды включают липофильную группу, такую как стерол, ацильная цепь, диацил или несколько ацильных цепей, а головная группа липида обычно несет положительный заряд.

В некоторых воплощениях, катионный липид или липидоподобный материал имеет суммарный положительный заряд только при определенном рН, в частности, кислом рН, в то время как он предпочтительно не имеет суммарного положительного заряда, предпочтительно не имеет заряда, т.е. он нейтрален, при другом, предпочтительно более высоком рН, таком как физиологический рН. Считается, что такое ионизирующее поведение повышает эффективность, помогая выходу из эндосом и снижая токсичность по сравнению с частицами, которые остаются катионными при физиологическом рН.

Для целей настоящего раскрытия такие «катионно ионизируемые» липиды или липидоподобные материалы включают в термин «катионный липид или липидоподобный материал», если это не противоречит обстоятельствам.

В одном из воплощений, катионный или катионно ионизируемый липид или липидоподобный материал включает головную группу, которая включает, по меньшей мере один атом азота (N), который имеет положительный заряд или способен протонироваться.

Примеры катионных липидов включают, но не ограничиваются, 1,2-диолеоил-3-триметиламмонийпропан (DOTAP); N,N-диметил-2,3-диолеилоксипропиламин (DODMA), 1,2-ди-О-октадеценил-3-триметиламмоний пропан (DOTMA), 3-(N-(N',N'-диметиламиноэтан)карбамоил) холестерин (DC-Chol), диметилдиокадециламмоний (DDAB); 1,2-диолеоил-3-диметиламмонийпропан (DODAP); 1,2-диацилокси-3-диметиламмонийпропаны; 1,2-диалкилокси-3-диметиламмонийпропаны; хлорид диоктадецилдиметиламмония (DODAC), 1,2-дистеарилокси-N,N-диметил-3-аминопропан (DSDMA), 2,3-ди(тетрадеокси)пропил-(2-гидроксиэтил)диметилазаний (DMRIE), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-этилфосфохолин (DMEPC), 1,2-димиристоил-3-триметиламмоний пропан (DMTAP), 1,2-диолеилоксипропил-3-диметилгидроксиэтиламмоний бромид (DORIE) и 2,3-диолеилокси-N-[2(карбоксамид спермина)этил]-N,N-диметил-1-пропанамия трифторацетат (DOSPA), 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLenDMA), диоктадециламидоглицилспермин (DOGS), 3-диметиламино-2-(холест-5-ен-3-бета-оксибутан-4-окси)-1-(цис,цис-9,12-октадекадиенокси)пропан (CLinDMA), 2-[5'-(холест-5-ен-3-бета-окси)-3'-оксапентокси]-3-

диметил-1-(цис,цис-9',12'-октадекадиенокси)пропан (CpLinDMA), N,N-диметил-3,4-диолеилоксибензиламин (DMOBA), 1,2-N,N'-диолеилкарбамил-3-диметиламинопропан (DOcarbDAP), 2,3-дилинолеоилокси-N,N-диметилпропиламин (DLinDAP), 1,2-N,N'-дилинолеилкарбамил-3-диметиламинопропан (DLincarbDAP), 1,2-дилинолеоилкарбамил-3-диметиламинопропан (DLinCDAP), 2,2-дилинолеил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA), 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-XTC2-DMA), 2,2-дилинолеил-4-(2-диметиламиноэтил)-[1,3]-диоксолан (DLin-KC2-DMA), гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (DLin-MC3-DMA), N-(2-Гидроксиэтил)-N,N-диметил-2,3-бис(тетрадецилокси)-1-пропанаминий бромид (DMRIE), (\pm)-N-(3-аминопропил)-N,N-диметил-2,3-бис(цис-9-тетрадеценилокси)-1-пропанаминий бромид (GAP-DMORIE), (\pm)-N-(3-аминопропил)-N,N-диметил-2,3-бис(додецилокси)-1-пропанаминий бромид (GAP-DLRIE), (\pm)-N-(3-аминопропил)-N,N-диметил-2,3-бис(тетрадецилокси)-1-пропанаминий бромид (GAP-DMRIE), N-(2-аминоэтил)-N,N-диметил-2,3-бис(тетрадецилокси)-1-пропанаминий бромид (β AE-DMRIE), N-(4-карбокисбензил)-N,N-диметил-2,3-бис(олеоилокси)пропан-1-аминий (DOBAQ), 2-({8-[(3 β)-холест-5-ен-3-илокси]октил}окси)-N,N-диметил-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]пропан-1-амин (октил-CLinDMA), 1,2-димиристоил-3-диметиламмоний-пропан (DMDAP), 1,2-дипальмитоил-3-диметиламмоний-пропан (DPDAP), N1-[2-((1S)-1-[(3-аминопропил)амино]-4-[ди(3-аминопропил)амино]бутилкарбоксамидо)этил]-3,4-ди[олеилокси]бензамид (MVL5), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-этилфосфохолин (DOEPC), 2,3-бис(додецилокси)-N-(2-гидроксиэтил)-N,N-диметилпропан-1-амониум бромид (DLRIE), N-(2-аминоэтил)-N,N-диметил-2,3-бис(тетрадецилокси)пропан-1-аминий бромид (DMORIE), ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)8,8'-(((2(диметиламино)этил)тио)карбонил)азандиил)диоктаноат (ATX), N,N-диметил-2,3-бис(додецилокси)пропан-1-амин (DLDMA), N,N-диметил-2,3-бис(тетрадецилокси)пропан-1-амин (DMDMA), ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)-9-((4-диметиламинобутаноил)окси)гептадекандиоат (L319), N-Додецил-3-((2-додецилкарбамоил-этил)-{2-[(2-додецилкарбамоил-этил)-2-{(2-додецилкарбамоил-этил)-[2-(2-додецилкарбамоил-этил)-[2-(2-додецилкарбамоил-этиламино)-этил]-амино}-этиламино)пропионамид (липидоид 98N12-5), 1-[2-[бис(2-гидроксидодецил)амино]этил-[2-[4-[2-[бис(2-гидроксидодецил)амино]этил]-[2-[4-[2-[бис(2-гидроксидодецил)амино]этил]пиперазин-1-ил]этил]амино]додекан-2-ол (липидоид C12-200).

В некоторых воплощениях, катионный липид может включать от примерно 10 мольных % до примерно 100 мольных %, от примерно 20 мольных % до примерно 100

мольных %, от примерно 30 мольных % до примерно 100 мольных %, от примерно 40 мольных % до примерно 100 мольных % или примерно 50 мольных % до примерно 100 мольных % от общего количества липидов, присутствующих в частице.

Дополнительные липиды или липидоподобные материалы

Частицы, описанные в настоящем документе, также могут включать липиды или липидоподобные материалы, отличные от катионных или катионно ионизируемых липидов или липидоподобных материалов, т.е. некаатионные липиды или липидоподобные материалы (включая некаатионно ионизируемые липиды или липидоподобные материалы). В совокупности анионные и нейтральные липиды или липидоподобные материалы называют в настоящем документе некаатионными липидами или липидоподобными материалами. Оптимизация состава частиц с нуклеиновой кислотой путем добавления других гидрофобных группировок, таких как холестерин и липиды, в дополнение к ионизируемому/катионному липиду или липидоподобному материалу может повысить стабильность частиц и эффективность доставки нуклеиновой кислоты.

Может быть включен дополнительный липид или липидоподобный материал, который может влиять или не влиять на общий заряд частиц с нуклеиновой кислотой. В некоторых воплощениях дополнительный липид или липидоподобный материал представляет собой некаатионный липид или липидоподобный материал. Некаатионный липид может включать, например, один или несколько анионных липидов и/или нейтральных липидов. Как он используется в настоящем документе, термин «анионный липид» относится к любому липиду, который отрицательно заряжен при выбранном pH. Как он используется в настоящем документе, «нейтральный липид» относится к любому из ряда видов липидов, которые существуют либо в незаряженной, либо в нейтральной цвиттер-ионной форме при выбранном pH. В предпочтительных воплощениях дополнительный липид включает один из следующих нейтральных липидных компонентов: (1) фосфолипид, (2) холестерин или его производное; или (3) смесь фосфолипида и холестерина или его производного. Примеры производных холестерина включают, но не ограничиваются ими, холестанол, холестанон, холестенон, копростанол, холестерил-2'-гидроксиэтиловый эфир, холестерил-4'-гидроксибутиловый эфир, токоферол и их производные, а также их смеси.

Конкретные фосфолипиды, которые можно применять, включают, но не ограничиваются ими, фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, фосфатидилглицерины, фосфатидные кислоты, фосфатидилсерины или сфингомиелин. Такие фосфолипиды включают, в частности, диацилфосфатидилхолины, такие как дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC),

димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), дипентадеcanoилфосфатидилхолин, дилауроилфосфатидилхолин, дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диарахидоилфосфатидилхолин (DAPC), дибегеноилфосфатидилхолин (DBPC), дитрикозаноилфосфатидилхолин (DTPC), дилигноцериолфосфатидилхолин (DLPC), пальмитоилолеоил-фосфатидилхолин (POPC), 1,2-ди-О-октадеценил-sn-глицеро-3-фосфохолин (дизфир PC 18:0), 1-олеоил-2-холестерилгемисукциноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (OChemPC), 1-гексадецил-sn-глицеро-3-фосфохолин (C16 Lyso PC) и фосфатидилэтаноламины, в частности диацилфосфатидилэтаноламины, такие как диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), димиристоилфосфатидилэтаноламин (DMPE), дилауроилфосфатидилэтаноламин (DLPE), дифитаноилфосфатидилэтаноламин (DPyPE) и другие липиды фосфатидилэтаноламина с различными гидрофобными цепями.

В некоторых предпочтительных воплощениях, дополнительный липид представляет собой DSPC или DSPE и холестерин.

В некоторых воплощениях, частицы с нуклеиновой кислотой включают как катионный липид, так и дополнительный липид.

В одном из воплощений, описанные в настоящем документе частицы включают конъюгированный с полимером липид, такой как пегилированный липид. Термин «пегилированный липид» относится к молекуле, включающей как липидную часть, так и полиэтиленгликолевую часть. Пегилированные липиды известны в данной области техники.

Не желая ограничиваться теорией, количество, по меньшей мере одного катионного липида по сравнению с количеством, по меньшей мере одного дополнительного липида может влиять на важные характеристики частиц с нуклеиновой кислотой, такие как заряд, размер частиц, стабильность, тканеселективность и биологическая активность нуклеиновой кислоты. Соответственно, в некоторых воплощениях молярное соотношение, по меньшей мере одного катионного липида к по меньшей мере одному дополнительному липиду составляет от примерно 10:0 до примерно 1:9, от примерно 4:1 до примерно 1:2 или от примерно 3:1 до примерно 1:1.

В некоторых воплощениях, некатионный липид, в частности, нейтральный липид (например, один или несколько фосфолипидов и/или холестерин), может включать от примерно 0 мольных % до примерно 90 мольных %, от примерно 0 мольных % до примерно 80 мольных %, от примерно 0 мольных % до примерно 70 мольных %, от примерно 0 мольных % до примерно 60 мольных % или от примерно 0 мольных % до примерно 50 мольных % от общего количества липидов, присутствующих в частице.

Частицы липоплекса

В некоторых воплощениях настоящего раскрытия, РНК, описанная в настоящем документе, может присутствовать в частицах РНК-липopleкса.

В контексте настоящего раскрытия, термин «частица РНК-липopleкса» относится к частице, которая содержит липид, в частности, катионный липид, и РНК. Электростатические взаимодействия между положительно заряженными липосомами и отрицательно заряженной РНК приводят к комплексообразованию и спонтанному образованию частиц РНК-липopleкса. Положительно заряженные липосомы обычно можно синтезировать с применением катионного липида, такого как DOTMA, и дополнительных липидов, таких как DOPE. В одном из воплощений частица РНК-липopleкса представляет собой наночастицу.

В некоторых воплощениях, частицы РНК-липopleкса включают как катионный липид, так и дополнительный липид. В примерном воплощении катионный липид представляет собой DOTMA, а дополнительный липид представляет собой DOPE.

В некоторых воплощениях, молярное отношение, по меньшей мере одного катионного липида к по меньшей мере одному дополнительному липиду составляет от примерно 10:0 до примерно 1:9, от примерно 4:1 до примерно 1:2 или от примерно 3:1 до примерно 1:1. В конкретных воплощениях, молярное соотношение может составлять примерно 3:1, примерно 2,75:1, примерно 2,5:1, примерно 2,25:1, примерно 2:1, примерно 1,75:1, примерно 1,5:1, примерно 1,25:1 или примерно 1:1. В примерном воплощении молярное соотношение, по меньшей мере одного катионного липида к, по меньшей мере одному дополнительному липиду составляет примерно 2:1.

Описанные в настоящем документе частицы РНК-липopleкса имеют средний диаметр, который в одном из воплощений колеблется от примерно 200 нм до примерно 1000 нм, от примерно 200 нм до примерно 800 нм, от примерно 250 до примерно 700 нм, от примерно 400 до примерно 600 нм, от примерно 300 нм до примерно 500 нм или от примерно 350 нм до примерно 400 нм. В конкретных воплощениях частицы РНК-липopleкса имеют средний диаметр, равный примерно 200 нм, примерно 225 нм, примерно 250 нм, примерно 275 нм, примерно 300 нм, примерно 325 нм, примерно 350 нм, примерно 375 нм, примерно 400 нм, примерно 425 нм, примерно 450 нм, примерно 475 нм, примерно 500 нм, примерно 525 нм, примерно 550 нм, примерно 575 нм, примерно 600 нм, примерно 625 нм, примерно 650 нм, примерно 700 нм, примерно 725 нм, примерно 750 нм, примерно 775 нм, примерно 800 нм, примерно 825 нм, примерно 850 нм, примерно 875 нм, примерно 900 нм, примерно 925 нм, примерно 950 нм, примерно 975 нм или примерно 1000 нм. В одном воплощении частицы РНК-липopleкса

имеют средний диаметр в диапазоне от примерно 250 нм до примерно 700 нм. В другом воплощении частицы РНК-липоплекса имеют средний диаметр в диапазоне от примерно 300 нм до примерно 500 нм. В примерном воплощении частицы РНК-липоплекса имеют средний диаметр примерно 400 нм.

Описанные в настоящем документе частицы РНК-липоплекса и композиции, включающие частицы РНК-липоплекса, полезны для доставки РНК в ткань-мишень после парентерального введения, в частности, после внутривенного введения. Частицы РНК-липоплекса можно получить с применением липосом, которые можно получить путем инъекции раствора липидов в этаноле в воду или подходящую водную фазу. В одном из воплощений водная фаза имеет кислый pH. В одном из воплощений водная фаза включает уксусную кислоту, например, в количестве примерно 5 мМ. Липосомы можно применять для приготовления частиц РНК-липоплекса путем смешивания липосом с РНК. В одном из воплощений липосомы и частицы РНК-липоплекса включают, по меньшей мере один катионный липид и по меньшей мере один дополнительный липид. В одном из воплощений по меньшей мере один катионный липид включает 1,2-ди-О-октадеценил-3-триметиламмонийпропан (DOTMA) и/или 1,2-диолеоил-3-триметиламмонийпропан (DOTAP). В одном из воплощений по меньшей мере один дополнительный липид включает 1,2-ди-(9Z-октадеценоил)-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE), холестерин (Chol) и/или 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC). В одном из воплощений по меньшей мере один катионный липид включает 1,2-ди-О-октадеценил-3-триметиламмонийпропан (DOTMA), а по меньшей мере один дополнительный липид включает 1,2-ди-(9Z-октадеценоил)-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE). В одном из воплощений липосомы и частицы РНК-липоплекса включают 1,2-ди-О-октадеценил-3-триметиламмонийпропан (DOTMA) и 1,2-ди-(9Z-октадеценоил)-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE).

Липидные наночастицы (ЛНЧ)

В одном из воплощений нуклеиновую кислоту, такую как РНК, описанную в настоящем документе, вводят в форме липидных наночастиц (ЛНЧ). ЛНЧ может включать любой липид, способный образовывать частицу, к которой присоединена одна или несколько молекул нуклеиновой кислоты или в которой инкапсулирована одна или несколько молекул нуклеиновой кислоты.

В одном из воплощений ЛНЧ включает один или несколько катионных липидов и один или несколько стабилизирующих липидов. Стабилизирующие липиды включают нейтральные липиды и пегилированные липиды.

В одном из воплощений ЛНЧ включает катионный липид, нейтральный липид,

стероид, липид, конъюгированный с полимером, и РНК, инкапсулированную внутри липидной наночастицы или связанную с ней.

В одном из воплощений ЛНЧ включает от 40 до 55 мольных процентов, от 40 до 50 мольных процентов, от 41 до 49 мольных процентов, от 41 до 48 мольных процентов, от 42 до 48 мольных процентов, от 43 до 48 мольных процентов, от 44 до 48 мольных процентов, от 45 до 48 мольных процентов, от 46 до 48 мольных процентов, от 47 до 48 мольных процентов или от 47,2 до 47,8 мольных процентов катионного липида. В одном из воплощений ЛНЧ включает примерно 47,0, 47,1, 47,2, 47,3, 47,4, 47,5, 47,6, 47,7, 47,8, 47,9 или 48,0 мольных процентов катионного липида.

В одном из воплощений, нейтральный липид присутствует в концентрации от 5 до 15 мольных процентов, от 7 до 13 мольных процентов или от 9 до 11 мольных процентов. В одном из воплощений, нейтральный липид присутствует в концентрации примерно 9,5, 10 или 10,5 мольных процентов.

В одном из воплощений, стероид присутствует в концентрации от 30 до 50 мольных процентов, от 35 до 45 мольных процентов или от 38 до 43 мольных процентов. В одном из воплощений стероид присутствует в концентрации примерно 40, 41, 42, 43, 44, 45 или 46 мольных процентов.

В одном из воплощений, ЛНЧ включает от 1 до 10 мольных процентов, от 1 до 5 мольных процентов или от 1 до 2,5 мольных процентов липида, конъюгированного с полимером.

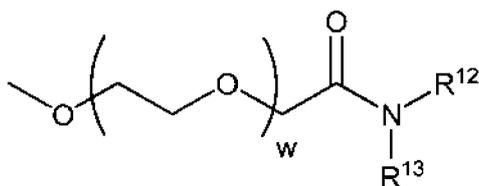
В одном из воплощений ЛНЧ включает от 40 до 50 мольных процентов катионного липида, от 5 до 15 мольных процентов нейтрального липида, от 35 до 45 мольных процентов стероида, от 1 до 10 мольных процентов липида, сопряженного с полимером, и РНК, инкапсулированная внутри липидной наночастицы или связанная с ней.

В одном из воплощений, мольный процент определяют на основе общего моля липида, присутствующего в липидной наночастице.

В одном из воплощений, нейтральный липид выбирают из группы, состоящей из DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE, DOPG, DPPG, POPE, DPPE, DMPE, DSPE и SM. В одном из воплощений, нейтральный липид выбирают из группы, состоящей из DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE и SM. В одном из воплощений нейтральный липид представляет собой DSPC.

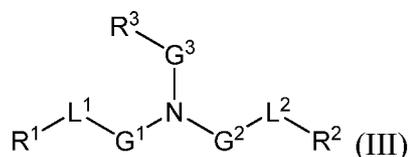
В одном из воплощений, стероид представляет собой холестерин.

В одном из воплощений, липид, конъюгированный с полимером, представляет собой пегилированный липид. В одном из воплощений, пегилированный липид имеет следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемую соль, таутомер или стереоизомер, в которой: R^{12} и R^{13} каждый независимо представляет собой прямую или разветвленную, насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, содержащую от 10 до 30 атомов углерода, в которой алкильная цепь необязательно прерывается одной или несколькими сложноэфирными связями, а w имеет среднее значение в диапазоне от 30 до 60. В одном из воплощений каждый из R^{12} и R^{13} представляет собой независимо прямую насыщенную алкильную цепь, содержащую от 12 до 16 атомов углерода. В одном из воплощений w имеет среднее значение от 40 до 55. В одном из воплощений среднее значение w составляет примерно 45. В одном из воплощений каждый из R^{12} и R^{13} независимо представляет собой прямую насыщенную алкильную цепь, содержащую примерно 14 атомов углерода, а среднее значение w составляет примерно 45.

В некоторых воплощениях, катионный липидный компонент ЛНЧ имеет структуру формулы (III):



или ее фармацевтически приемлемой соли, таутомера, пролекарства или стереоизомера, в которой:

один из L^1 или L^2 представляет собой $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$ или $-NR^aC(=O)O-$, и другой из L^1 или L^2 представляет собой $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$ или $-NR^aC(=O)O-$ или прямую связь;

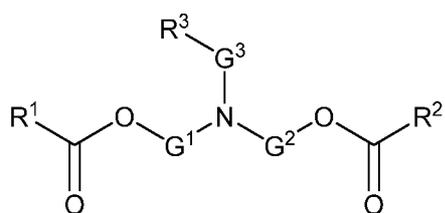
G^1 и G^2 каждый независимо друг от друга представляет собой незамещенный C_1-C_{12} алкилен или C_1-C_{12} алкенилен;

G^3 представляет собой C_1-C_{24} алкилен, C_1-C_{24} алкенилен, C_3-C_8 циклоалкилен, C_3-C_8 циклоалкенилен;

R^a представляет собой H или C_1-C_{12} алкил;

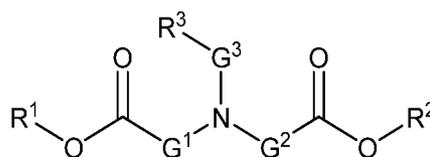
R^1 и R^2 каждый независимо друг от друга представляет собой C_6-C_{24} алкил или C_6-C_{24} алкенил;

R^3 представляет собой H, OR^5 , CN, $-C(=O)OR^4$, $-OC(=O)R^4$ или $-NR^5C(=O)R^4$;



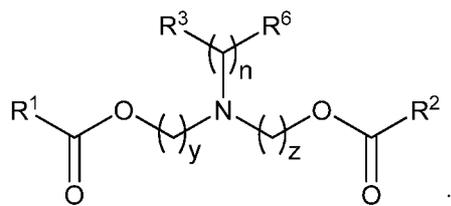
(III E)

или

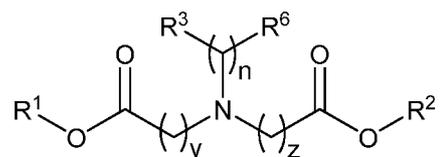


(III F)

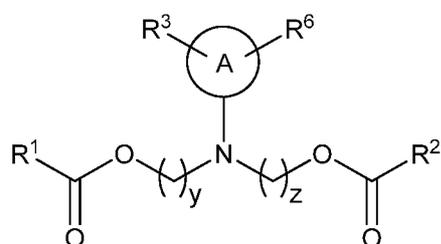
В некоторых из вышеизложенных воплощений формулы (III) липид имеет одну из следующих структур (III G), (III H), (III I), or (III J):



(III G)

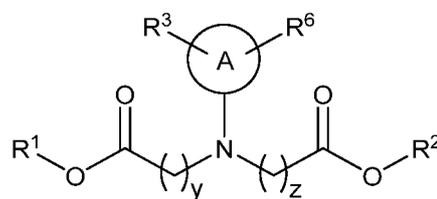


(III H)



(III I)

или



(III J)

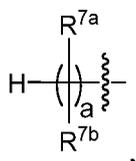
В некоторых из вышеизложенных воплощений формулы (III), n представляет собой целое число в диапазоне от 2 до 12, например, от 2 до 8 или от 2 до 4. Например, в некоторых воплощениях, n равно 3, 4, 5 или 6. В некоторых воплощениях, n равно 3. В некоторых воплощениях, n равно 4. В некоторых воплощениях, n равно 5. В некоторых воплощениях, n равно 6.

В некоторых других из вышеизложенных воплощений формулы (III), y и z каждый независимо друг от друга представляет собой целое число в диапазоне от 2 до 10. Например, в некоторых воплощениях, y и z каждый независимо друг от друга представляет собой целое число в диапазоне от 4 до 9 или от 4 до 6.

В некоторых из вышеизложенных воплощений формулы (III), R⁶ представляет собой H. В других вышеизложенных воплощениях, R⁶ представляет собой C₁-C₂₄ алкил. В других воплощениях, R⁶ представляет собой OH.

В некоторых воплощениях формулы (III), G^3 незамещен. В других воплощениях, G^3 замещен. В различных воплощениях, G^3 представляет собой линейный C_1 - C_{24} алкилен или линейный C_1 - C_{24} алкенилен.

В некоторых других вышеизложенных воплощениях формулы (III), R^1 или R^2 , или оба, представляет собой C_6 - C_{24} алкенил. Например, в некоторых воплощениях, R^1 и R^2 каждый независимо имеет следующую структуру:



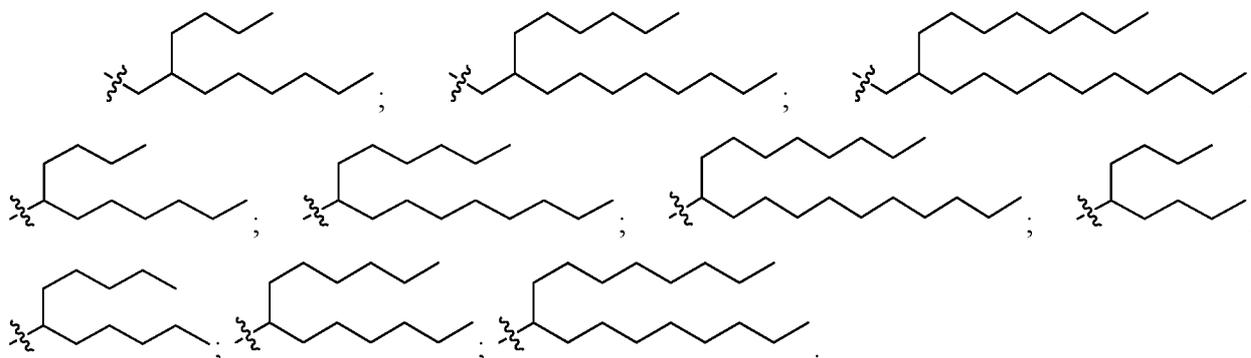
в которой:

R^{7a} и R^{7b} в каждом случае независимо представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, и a представляет собой целое число от 2 до 12,

в которой R^{7a} , R^{7b} и a каждый из них выбирают таким образом, что R^1 и R^2 каждый независимо включает от 6 до 20 атомов углерода. Например, в некоторых воплощениях a представляет собой целое число в диапазоне от 5 до 9 или от 8 до 12.

В некоторых из вышеизложенных воплощений формулы (III) по меньшей мере в одном случае R^{7a} представляет собой H. Например, в некоторых воплощениях R^{7a} представляет собой H в каждом случае. В других различных воплощениях вышеизложенного по меньшей мере в одном случае R^{7b} представляет собой C_1 - C_8 алкил. Например, в некоторых воплощениях C_1 - C_8 алкил представляет собой метил, этил, н-пропил, изо-пропил, н-бутил, изо-бутил, трет-бутил, н-гексил или н-октил.

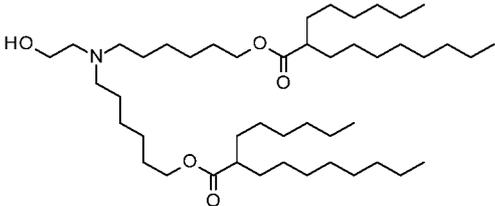
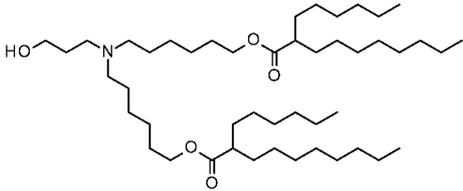
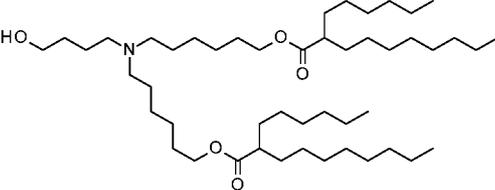
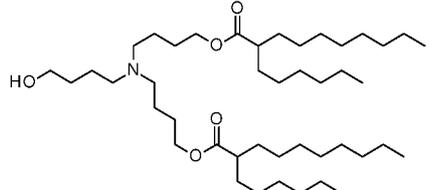
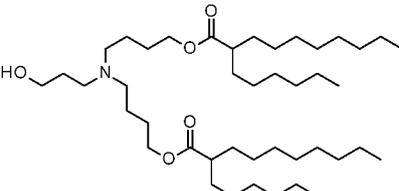
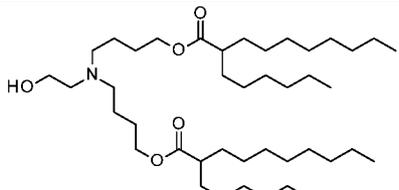
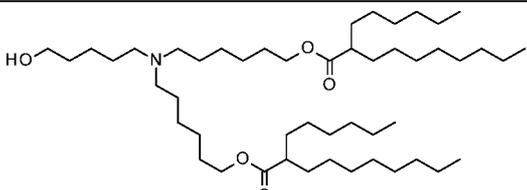
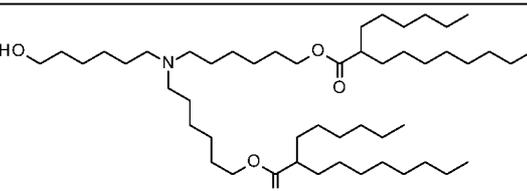
В различных воплощениях формулы (III), R^1 или R^2 , или оба, имеет одну из следующих структур:

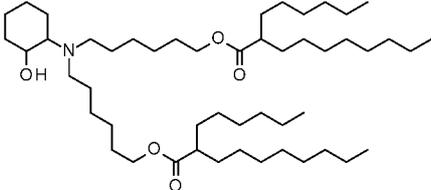
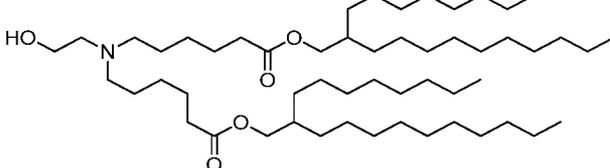
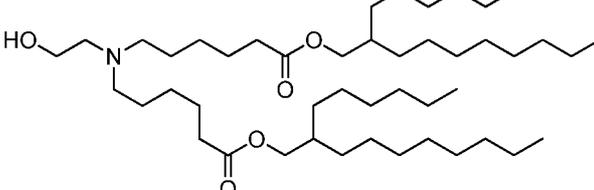
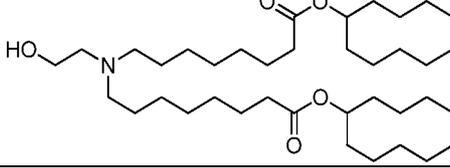
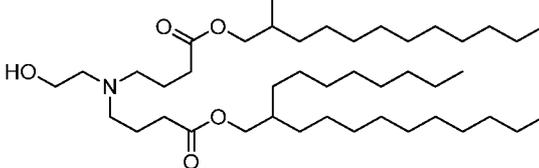
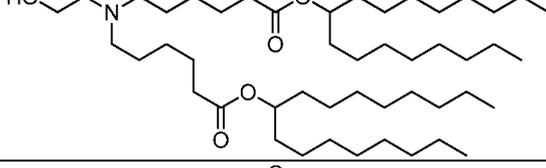
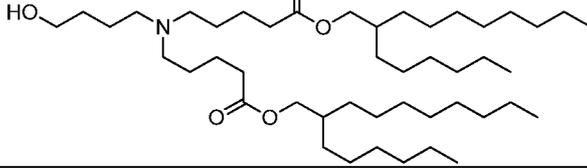
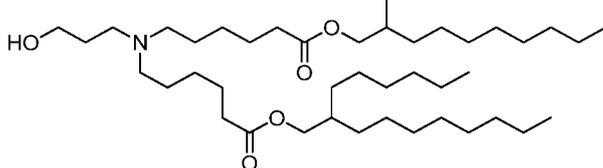
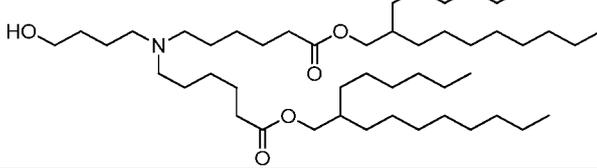


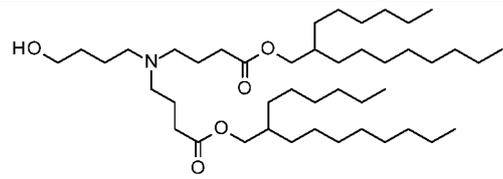
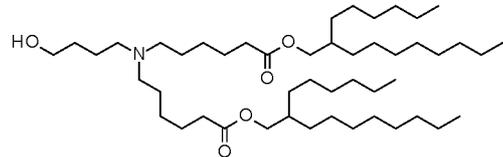
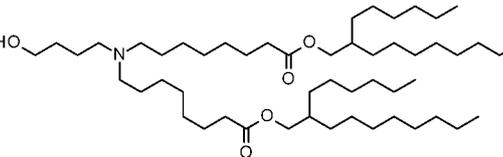
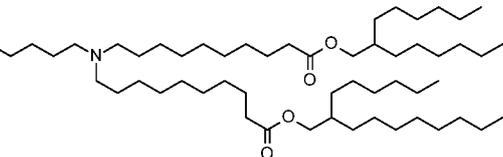
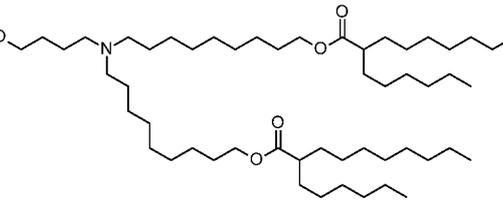
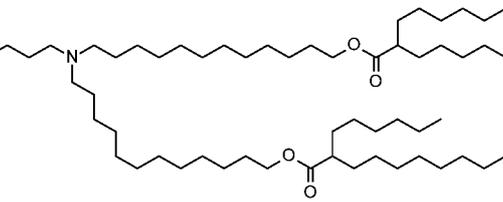
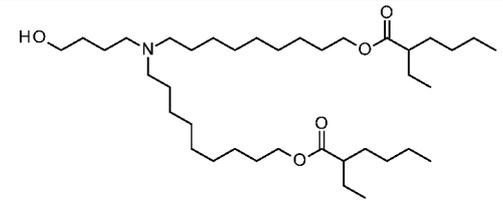
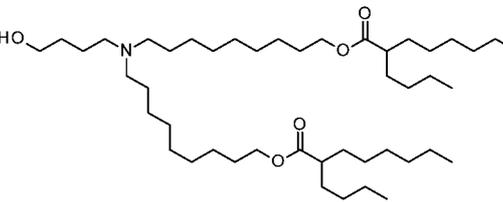
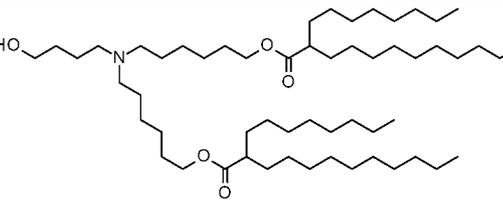
В некоторых из вышеизложенных воплощений формулы (III), R^3 представляет собой OH, CN, $-C(=O)OR^4$, $-OC(=O)R^4$ или $-NHC(=O)R^4$. В некоторых воплощениях R^4 представляет собой метил или этил.

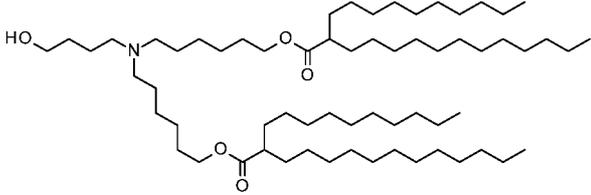
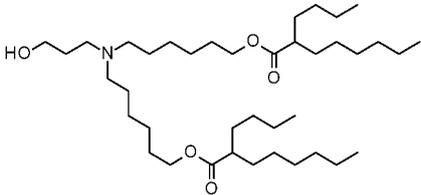
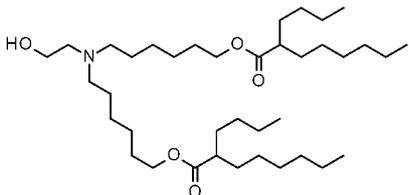
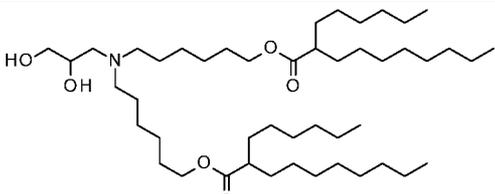
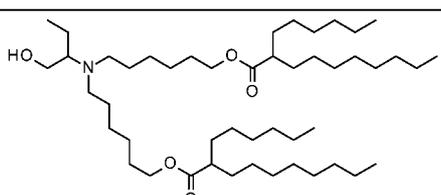
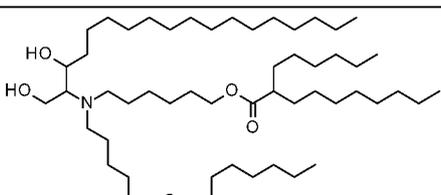
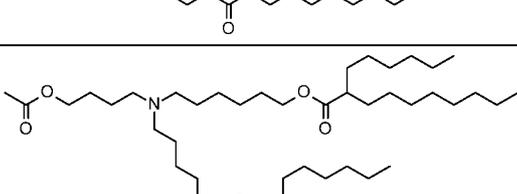
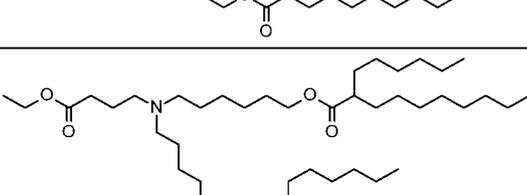
В различных воплощениях катионный липид формулы (III) имеет одну из структур, представленных в таблице ниже.

Типичные соединения формулы (III).

№	Структура
III-1	
III-2	
III-3	
III-4	
III-5	
III-6	
III-7	
III-8	

№	Структура
III-9	
III-10	
III-11	
III-12	
III-13	
III-14	
III-15	
III-16	
III-17	

№	Структура
III-18	
III-19	
III-20	
III-21	
III-22	
III-23	
III-24	
III-25	
III-26	

№	Структура
III-27	
III-28	
III-29	
III-30	
III-31	
III-32	
III-33	
III-34	

некоторых воплощениях значение N/P находится в диапазоне от 4 до 20, от 4 до 12, от 4 до 10, от 4 до 8 или от 5 до 7. В одном из воплощений значение N/P равно примерно 6.

ЛНЧ, описанный в настоящем документе, может иметь средний диаметр, который в одном из воплощений находится в диапазоне от примерно 30 нм до примерно 200 нм или от примерно 60 нм до примерно 120 нм.

Нацеливание РНК

Некоторые аспекты изобретения включают адресную доставку РНК, раскрытой в настоящем документе (например, РНК, кодирующей активирующее соединение, и/или РНК, кодирующей соединение-ярлык).

В одном из воплощений изобретение включает воздействие на лимфатическую систему, в частности, на вторичные лимфоидные органы, более конкретно на селезенку. Нацеливание на лимфатическую систему, в частности, на вторичные лимфоидные органы, более конкретно на селезенку, особенно предпочтительно, если вводимая РНК представляет собой РНК, кодирующую активирующее соединение.

В одном из воплощений клетка-мишень представляет собой клетку селезенки. В одном из воплощений клетка-мишень представляет собой антигенпрезентирующую клетку, такую как профессиональная антигенпрезентирующая клетка в селезенке. В одном из воплощений клетка-мишень представляет собой дендритную клетку селезенки.

«Лимфатическая система» представляет собой часть системы кровообращения и важную часть иммунной системы и включает сеть лимфатических сосудов, несущих лимфу. Лимфатическая система состоит из лимфатических органов, проводящей сети лимфатических сосудов и циркулирующей лимфы. Первичные или центральные лимфоидные органы генерируют лимфоциты из незрелых клеток-предшественников. Тимус и костный мозг составляют первичные лимфоидные органы. Вторичные или периферические лимфоидные органы, в том числе лимфатические узлы и селезенка, поддерживают зрелые наивные лимфоциты и инициируют адаптивный иммунный ответ.

РНК может быть доставлена в селезенку с помощью, так называемых липоплексных составов, в которых РНК связана с липосомами, содержащими катионный липид и необязательно дополнительный или вспомогательный липид, с образованием составов наночастиц для инъекций. Липосомы можно получить путем инъекции раствора липидов в этаноле в воду или подходящую водную фазу. Частицы РНК-липopleкса можно получить путем смешивания липосом с РНК. Частицы РНК-липopleкса, нацеленные на селезенку, описаны в WO 2013/143683, включенной в настоящий документ посредством отсылки. Было обнаружено, что частицы РНК-липopleкса, имеющие суммарный отрицательный заряд, могут быть применены для предпочтительного воздействия на

ткань селезенки или клетки селезенки, такие как антигенпрезентирующие клетки, в частности, дендритные клетки. Соответственно, после введения частиц РНК-липоплекса происходит накопление РНК и/или экспрессия РНК в селезенке. Таким образом, частицы РНК-липоплекса по настоящему изобретению можно применять для экспрессии РНК в селезенке. В одном из воплощений после введения частиц РНК-липоплекса не происходит или практически не происходит накопления РНК и/или экспрессии РНК в легких и/или печени. В одном из воплощений после введения частиц РНК-липоплекса происходит накопление РНК и/или экспрессия РНК в антигенпрезентирующих клетках, таких как профессиональные антигенпрезентирующие клетки в селезенке. Таким образом, частицы РНК-липоплекса по настоящему изобретению можно применять для экспрессии РНК в таких антигенпрезентирующих клетках. В одном из воплощений антигенпрезентирующие клетки представляют собой дендритные клетки и/или макрофаги.

Электрический заряд частиц РНК-липоплекса, раскрытый в настоящем изобретении, представляет собой сумму электрических зарядов, присутствующих, по меньшей мере в одном катионном липиде, и электрических зарядов, присутствующих в РНК. Отношение зарядов представляет собой отношение положительных зарядов, присутствующих, по меньшей мере в одном катионном липиде, к отрицательным зарядам, присутствующим в РНК. Отношение зарядов положительных зарядов, присутствующих, по меньшей мере в одном катионном липиде, к отрицательным зарядам, присутствующим в РНК, рассчитывают по следующему уравнению: соотношение зарядов = [(концентрация катионного липида (моль)) * (общее количество положительных зарядов в катионном липиде)] / [(концентрация РНК (моль)) * (общее количество отрицательных зарядов в РНК)].

Частицы РНК-липоплекса, нацеленные на селезенку, описанные в настоящем документе, при физиологическом рН предпочтительно имеют суммарный отрицательный заряд, такой как отношение зарядов положительных зарядов к отрицательным зарядам от примерно 1,9:2 до примерно 1:2 или от примерно 1,6:2 до примерно 1:2, или от примерно 1,6:2 до примерно 1,1:2. В конкретных воплощениях отношение зарядов положительных зарядов к отрицательным зарядам в частицах РНК-липоплекса при физиологическом рН составляет примерно 1,9:2,0, примерно 1,8:2,0, примерно 1,7:2,0, примерно 1,6:2,0, примерно 1,5:2,0, примерно 1,4: 2,0, примерно 1,3:2,0, примерно 1,2:2,0, примерно 1,1:2,0 или примерно 1:2,0.

Соединения-ярылки могут быть обеспечены субъекту путем введения субъекту РНК, кодирующей соединение-ярылок, в композиции для преимущественной доставки РНК в печень или ткань печени. Доставка РНК в такой орган или ткань-мишень

предпочтительна, в частности, если желательно экспрессировать большие количества кодируемого пептида/полипептида и/или если желательно или необходимо системное присутствие кодируемого пептида/полипептида, в частности, в значительных количествах.

Системы доставки РНК отдадут предпочтение печени. Это относится к частицам на основе липидов, катионным и нейтральным наночастицам, в частности, к липидным наночастицам, таким как липосомы, наномицеллам и липофильным лигандам в биоконъюгатах. Накопление в печени вызвано прерывистым характером печеночной сосудистой сети или метаболизмом липидов (липосом и конъюгатов липидов или холестерина).

Для доставки РНК в печень *in vivo* можно применять систему доставки лекарственного средства для транспортировки РНК в печень путем предотвращения ее деградации. Например, полиплексные наномицеллы, состоящие из поверхности, покрытой поли(этиленгликолем) (ПЭГ), и ядра, содержащего мРНК, представляют собой полезную систему, поскольку наномицеллы обеспечивают превосходную стабильность РНК *in vivo* в физиологических условиях. Кроме того, свойство скрытности, обеспечиваемое поверхностью полиплексных наномицелл, состоящей из плотного частокола из ПЭГ, позволяет эффективно уклоняться от иммунной защиты хозяина.

Цитокины, участвующие в пролиферации и/или поддержании Т-клеток, представляют собой примеры иммуностимуляторов, подходящих для нацеливания на печень. Примеры подходящих цитокинов включают ИЛ2 или ИЛ7, их фрагменты и варианты, а также слитые белки этих цитокинов, фрагментов и вариантов.

В другом воплощении РНК, кодирующую иммуностимулятор, можно вводить в композиции для преимущественной доставки РНК в лимфатическую систему, в частности, во вторичные лимфоидные органы, более конкретно, в селезенку. Доставка иммуностимулятора к такой ткани-мишени предпочтительна, в частности, если желательно присутствие иммуностимулятора в этом органе или ткани (например, для индукции иммунного ответа, в частности, в случае, если иммуностимуляторы, такие как цитокины, необходимы во время Т-клеточного праймирования или для активации резидентных иммунных клеток), при этом нежелательно, чтобы иммуностимулятор присутствовал системно, в частности, в значительных количествах (например, потому что иммуностимулятор обладает системной токсичностью).

Цитокины, участвующие в праймировании Т-клеток, представляют собой примерами подходящих иммуностимуляторов. Примеры подходящих цитокинов включают ИЛ12, ИЛ15, ИФН- α или ИФН- β , их фрагменты и варианты, а также слитые белки этих цитокинов, фрагментов и вариантов.

Фармацевтические композиции

Описанные в настоящем документе агенты, такие как РНК, кодирующая активирующее соединение, РНК, кодирующая соединение-ярылок, и/или иммунные эффекторные клетки, можно вводить в фармацевтических композициях или лекарственных средствах и можно вводить в форме любой подходящей фармацевтической композиции.

В одном из воплощений всех аспектов изобретения описанные в настоящем документе компоненты можно вводить в фармацевтической композиции, которая может включать фармацевтически приемлемый носитель и необязательно может включать один или несколько адъювантов, стабилизаторов и т.д. В одном из воплощений фармацевтическая композиция предназначена для терапевтического или профилактического лечения, например, для применения при лечении или профилактике заболевания.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату, включающему терапевтически эффективное средство, предпочтительно вместе с фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями и/или вспомогательными веществами. Указанная фармацевтическая композиция полезна для лечения, предотвращения или снижения тяжести заболевания или расстройства путем введения указанной фармацевтической композиции субъекту. Фармацевтическая композиция также известна в данной области техники как фармацевтический состав.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению обычно применяются в «фармацевтически эффективном количестве» и в «фармацевтически приемлемом лекарственном препарате».

Термин «фармацевтически приемлемый» относится к нетоксичному материалу, который не взаимодействует с действием активного компонента фармацевтической композиции.

Термин «фармацевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, которое обеспечивает желаемую реакцию или желаемый эффект отдельно или вместе с дополнительными дозами и/или средствами. В случае лечения конкретного заболевания желаемая реакция предпочтительно относится к торможению течения заболевания. Это включает замедление прогрессирования заболевания и, в частности, прекращение или обращение вспять прогресса заболевания. Желаемой реакцией при лечении заболевания также может быть задержка начала или предотвращение возникновения указанного заболевания или указанного состояния. Эффективное количество описанных в настоящем документе

композиций будет зависеть от состояния, подлежащего лечению, тяжести заболевания, индивидуальных параметров пациента, включая возраст, физиологическое состояние, размер и вес, продолжительность лечения, типа сопутствующей терапии (если она присутствует), конкретного пути введения и подобных факторов. Соответственно, вводимые дозы описанных в настоящем документе композиций, могут зависеть от таких различных параметров. В случае если реакция у пациента недостаточна при начальной дозе, то можно применять более высокие дозы (или, по сути, более высокие дозы, достигаемые другим, более локализованным путем введения).

Термин «субтерапевтическое количество» обычно относится к количеству фармацевтического средства, меньшему, чем стандартное терапевтическое, что означает, что количество, необходимое для желаемого эффекта, ниже, чем когда фармацевтическое средство применяют отдельно. Термин «субтерапевтическое количество», как он используется в настоящем документе, означает, что дозировка или количество конкретного фармацевтического агента недостаточны для достижения желаемого фармакологического действия в отсутствие других соединений, лекарств или фармацевтических средств, например, при отсутствии активирующего соединения. Такое желаемое фармакологическое действие может включать полное или по существу полное отторжение солидных опухолей. Субтерапевтические количества и дозы обычно составляют не менее примерно 5%, обычно не менее примерно 10% и обычно не более примерно 75%, чаще примерно не более 60% от терапевтической дозировки или количества. Обычно количество иммунных эффекторных клеток, вводимых (включая образование *in vivo* у субъекта) для CAR T-клеточной терапии человека, составляет примерно 10^9 на дозу (что эквивалентно $1,33 \times 10^7$ на кг) или выше (что эквивалентно $1,3 \times 10^7$ на кг). Кроме того, некоторые терапевтические подходы включают повторное введение CAR T-клеток в течение короткого периода времени (например, менее 4 недель) для повышения безопасности за счет увеличения дозы и/или для поддержания количества эффективных T-клеток у пациента. Это приводит к еще большим «накопленным дозам» за такие периоды времени. Таким образом, «субтерапевтическое количество» иммунных эффекторных клеток представляет собой количество таких клеток на начальную дозу и/или накопленную дозу за период времени, составляющий 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 7 дней, по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 21 день, по меньшей мере 28 дней или даже дольше, равное 10^8 или менее, 10^7 или менее, 10^6 или менее, 10^5 или менее, 10^4 или менее, 10^3 или менее или даже меньше. В одном из воплощений термин «субтерапевтическое количество» иммунных эффекторных клеток,

генетически модифицированных для экспрессии рецептора антигена, относится к однократной дозе таких клеток в количестве 10^8 или менее, 10^7 или менее, 10^6 или менее, 10^5 или менее, 10^4 или менее, 10^3 или менее или даже меньше. Термин «однократная доза» означает, что одну дозу терапевтического вещества вводят в течение длительного времени. Термин «длительное время» включает период, равный, по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 21 день, по меньшей мере 28 дней, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 6 месяцев или даже дольше.

Фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем документе, могут содержать соли, буферы, консерванты и необязательно другие терапевтические средства. В одном из воплощений фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем документе, включают один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей и/или вспомогательных веществ.

Подходящие консерванты для применения в фармацевтических композициях настоящего раскрытия включают, без ограничения, хлорид бензалкония, хлорбутанол, парабен и тимеросал.

Термин «наполнитель», как он используется в настоящем документе, относится к веществу, которое может присутствовать в фармацевтической композиции настоящего изобретения, но не представляет собой активный ингредиент. Примеры наполнителей включают, помимо прочего, носители, связующие, разбавители, смазывающие вещества, загустители, поверхностно-активные вещества, консерванты, стабилизаторы, эмульгаторы, буферы, ароматизаторы или красители.

Термин «разбавитель» относится к разбавляющему и/или разжижающему средству. Более того, термин «разбавитель» включает любую одну или несколько жидкостей, жидких или твердых суспензий и/или смешанных сред. Примеры подходящих разбавителей включают этанол, глицерин и воду.

Термин «носитель» относится к компоненту, который может быть природным, синтетическим, органическим, неорганическим, в котором активный компонент объединен с целью облегчить, усилить или сделать возможным введение фармацевтической композиции. Носитель, примененный в настоящем документе, может представлять собой один или несколько совместимых твердых или жидких наполнителей, разбавителей или инкапсулирующих веществ, которые подходят для введения субъекту. Подходящие носители включают, без ограничения, стерильную воду, раствор Рингера, раствор Рингера с лактатом, стерильный раствор хлорида натрия, изотонический солевой раствор, полиалкиленгликоли, гидрогенизированные нафталины и, в частности, биосовместимые полимеры лактида, сополимеры лактида/гликолида или сополимеры

полиоксиэтилена/полиоксипропилена. В одном из воплощений фармацевтическая композиция настоящего изобретения включает изотонический солевой раствор.

Фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или разбавители для терапевтического применения хорошо известны в фармацевтической области техники и описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R Gennaro edit. 1985).

Фармацевтические носители, вспомогательные вещества или разбавители можно выбирать с учетом предполагаемого пути введения и стандартной фармацевтической практики.

В одном из воплощений фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, можно вводить внутривенно, внутриартериально, подкожно, внутрикожно или внутримышечно. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция разработана для местного введения или системного введения. Системное введение может включать энтеральное введение, которое включает абсорбцию через желудочно-кишечный тракт, или парентеральное введение. Как он используется в настоящем документе, термин «парентеральное введение» относится к введению любым способом, отличным от желудочно-кишечного тракта, например, путем внутривенной инъекции. В предпочтительном воплощении фармацевтическая композиция составлена для внутримышечного введения. В другом воплощении фармацевтическая композиция составлена для системного введения, например, для внутривенного введения.

Термин «совместное введение», как он используется в настоящем документе, означает процесс, посредством которого различные соединения или композиции, такие как РНК, кодирующая активирующее соединение, РНК, кодирующая соединение-ярлык, и необязательно иммунные эффекторные клетки вводятся одному и тому же пациенту. Различные соединения или композиции можно вводить одновременно, по существу, в одно и то же время или последовательно.

Лечение

Агенты, композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения субъекта с заболеванием, например, заболеванием, характеризующимся наличием пораженных клеток, экспрессирующих антиген (который может служить первичной мишенью). Особенно раковые заболевания представляют собой предпочтительные заболевания. Например, если антиген получен из вируса, агенты, композиции и способы могут быть полезны при лечении вирусного заболевания, вызванного указанным вирусом. Если антиген представляет собой опухолевый антиген, агенты, композиции и способы могут быть полезны при лечении ракового заболевания,

при котором раковые клетки экспрессируют указанный опухолевый антиген.

Описанные в настоящем документе агенты, композиции и способы можно применять при терапевтическом или профилактическом лечении различных заболеваний. В одном из воплощений агенты, композиции и способы, описанные в настоящем документе, полезны при профилактическом и/или терапевтическом лечении заболевания, связанного с антигеном.

Описанные в настоящем документе способы и агенты, в частности, полезны для лечения заболеваний, характеризующихся пораженными клетками, экспрессирующими антиген, на который направлено соединение, например, опухолевый антиген. Клетки могут экспрессировать антиген на клеточной поверхности для распознавания соединения-ярлыка. Способы могут обеспечивать селективное уничтожение таких клеток, экспрессирующих антиген, тем самым сводя к минимуму неблагоприятные воздействия на нормальные клетки, не экспрессирующие антиген. Иммунные эффекторный клетки, генетически модифицированные для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), нацеленного на клетки путем связывания с соединением-ярлыком, предоставляют субъекту, например, путем введения субъекту генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток или создания генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток в предмет.

В одном из воплощений описанные в настоящем документе иммунные эффекторные клетки представляют собой Т-клетки. В одном из воплощений иммунные эффекторные клетки направлены против опухоли или рака. В одном из воплощений популяция клеток-мишеней или ткань-мишень представляет собой опухолевые клетки или опухолевую ткань, в частности, солидную опухоль. В одном из воплощений выделенный антиген (первичная мишень) представляет собой опухолевый антиген.

В одном аспекте настоящее изобретение в целом охватывает лечение заболеваний путем воздействия на клетки, экспрессирующие антиген, такие как пораженные клетки, в частности, раковые клетки, экспрессирующие опухолевый антиген. В одном из воплощений раковые клетки или раковая ткань представляют собой солидный рак. Клетки-мишени могут экспрессировать антиген на поверхности клетки. В одном из воплощений антиген представляет собой опухолеассоциированный антиген, а заболеванием представляет собой рак. Такое лечение обеспечивает селективное уничтожение клеток, экспрессирующих антиген, тем самым сводя к минимуму неблагоприятное воздействие на нормальные клетки, не экспрессирующие антиген.

В одном из воплощений иммунные эффекторные клетки, генетически модифицированные для экспрессии CAR, предоставляются субъекту в

субтерапевтических количествах.

Термин «заболевание» относится к аномальному состоянию, которое поражает организм человека. Заболевание часто истолковывается как медицинское состояние, связанное с конкретными симптомами и признаками. Заболевание может быть вызвано факторами, исходящими из внешнего источника, такими как инфекционное заболевание, или оно может быть вызвано внутренними дисфункциями, такими как аутоиммунные заболевания. У людей термин «болезнь» часто применяют в более широком смысле для обозначения любого состояния, которое вызывает боль, дисфункцию, дистресс, социальные проблемы или смерть пострадавшего человека или аналогичные проблемы для тех, кто находится в контакте с этим человеком. В этом более широком смысле оно иногда включает травмы, инвалидность, расстройства, синдромы, инфекции, выделенные симптомы, девиантное поведение и атипичные изменения структуры и функции, тогда как в других контекстах и для других целей их можно считать отдельными категориями. Болезни обычно поражают людей не только физически, но и эмоционально, поскольку при многих заболеваниях могут измениться взгляд на жизнь и изменить личность.

В настоящем контексте термин «лечение», «врачевание» или «терапевтическое вмешательство» относится к ведению и уходу за субъектом с целью борьбы с таким состоянием, как заболевание или расстройство. Термин предназначен для включения полного спектра лечения данного состояния, от которого страдает субъект, такого как введение терапевтически эффективного соединения для облегчения симптомов или осложнений, для задержки прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, для смягчения или облегчения симптомов и осложнений и/или излечения или устранения заболевания, расстройства или состояния, а также для предотвращения состояния, при этом профилактику следует понимать как ведение индивидуума и уход за индивидуумом с целью борьбы с заболеванием, состоянием или расстройством, и она включает введение активных соединений для предотвращения появления симптомов или осложнений.

Термин «терапевтическое лечение» относится к любому лечению, которое улучшает состояние здоровья и/или продлевает (увеличивает) продолжительность жизни индивидуума. Указанное лечение может устранить заболевание у индивидуума, остановить или замедлить развитие заболевания у индивидуума, ингибировать или замедлить развитие заболевания у индивидуума, уменьшить частоту или тяжесть симптомов у индивидуума и/или уменьшить рецидив у индивидуума, который в настоящее время страдает или ранее перенес заболевание.

Термины «профилактическое лечение» или «превентивное лечение» относятся к любому лечению, которое предназначено для предотвращения возникновения

заболевания у индивидуума. Термины «профилактическое лечение» или «профилактическое лечение» применяют в настоящем документе взаимозаменяемо.

Термины «индивидуум» и «субъект» применяют в настоящем документе взаимозаменяемо. Они относятся к человеку или другому млекопитающему (например, мышь, крысе, кролику, собаке, кошке, крупному рогатому скоту, свинье, овце, лошади или примату), которое может быть поражено или восприимчиво к заболеванию или расстройству (например, раку), но может или может не иметь заболевания или расстройства. Во многих воплощениях индивидуум представляет собой человека. Если не указано иное, термины «индивидуум» и «субъект» не обозначают конкретный возраст и, таким образом, охватывают взрослых, пожилых людей, детей и новорожденных. В воплощениях настоящего изобретения «индивидуум» или «субъект» представляет собой «пациента».

Термин «пациент» означает индивидуума или субъекта, подлежащего лечению, в частности, больного индивидуума или субъекта.

В одном из воплощений изобретения цель состоит в том, чтобы доставить фармацевтически активный агент (включая соединения и клетки) в пораженные клетки, экспрессирующие антиген, такие как раковые клетки, экспрессирующие опухолевый антиген, и лечить заболевание, такое как раковое заболевание, включающее клетки, экспрессирующие антиген, такой как опухолевый антиген.

Термин «заболевание, связанное с антигеном», «заболевание, связанное с клетками, экспрессирующими антиген» или подобные термины относятся к любому заболеванию, которое связано с антигеном, например заболевание, характеризующееся наличием антигена. Заболевание, связанное с антигеном, может представлять собой инфекционное заболевание, или раковое заболевание, или просто рак. Как упоминалось выше, антиген может представлять собой антиген, ассоциированный с заболеванием, такой как антиген, ассоциированный с опухолью, вирусный антиген или бактериальный антиген. В одном из воплощений заболевание, связанное с антигеном, представляет собой заболевание, связанное с клетками, экспрессирующими антиген, предпочтительно на поверхности клетки.

Термин «инфекционное заболевание» относится к любому заболеванию, которое может передаваться от человека к человеку или от организма к организму и вызывает микробный агент (например, простуда). Инфекционные заболевания известны в данной области техники и включают, например, вирусное заболевание, бактериальное заболевание или паразитарное заболевание, причем заболевания вызывает вирус, бактерия и паразит, соответственно. В этом отношении инфекционное заболевание может

представлять собой, например, гепатит, заболевания, передающиеся половым путем (например, хламидиоз или гонорея), туберкулез, ВИЧ/синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), дифтерию, гепатит В, гепатит С, холеру, тяжелый острый респираторный синдром (SARS), птичий грипп и грипп.

Термины «раковое заболевание» или «рак» относятся к физиологическому состоянию или описывают физиологическое состояние индивидуума, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры раковых заболеваний включают, помимо прочего, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкемию. Более конкретно, примеры таких видов рака включают рак костей, рак крови, рак легких, рак печени, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную меланому, рак матки, рак яичников, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак простаты, рак матки, рак половых и репродуктивных органов, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, саркому мягких тканей, рак мочевого пузыря, рак почки, почечно-клеточный рак, рак почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), нейроэктодермальный рак, опухоли оси позвоночника, глиому, менингиому и аденому гипофиза. Термин «рак» согласно раскрытию также включает метастазы рака.

Термин «солидная опухоль» или «солидный рак», как он используется в настоящем документе, относится к проявлению раковой массы, что хорошо известно в данной области техники, например, в «Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th edition». Предпочтительно этот термин относится к раку или карциноме тканей организма, отличных от крови, предпочтительно отличных от крови, костного мозга и лимфоидной системы. Например, помимо прочего, солидные опухоли включают раки предстательной железы, рак легких, колоректальной ткани, мочевого пузыря, ткани ротоглотки/гортани, почек, молочной железы, эндометрия, яичников, шейки матки, желудка, поджелудочной железы, головного мозга и центральной нервной системы.

Описанные в настоящем документе способы и агенты, в частности, полезны для лечения рака, например, солидного рака, характеризующегося пораженными клетками, экспрессирующими антиген, на который направлено соединение-ярлык.

В одном из воплощений изобретения цель состоит в том, чтобы обеспечить иммунный ответ против пораженных клеток, экспрессирующих антиген, таких как раковые клетки, экспрессирующие опухолевый антиген, и лечить заболевание, такое как раковое заболевание, с участием клеток, экспрессирующих антиген, такой как опухолевый антиген.

Может возникнуть иммунный ответ против антигена, который может быть терапевтическим или частично или полностью защитным. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, применимы для индукции или усиления иммунного ответа. Таким образом, фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, полезны для профилактического и/или терапевтического лечения заболевания, связанного с антигеном.

Как он используется в настоящем документе, термин «иммунный ответ» относится к интегрированному ответу организма на антиген или клетку, экспрессирующую антиген, и относится к клеточному иммунному ответу и/или гуморальному иммунному ответу.

Подразумевается, что «клеточный иммунитет», «клеточный иммунитет», «клеточный иммунный ответ» или подобные термины включают клеточный ответ, направленный на клетки, характеризующиеся экспрессией антигена, в частности, характеризующиеся презентацией антигена класса I или класса МНС II. Клеточный ответ относится к клеткам, называемым Т-клетками или Т-лимфоцитами, которые действуют либо как «помощники», либо как «киллеры». Т-хелперы (также называемые CD4⁺ Т-клетками) играют центральную роль, регулируя иммунный ответ, а клетки-киллеры (также называемые цитотоксическими Т-клетками, цитолитическими Т-клетками, CD8⁺ Т-клетками или CTL) убивают пораженные клетки, такие как раковые клетки, предотвращая производство большего количества больных клеток.

Настоящее изобретение предполагает иммунный ответ, который может быть защитным, профилактическим, профилактическим и/или терапевтическим. Как применено в настоящем документе, выражение «индуцирует иммунный ответ [или индуцирование иммунного ответа]» может указывать на то, что до индукции не было иммунного ответа против определенного антигена, или это может указывать на то, что до индукции существовал базальный уровень иммунного ответа против определенного антигена, который усиливался после индукции. Следовательно, термин «индуцирует иммунный ответ [или индуцирование иммунного ответа]» включает термин «усиливает иммунный ответ [или усиление иммунного ответа]».

Термин «макрофаг» относится к подгруппе фагоцитирующих клеток, образующихся в результате дифференцировки моноцитов. Макрофаги, которые активируются воспалением, иммунными цитокинами или микробными продуктами, неспецифически поглощают и убивают чужеродные патогены внутри макрофагов путем гидролитической и окислительной атаки, приводящей к деградации патогена. Пептиды из деградированных белков отображаются на поверхности клеток макрофагов, где они могут быть распознаны Т-клетками и могут напрямую взаимодействовать с антителами на

поверхности В-клеток, что приводит к активации Т- и В-клеток и дальнейшей стимуляции иммунного ответа. Макрофаги относятся к классу антигенпредставляющих клеток. В одном из воплощений макрофаги представляют собой макрофаги селезенки.

Термин «дендритная клетка» (DC) относится к другому подтипу фагоцитирующих клеток, принадлежащему к классу антигенпредставляющих клеток. В одном из воплощений дендритные клетки происходят из гемопоэтических клеток-предшественников костного мозга. Эти клетки-предшественники первоначально трансформируются в незрелые дендритные клетки. Эти незрелые клетки характеризуются высокой фагоцитарной активностью и низким потенциалом активации Т-клеток. Незрелые дендритные клетки постоянно проверяют окружающую среду на наличие патогенов, таких как вирусы и бактерии. После контакта с презентруемым антигеном они активируются в зрелые дендритные клетки и начинают мигрировать в селезенку или лимфатический узел. Незрелые дендритные клетки фагоцитируют патогены и расщепляют их белки на мелкие кусочки, а после созревания представляют эти фрагменты на поверхности своих клеток с помощью молекул МНС. Одновременно они активируют рецепторы клеточной поверхности, которые действуют как корецепторы при активации Т-клеток, такие как CD80, CD86 и CD40, значительно повышая их способность активировать Т-клетки. Они также активируют CCR7, хемотаксический рецептор, который побуждает дендритные клетки перемещаться через кровоток в селезенку или через лимфатическую систему в лимфатический узел. В настоящем документе они действуют как антигенпрезентирующие клетки и активируют Т-хелперы и Т-киллеры, а также В-клетки, представляя им антигены наряду с неантигенспецифическими костимулирующими сигналами. Таким образом, дендритные клетки могут активно индуцировать иммунный ответ, связанный с Т- или В-клетками. В одном из воплощений дендритные клетки представляют собой дендритные клетки селезенки.

Термин «антигенпрезентирующая клетка» (APC) означает клетку из множества клеток, способную отображать, приобретать и/или презентировать, по меньшей мере один антиген или антигенный фрагмент на своей клеточной поверхности. Антигенпрезентирующие клетки можно разделить на профессиональные антигенпрезентирующие клетки и непрофессиональные антигенпрезентирующие клетки.

Термин «профессиональные антигенпрезентирующие клетки» относится к антигенпрезентирующим клеткам, которые конститутивно экспрессируют молекулы главного комплекса гистосовместимости класса II (МНС класса II), необходимые для взаимодействия с наивными Т-клетками. Если Т-клетка взаимодействует с комплексом молекул МНС класса II на мембране антигенпрезентирующей клетки, то

антигенпрезентирующая клетка продуцирует костимулирующую молекулу, индуцирующую активацию Т-клетки. Профессиональные антигенпрезентирующие клетки включают дендритные клетки и макрофаги.

Термин «непрофессиональные антигенпрезентирующие клетки» относится к антигенпрезентирующим клеткам, которые не экспрессируют конститутивно молекулы МНС класса II, но экспрессируют при стимуляции определенными цитокинами, такими как интерферон-гамма. Типичные непрофессиональные антигенпрезентирующие клетки включают фибробласты, эпителиальные клетки тимуса, эпителиальные клетки щитовидной железы, глиальные клетки, бета-клетки поджелудочной железы или эндотелиальные клетки сосудов.

«Процессинг антигена» относится к деградации антигена на продукты процессинга, которые представляют собой фрагменты указанного антигена (например, деградация белка на пептиды) и ассоциации одного или нескольких из этих фрагментов (например, посредством связывания) с молекулами МНС для презентации клетками, такими как антигенпрезентирующие клетки, специфическим Т-клеткам.

Цитирование документов и исследований, упомянутых в настоящем документе, не означает признания того, что что-либо из вышеизложенного относится к предшествующему уровню техники. Все утверждения относительно содержания этих документов основаны на информации, доступной заявителям, и не представляют собой признание правильности содержания этих документов.

Следующее описание представлено для того, чтобы дать возможность специалисту в данной области техники создавать и применять различные воплощения. Описания конкретных устройств, методик и приложений приведены только в качестве примеров. Различные модификации описанных в настоящем документе примеров будут легко очевидны специалистам в данной области техники, и общие принципы, определенные в настоящем документе, могут быть применены к другим примерам и применениям, не выходя за пределы сущности и объема различных воплощений. Таким образом, различные варианты осуществления не ограничиваются примерами, описанными и показанными в настоящем документе, но им должен быть предоставлен объем, соответствующий формуле изобретения.

Примеры

мРНК-конструкции

Все конструкции были созданы путем синтеза генов, включающих или кодирующих элементы последовательности, описанные ниже:

Элементы последовательности

Область	nt-последовательность	SEQ ID NO:	aa-Последовательность	SEQ ID NO:
IgG-лидер	ATGGACTGGATCTGGCGAATACTGTTTC TGGTGGGAGCCGCCACTGGGGCCCATTC T	35	MDWIWRILFLVGAAT GAHS	10
ALFA	CCTAGCAGGCTGGAGGAGGAACTCCGC AGACGGCTGACCGAATCC	36	PSRLEEELRRRLTEP	11
CD8 шарнир человека	ACTACTACCCACGACCTAGACCGCCTA CACCCGCACCCACTATCGCGTCTCAGCC CTTGAGTCTGCGGCCCGAGGCTTGTCCG CCCGCAGCTGGCGGGGCTGTGCATACCC GAGGACTCGACTTTGCATGCGACATCTA CATTTGGGCCCTCTGGCCGGCACTTGC GGCGTCCTTCTTCTGAGTCTGGTCATAA CGTTGTATTGC	37	TTTTAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVI TLYC	12
4-1BB домен человека	AAACGGGGCAGGAAGAACTGCTGTAT ATCTTCAAGCAGCCTTTCATGCGCCAG TTCAGACCACTCAGGAGGAGGATGGGT GTTCCCTGTCGTTTCCCTGAGGAAGAAGA AGGCGGGTGCGAATTG	38	KRGRKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCEL	13
Дзета-домен CD3 человека	AGGGTCAAGTTTAGCCGATCAGCTGAC GCCCCTGTTACAAACAGGGGCAAAAT CAGCTTTACAATGAGCTGAACCTCGGGC GTAGAGAGGAGTACGACGTGTTGGACA AGCGCAGAGGGAGAGATCCCGAGATGG GCGGCAAACCAAGACGCAAGAATCCCC AAGAAGGCCTCTACAACGAGCTGCAGA AGGATAAAATGGCCGAAGCCTATAGCG AGATTGGCATGAAAGGAGAACGGAGGA GAGGGAAAGGTCACGATGGACTCTACC AAGGCCTGAGCACAGCTACCAAAGACA CGTATGATGCCTTGACATGCAAGCACT GCCACCCAGGTAG	39	RVKFSRSADAPAYKQ GQNQLYNELNLGRRE EYDVLDRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDL YQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR*	14
G4S-линкер	GGAGGAGGCGGGAGC	40	GGGGS	15
TNFL9 (полная последовательность)	ATGGAGTATGCTAGCGATGCCTCTCTGG ACCCGGAAGCTCCATGGCCACCAGCTCC TAGGGCTCGCGCTTGGCGTGTGCTTCCT TGGGCCCTGGTGGCTGGCCTCCTGTTGC TGCTGCTGCTGGCTGCCGATGCGCTGT GTTCCCTCGCCTGTCCATGGGCGGTAAGT GGCGCGAGAGCCTCCTCGTTTCAGCCG CATCACCGAGGCTGAGGGAAGGGCCAG AGCTTAGCCCCGATGACCCTGCTGGGTT GCTCGACCTGAGACAGGGGATGTTTGGC CAGTTGGTAGCGCAGAACGTGCTGCTG ATCGACGGTCCCTTGAGCTGGTATTCCG ATCCCGGTCTTGCCGGAGTCAGCCTCAC TGGCGGCCTGAGTTACAAGGAGGACAC CAAGGAACTGGTGGTTGCCAAAGCCGG TGTCTACTACGTGTTCTTCCAGCTCGAA CTCAGGCGCGTGGTTGCAGGAGAGGGG TCAGGCTCTGTGAGTCTTGCCTTCATC TCCAGCCCCTGAGAAGCGCAGCCGGAG CCGCTGCACTGGCGCTGACCGTGATCT CCCACCCGCTCCTCCGAAGCCCGCAAT AGCGCTTTTGGCTTCCAAGGGCGACTGT TGCACCTGTCTGCAGGCCAACGGCTGGG AGTCCATCTGCACACGGAGGCCAGAGC ACGACACGCATGGCAGCTGACACAGGG	41	MEYASDASLDPEAPW PPAPRARACRVLPA LVAGLLLLLLAAAC AVFLACPWAVSGARA SPGSAASPRLREGPELS PDDPAGLLDLRQGMF AQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVVAKA GVYYVFFQLELRRV AGEGSGSVSLALHLQP LRSAAGAAALALTV LPPASSEARNSAFGFQ GRLHLASAGQRLGVH LHTEARARHAWQLTQ GATVGLFRVTPA GLPSRSE	16

	AGCCACTGTCCTGGGACTGTTTCGGGT ACACCCGAGATTCCTGCAGGCCTTCCCT CCCCTCGGTCCGAG			
сек-сигнал человека	ATGAGAGTGATGGCCCCAGAACCCTG ATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCTGGCCC TGACA GAGACATGGGCCCGGAAGC	42	MRVMAPRTLILLLSGA LALTETWAGS	17
(E _{A3} K) ₃ линкер	GAGGCGGCAGCTAAGGAAGCTGCTGCT AAAGAGGCTGCGGCTAAG	43	EAAAKEAAAKEAAAK	18
GPI-якорь (CD55 человека)	ССАААТАААГГААГТГГААССАСТТСА GGTACTACCCGTCTTCTATCTGGGCACA CGTGTTCACGTTGACAGGTTTGCTTGG GACGCTAGTAACCATGGGCTTGCTGACT TGA	44	PNKGSGTTSGTTRLLS GHTCFTLTGLLGTLVT MGLLT	19
IgG-лидер2	ATGGATTGGACTTGGCGGGTCTTTTGCC TGTTAGCAGTGGCCCCGGCGCTCATAG C	45	MDWTWRVFCLLAVA PGAHS	20
GS- линкер2	GGAGGAGGCGGGAGCGGGGGGTAGT	46	GGGSGGGGS	21
aCLDN6 VH	GAAGTTCAGCTGCAGCAGTCAGGGCCG GAACTGGTGAAACCCGGCGCTAGCATG AAGATCTCCTGTAAGGCGAGCGGGTATT CCTTTACCGGCTACACCATGAACCTGGT TAAGCAATCTCACGGCAAGAACCTTGA GTGGATAGGACTCATTAATCCTTACAAT GGCGGCACAATCTACAACCAGAAGTTC AAAGGCAAAGCAACCCTTACCGTGGAC AAGAGCAGCTCTACAGCCTATATGGAG CTGCTCTCACTGACGTCCGAGGATAGCG CAGTGTACTATTGTGCGCGGGATTACGG GTTTGTGCTGGATTATTGGGGACAGGGC ACCACACTGACCGTAAGCAGT	47	EVQLQQSGPELVKPG ASMKISCKASGYSFTG YTMNWVKQSHGKNL EWIGLINPYNGGTIYN QKFKGKATLTVDKSSS TAYMELLSLTSESAV YYCARDYGFVLDYW GQGTTLTVSS	22
aCLDN6 VL	GACATTGTCCTGACACAGAGTCCATCCA TTATGAGCGTGAGTCCTGGTGAAGGT TACAATCACCTGCAGTGCAAGCTCATCA GTGTCTTACATGCATTGGTTTCAGCAGA AGCCGGGAACTTCTCCTAAGCTGAGCAT CTACTCTACGAGCAATCTCGCCTCTGGT GTCCCAGCGAGGTTCTCAGGACGCGGG TCCGGGACTTCTATTCCCTCACAAATT CCAGGGTAGCCGCTGAAGATGCTGCCA CCTATTATTGCCAACAGCGCAGCAACTA CCCACCCTGGACATTCGGTGGTGGAAACA AAACTGGAGATTAAGCGGTCCGACCCA GCC	48	DIVLTQSPSIVSVSPGE KVTITCSASSSVSYMH WFQKPGTSPKLSIYS TSNLASGVPARFSGRG SGTSYSLTISRVAED AATYYCQQRSNYPWP TFGGGTKLEIKRSDPA	23
GS- линкер3	GGAGGCGGTGGAAGTGGCGGTGGAGGG TCAGGAGGTGGTGGATCT	49	GGGSGGGGSGGGGS	24
GS- линкер4	GGCGGCTCT	50	GGG	25
His-метка	CACCACCACCACATCAT	51	HHHHHH	26

Следующие белки, кодируемые конструкциями, которые будут применять в приведенных ниже примерах:

Название	Последовательность	состоит из SEQ ID NO:	SEQ ID NO:
Лидер-ALFA- CD8h-BBz- CAR	MDWIWRILFLVGAATGAHS PSRLEEELRRRLTEP TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE L	10, 11, 12,13, 14	27

	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR		
Лидер-ALFA- G4S-CD8h- BBz-CAR	MDWIWRILFLVGAATGAHS PSRLEEELRRRLTEP GGGGS TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCE L RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	10, 11, 15, 12,13, 14	28
Лидер- VHH(aALFA)- CD8h-BBz- CAR	MDWIWRILFLVGAATGAHS EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGVTISALNAMAMGWY RQAPGERRVMVAAVSERGNAMYRESVQGRFTVTRDFTNK MVSLQMDNLKPEDTAVYYCHVLEDRVDSFHDIYWGQGTQ VTVSSTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCE L RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	10, 9, 12,13, 14	29
Лидер- VHH(aALFA)- G4S-CD8h- BBz-CAR	MDWIWRILFLVGAATGAHS EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGVTISALNAMAMGWY RQAPGERRVMVAAVSERGNAMYRESVQGRFTVTRDFTNK MVSLQMDNLKPEDTAVYYCHVLEDRVDSFHDIYWGQGTQ VTVSS GGGGS TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCE L RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	10, 9, 15, 12,13, 14	30
TNFL9-ALFA	MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLLLL LAAACAVFLACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDP AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSV SLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGR LLHLSAQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVVLGLFRVTP EIPAGLPSRSE PSRLEEELRRRLTE	16, 11	31
чел-сек-ALFA- (EA3K)3-GPI	MRVMAPRTLILLSGALALTETWAGS SRLEEELRRRLTEP EAAAKEAAAKEAAK PNKGGSTTSGTTRLLSGHTCFTLTGLLGTLVTMGLLT	17, 5, Pro, 18, 19	32
чел-сек- VHH(aALFA)- (EA3K)3-GPI	MRVMAPRTLILLSGALALTETWAGS EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGVTISALNAMAMGWY RQAPGERRVMVAAVSERGNAMYRESVQGRFTVTRDFTNK MVSLQMDNLKPEDTAVYYCHVLEDRVDSFHDIYWGQGTQ VTVSSAAAKEAAAKEAAK PNKGGSTTSGTTRLLSGHTCFTLTGLLGTLVTMGLLT	17, 9, 18, 19	33
Лидер2-ALFA- VH/VL(aCLDN 6)-His	MDWTWRVFCLLAVAPGAHS PSRLEEELRRRLTEP GGSGGGS EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQS HGKNLEWIGLINPYNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAY MELLSLTSEDSAVYYCARDYGFVLDYWGQGTTLTVSS GGSGGGSGGGS	20, 11, 21,22,24, 23,25, 26	34

	<u>DIVLTQSPSIVSPGKEVTITCSASSSVSYMHWFQKPGTS</u> <u>PKLSIYSTSNLASGVPARFSGRSGTSYSLTISRVAEEDAAT</u> <u>YYCQQRSNYPPWTFGGGTKLEIKRSDPA</u> GGG HHHHH		
--	---	--	--

Пример 1: Универсальный подход CART

В этом примере, проиллюстрированном на фигуре 1, генерируют CAR-T-клетки, в которых улавливатель слит в качестве домена узнавания с шарнирным, трансмембранным и внутриклеточным сигнальным доменом химерного антигенного рецептора. Чтобы снизить затраты и обеспечить быструю доставку пациентам, для этой цели предпочтительны аллогенные CAR-T-клетки, которые можно получить с помощью традиционных способов, таких как генно-инженерное истощение $\alpha\beta$ -T-клеток. Обычные CAR-T-клетки вводят пациенту, где их можно амплифицировать с помощью мРНК, полученной в липосомах, кодирующей CAR-специфическую метку, слитую с доменом белка, закрепляющегося на мембране, на основе нашего недавно опубликованного подхода CARVAC (Reinhard et al., 2020). В качестве второго компонента можно применять опухолеспецифический нацеливающий лиганд, например, анти-CLDN6 scFv, который сливают с последовательностью метки и вводят пациенту в виде РНК, инкапсулированной в липидные наночастицы. Липидные наночастицы поглощаются клетками печени, которые затем экспрессируют биспецифический слитый белок и высвобождают его в кровотоке. Нацеливающий лиганд накапливается в месте опухоли, где, в конечном итоге, обычные CAR-T-клетки могут связаться и опосредовать уничтожение опухолевых клеток. Описанная процедура теоретически универсально применима для различных опухолевых антигенов и в принципе может повысить эффективность, а также обеспечить одновременное нацеливание на несколько антигенов путем обеспечения смеси РНК, кодирующих различные нацеливающие лиганды. Безопасная персистенция CAR-T-клеток в отсутствие нацеливающего лиганда представляет собой еще одно важное преимущество этого подхода. Это позволяет приостановить терапию без истощения CAR-T-клеток, если элиминированы все опухолевые клетки, и параллельно дает возможность продолжить терапию с применением того же или другого нацеливающего лиганда в случае рецидива опухоли.

Пример 2. Модульный CAR-T в клетках Jurkat

T-клетки Jurkat были сконструированы с мРНК, кодирующей модульный CAR, и проанализированы через 24 часа с помощью проточной цитометрии. Растворимые модульные адаптеры CAR были получены из клеток, трансфицированных нуклеиновыми кислотами. Модульные клетки CAR Jurkat снабжали 1 или 10 нМ растворимым адаптером и контрастировали с антителом, специфичным для адаптера (антиидиотипическое

антитело против антитела aCLDN6), чтобы обнаружить связывание адаптера с модульным CAR. CAR, связанные с адаптером, детектировали с помощью проточной цитометрии. В качестве контроля применяли ложные клетки Jurkat (нетрансфицированные мРНК), в которых адаптерный фрагмент на поверхности клеток не обнаруживался. Адаптеры обнаруживали на поверхности линии Т-клеток, модифицированной для экспрессии модульного CAR (VHH(aALFA)-G4S-CAR, SEQ ID NO: 30). Примененный диапазон доз показывает, что модульные CAR-Т-клетки могут эффективно связывать адаптеры при низких дозах (1 нМ, % клеток, связывающих адаптер), а интенсивность связывания (MFI) может быть увеличена при более высоких дозах адаптера. В этом эксперименте применяли формат адаптера ALFA-VH-VL (SEQ ID NO: 34). На фигуре 2 показана сборка CAR и адаптера.

Пример 3: Модульный CAR-Т в первичных клетках

Первичные Т-клетки человека активировали в течение 5 дней с применением агонистических антител против CD3 и затем трансфицировали модульной мРНК, кодирующей CAR (VHH(aALFA)-G4S-CAR, SEQ ID NO: 30). Молекулы CAR окрашивали через 24 часа меченым пептидом ALFA. Экспрессию обнаруживали с применением методологии проточной цитометрии. На фигуре 3 показано, что CAR хорошо экспрессируется в первичных Т-клетках человека (39,5%).

Параллельно, первичные клетки, активированные и трансфицированные, как описано выше, снабжали 100 нМ растворимым адаптером, генерируемым клетками, трансфицированными нуклеиновой кислотой, и через 24 часа окрашивали специфичным к адаптеру антителом. Процент адаптера, связанного с CAR, оценивали с помощью проточной цитометрии. Адаптер связывает модульный CAR, экспрессируемый на поверхности сконструированных первичных Т-клеток человека (12,4% для 100 нМ адаптера). В этом эксперименте применяли формат адаптера ALFA-VH-VL-His-Tag (SEQ ID NO: 34). На фигуре 4 показано, что модульный CAR собран. Сниженное обнаружение адаптера по сравнению с фигурой 2 основано на доступности домена VH-VL, который в настоящем документе окружен 2 метками.

Пример 4: Модульные клетки CAR-Т опосредуют лизис опухолевых клеток

Антиген-положительные опухолевые клетки высевали на Е-планшеты (ACEA) и инкубировали в течение 24-х часов перед совместным культивированием. Активированные первичные Т-клетки человека, сконструированные для экспрессии модульного CAR (смотри фигуру 3), были оснащены через 24 часа после трансфекции растворимым 10 нМ или 100 нМ адаптером, генерируемым клетками, трансфицированными нуклеиновой кислотой. Оснащенные модульные клетки CAR-Т

совместно культивировали с опухолевыми клетками при соотношении эффектора к мишени 10:1. Неоснащенные модульные клетки CAR-T применяли в качестве отрицательного контроля. Лизис опухолевых клеток оценивали в течение 27 часов с применением методологии, основанной на импедансе, в системе xCELLigence. Цитотоксичность нормализовали для Т-клеток, не трансфицированных мРНК, и рассчитывали относительно максимального лизиса, достигнутого Тритоном-Х.

Неоснащенные модульные CAR-T-клетки не индуцировали цитотоксический лизис опухолевых клеток, экспрессирующих антиген. Модульные клетки CAR-T, оснащенные адаптером, способствуют сильной цитолитической активности. На фигуре 5 показано уничтожение опухолевых клеток в зависимости от дозы адаптера.

Пример 5. Пролиферация модульных CAR-T-клеток, индуцированная универсальным ALFA-пептидом, содержащим мРНК, трансфицированными нДК

Незрелые дендритные клетки человека (нДК) дифференцировали от CD14-положительных клеток с помощью ГМ-КСФ и ИЛ-4. нДК трансфицировали мРНК, кодирующей мембранно-связывающий фрагмент (CARVac). Аутологичные Т-клетки трансфицировали модульной мРНК, кодирующей CAR, и окрашивали пролиферирующим красителем бриллиантовым фиолетовым. Модульные клетки CAR-T и нДК, экспрессирующие CARVac, совместно культивировали в течение 4-х дней при соотношении эффектора к мишени 10:1. Пролиферацию модульных клеток CAR-T оценивали по снижению пролиферационного красителя в дочерних поколениях с применением методологии проточной цитометрии. нДК, трансфицированные ложной мРНК, служили отрицательным контролем (контроль). На фигурах 6А и В заякоренный в мембране связывающий фрагмент, экспрессируемый на нДК, включает пептид ALFA, тогда как CAR включает анти-ALFA VHH. На фигурах 6С и D заякоренный в мембране связывающий фрагмент, экспрессируемый на нДК, включает анти-ALFA VHH, тогда как CAR включает пептид ALFA.

В то время как модульные CAR-T-клетки не пролиферировали против контрольных нДК, Т-клетки VHH(aALFA) CAR (SEQ ID NO: 30), а также аналогичные VHH(aALFA)PE-CAR показали выраженную пролиферацию против содержащих ALFA-пептид конструкций CARVac (фигура 6 А и Б). В настоящем документе мишень модульного CAR экспрессировали на поверхности антигенпредставляющих клеток с применением двух разных каркасов для трансмембранного закрепления. Якорь TNFL9 (SEQ ID NO: 31) или якорь (EA3K)GPI (SEQ ID NO: 32). На фигурах 6С и D модульные CAR (SEQ ID NO: 27 и 28) способствуют заметной пролиферации против VHH-содержащей конструкции, представленной нДК (SEQ ID NO: 33).

Пример 6: Модульные ALFA CAR-T, нагруженные CD19-специфичными адаптерами, опосредуют пролиферацию против трансфицированных CD19 нДК или первичных В-клеток человека

Первичные Т-клетки человека были созданы для экспрессии ALFA CAR и помечены красителем для оценки пролиферации бриллиантовым фиолетовым. Затем их совместно инкубировали либо с первичными В-клетками человека (слева), либо с аутологичными нДК, трансфицированными мРНК, кодирующей CD19, в течение 4 дней в присутствии 0, 1 или 10 нМ адаптера (nbALFA/VHH(aALFA)-antiCD19(FMC63)), полученного из клеток-продуцентов нуклеиновой кислоты. В случае В-клеток соотношение эффектора и мишени варьировали от 10:1, 1:1 до 1:10. В случае нДК в качестве клеток-мишеней соотношение Е:Т составляло 10:1. Частоту пролиферации CAR-T-клеток отображали после получения и анализа с помощью проточного цитометра.

Как видно на фигуре 7, пролиферация сконструированных Т-клеток ALFA-CAR требует присутствия адаптера, а также клеток-мишеней, экспрессирующих мишень CD19.

Обратите внимание, что в этом примере адаптер состоит из антигенсвязывающего домена VHH(aALFA), связанного с антигенсвязывающим доменом scFv.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или состоянием, характеризующимся клетками, экспрессирующими целевой антиген, включающий:

(i) предоставление субъекту иммунных эффекторных клеток, генетически модифицированных для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR);

(ii) введение субъекту первой РНК, кодирующей первый пептид или полипептид, в котором первый пептид или полипептид включает связывающий фрагмент для CAR;

(iii) обеспечение экспрессии первого пептида или полипептида антигенпрезентирующими клетками у субъекта таким образом, чтобы связывающий фрагмент CAR был доступен для связывания иммунными эффекторными клетками, причем указанное связывание приводит к размножению иммунных эффекторных клеток;

(iv) введение субъекту второй РНК, кодирующей второй пептид или полипептид, в котором второй пептид или полипептид включает связывающий фрагмент, связывающийся с целевым антигеном, и связывающий фрагмент для CAR; и

(v) обеспечение экспрессии второго пептида или полипептида клетками субъекта, так что второй пептид или полипептид становится связанным с клетками, экспрессирующими целевой антиген, и связывающий фрагмент CAR становится доступным для связывания иммунными эффекторными клетками.

2. Способ по п. 1, в котором антигенпрезентирующие клетки трансфицируют первой РНК.

3. Способ по п. 1 или 2, в котором первую РНК вводят в виде дисперсной композиции, такой как липоплексные частицы.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором клетки, экспрессирующие второй пептид или полипептид, трансфицируют второй РНК.

5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором вторую РНК вводят в виде дисперсной композиции, например, в виде липидных наночастиц.

6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором антигенпрезентирующие клетки экспрессируют первый пептид или полипептид так, что он остается связанным с антигенпрезентирующими клетками.

7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором первый пептид или полипептид представляет собой мембранный пептид или полипептид.

8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором первый пептид или полипептид представляет собой слитый белок фрагмента, связывающего CAR, и мембранного пептида

или полипептида.

9. Способ по любому из пп. 1-8, в котором связывание иммунных эффекторных клеток со вторым пептидом или полипептидом, связанным с клетками, экспрессирующими целевой антиген, приводит к уничтожению клеток, экспрессирующих целевой антиген.

10. Способ по любому из пп. 1-9, в котором клетки, экспрессирующие второй пептид или полипептид, секретируют второй пептид или полипептид.

11. Способ по любому из пп. 1-10, в котором клетки, экспрессирующие второй пептид или полипептид, экспрессируют второй пептид или полипептид так, что он высвобождается в кровоток.

12. Способ по любому из пп. 1-11, в котором целевой антиген представляет собой антиген клеточной поверхности.

13. Способ по любому из пп. 1-12, в котором второй пептид или полипептид представляет собой слитый пептид или полипептид связывающего фрагмента, связывающегося с целевым антигеном и со связывающим фрагментом для CAR.

14. Способ по любому из пп. 1-13, в котором связывающая группировка, связывающаяся с целевым антигеном, включает антитело или производное антитела.

15. Способ по любому из пп. 1-14, в котором связывающая группировка для CAR включает пептидную метку.

16. Способ по любому из пп. 1-16, в котором CAR включает антитело или производное антитела.

17. Способ по любому из пп. 14-16, в котором производное антитела представляет собой фрагмент антитела.

18. Способ по любому из пп. 1-17, в котором способ включает введение субъекту иммунных эффекторных клеток, генетически модифицированных для экспрессии CAR.

19. Способ по любому из пп. 1-17, в котором способ включает создание иммунных эффекторных клеток, генетически модифицированных для экспрессии CAR у субъекта.

20. Способ по любому из пп. 1-19, в котором заболевание, расстройство или состояние представляет собой рак.

21. Способ по любому из пп. 1-20, в котором клетки, экспрессирующие целевой антиген, представляют собой пораженные клетки.

22. Способ по любому из пп. 1-21, в котором клетки, экспрессирующие целевой антиген, представляют собой раковые клетки.

23. Способ по любому из пп. 1-22, в котором целевой антиген представляет собой опухолевый антиген.

24. Способ лечения субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или состоянием, характеризующимся клетками, экспрессирующими целевой антиген, включающий:

(i) предоставление субъекту иммунных эффекторных клеток, генетически модифицированных для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), связывающегося с пептидной меткой;

(ii) введение субъекту первой РНК, кодирующей первый пептид или полипептид, так что первый пептид или полипептид экспрессируется в антигенпредставляющих клетках субъекта, при этом первый пептид или полипептид представляет собой мембранный белок, который включает во внеклеточном домене пептидную метку, с которой связывается CAR; и

(iii) введение субъекту второй РНК, кодирующей второй пептид или полипептид, так что второй пептид или полипептид экспрессируется и секретируется клетками субъекта, в котором второй пептид или полипептид включает связывающий фрагмент, связывающийся с антигеном, и пептидную метку, с которой связывается CAR.

25. Способ по п. 24, в котором связывание иммунных эффекторных клеток с первым пептидом или полипептидом приводит к размножению иммунных эффекторных клеток.

26. Способ по п. 24 или 25, в котором связывание иммунных эффекторных клеток со вторым пептидом или полипептидом, связанным с целевым антигеном, приводит к уничтожению клеток, экспрессирующих целевой антиген.

27. Способ по любому из пп. 24-26, в котором антигенпрезентирующие клетки трансфицируют первой РНК.

28. Способ по любому из пп. 24-27, в котором первую РНК вводят в виде дисперсной композиции, например, в виде частиц липоплекса.

29. Способ по любому из пп. 24-28, в котором клетки, экспрессирующие второй пептид или полипептид, трансфицируют второй РНК.

30. Способ по любому из пп. 24-29, в котором вторую РНК вводят в виде дисперсной композиции, например, в виде липидных наночастиц.

31. Способ по любому из пп. 24-30, в котором антигенпрезентирующие клетки экспрессируют первый пептид или полипептид так, что он остается связанным с антигенпрезентирующими клетками.

32. Способ по любому из пп. 24-31, в котором первый пептид или полипептид представляет собой слитый белок пептидной метки, с которой связывается CAR, и мембранного пептида или полипептида.

33. Способ по любому из пп. 24-32, в котором второй пептид или полипептид секретируется в кровоток.

34. Способ по любому из пп. 24-33, в котором целевой антиген представляет собой антиген клеточной поверхности.

35. Способ по любому из пп. 24-34, в котором второй пептид или полипептид представляет собой слитый пептид или полипептид связывающей части, связывающийся с целевым антигеном, и пептидной метки, с которой связывается CAR.

36. Способ по любому из пп. 24-35, в котором связывающая группа, связывающаяся с целевым антигеном, включает антитело или производное антитела.

37. Способ по любому из пп. 24-36, в котором CAR включает антитело или производное антитела.

38. Способ по п. 36 от 37, в котором производное антитела представляет собой фрагмент антитела.

39. Способ по любому из пп. 24-38, в котором способ включает введение субъекту иммунных эффекторных клеток, генетически модифицированных для экспрессии CAR.

40. Способ по любому из пп. 24-38, в котором способ включает генерацию у субъекта иммунных эффекторных клеток, генетически модифицированных для экспрессии CAR.

41. Способ по любому из пп. 24-40, в котором заболевание, расстройство или состояние представляет собой рак.

42. Способ по любому из пп. 24-41, в котором клетки, экспрессирующие целевой антиген, представляют собой пораженные клетки.

43. Способ по любому из пп. 24-42, в котором клетки, экспрессирующие целевой антиген, представляют собой раковые клетки.

44. Способ по любому из пп. 24-43, в котором целевой антиген представляет собой опухолевый антиген.

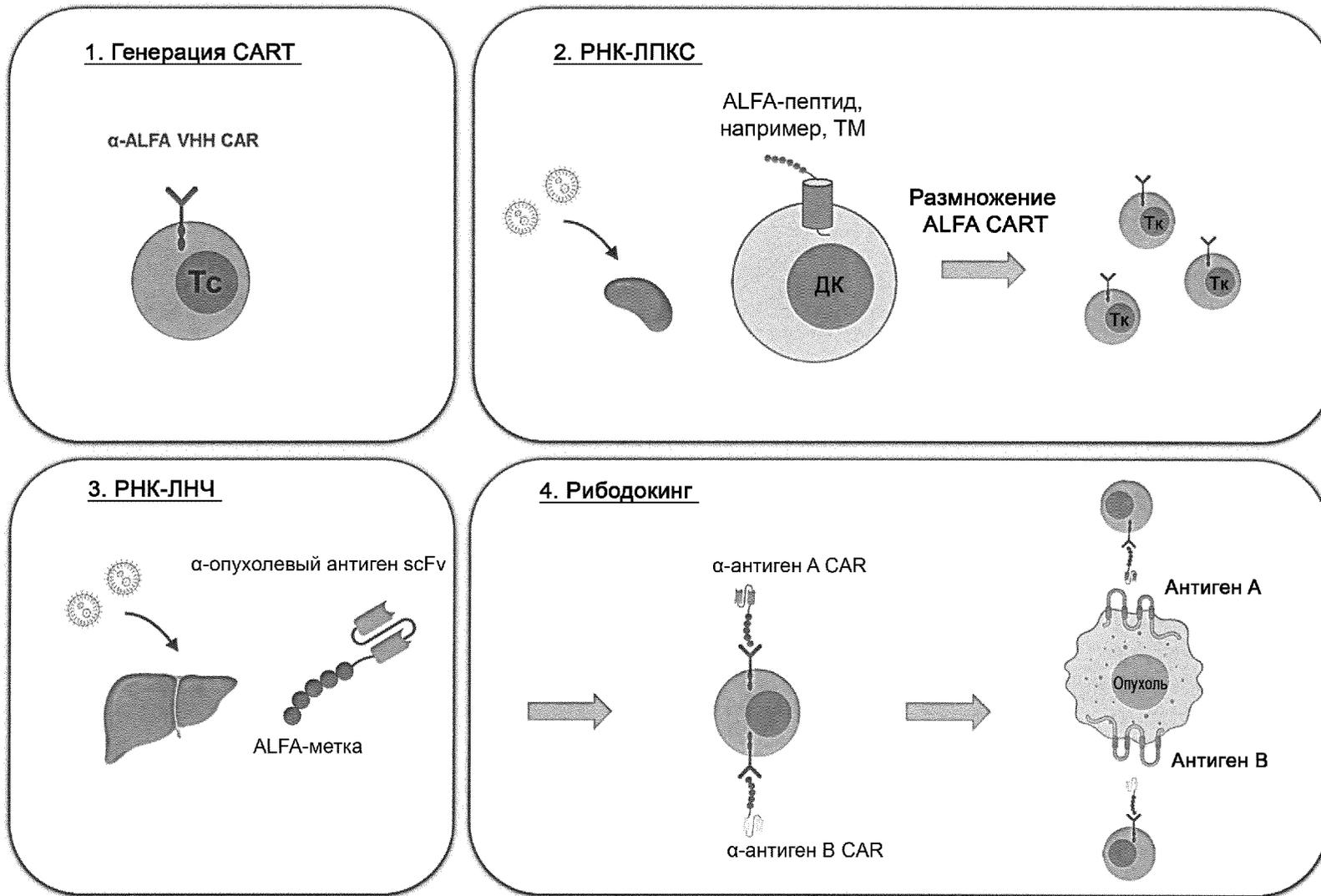
45. Набор, включающий:

(i) нуклеиновую кислоту для генетической модификации иммунных эффекторных клеток для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), связывающегося с пептидной меткой, или иммунные эффекторные клетки, генетически модифицированные для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), связывающегося с пептидной меткой;

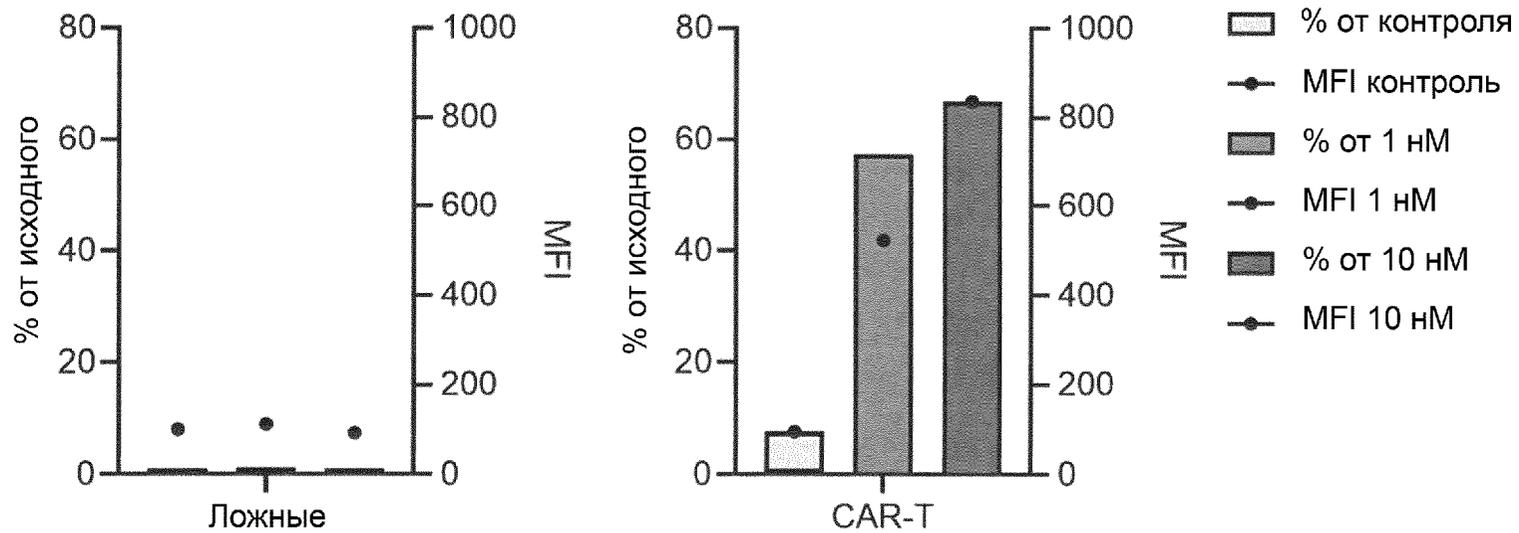
(ii) первую РНК, кодирующую первый пептид или полипептид, который представляет собой мембранный белок, который включает во внеклеточном домене пептидную метку, с которой связывается CAR, или нуклеиновую кислоту для получения

указанной первой РНК; и необязательно

(iii) вторую РНК, кодирующую второй пептид или полипептид, которая включает связывающий фрагмент, связывающийся с целевым антигеном, и пептидную метку, с которой связывается CAR, или нуклеиновую кислоту для получения указанной второй РНК.

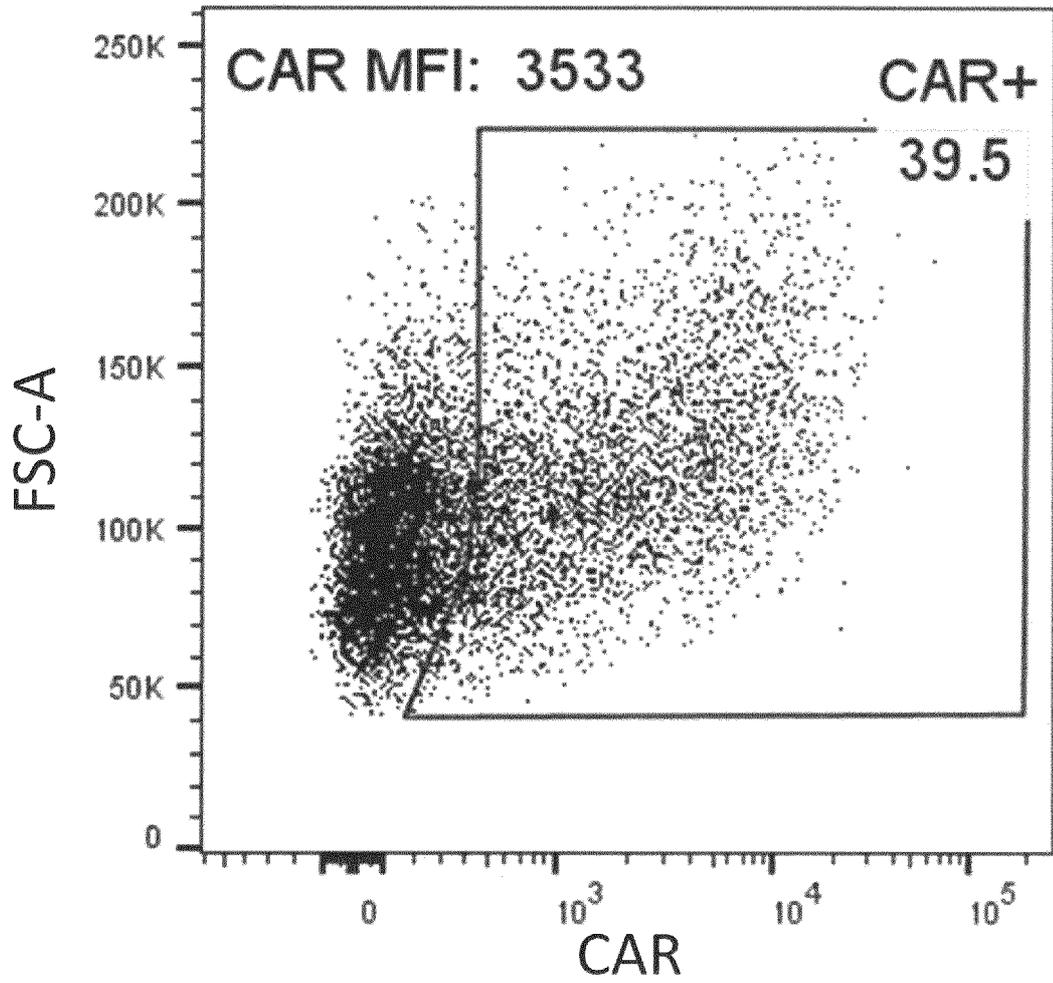


Фиг. 1



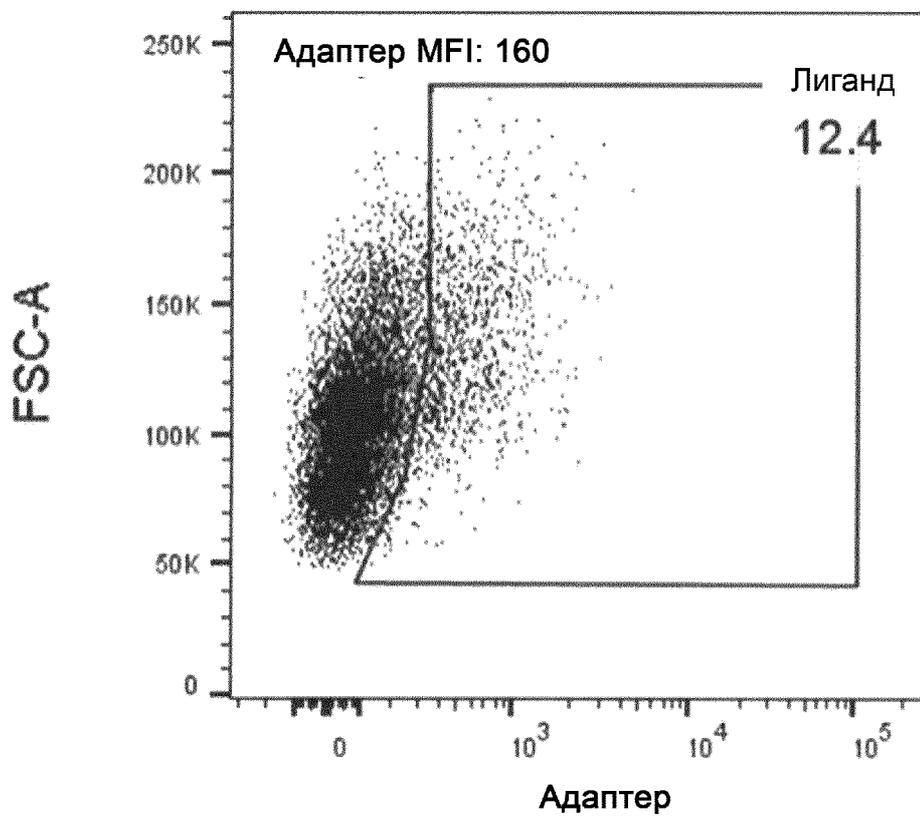
Фиг. 2

Экспрессия VHH(aALFA)-G₄S-CAR



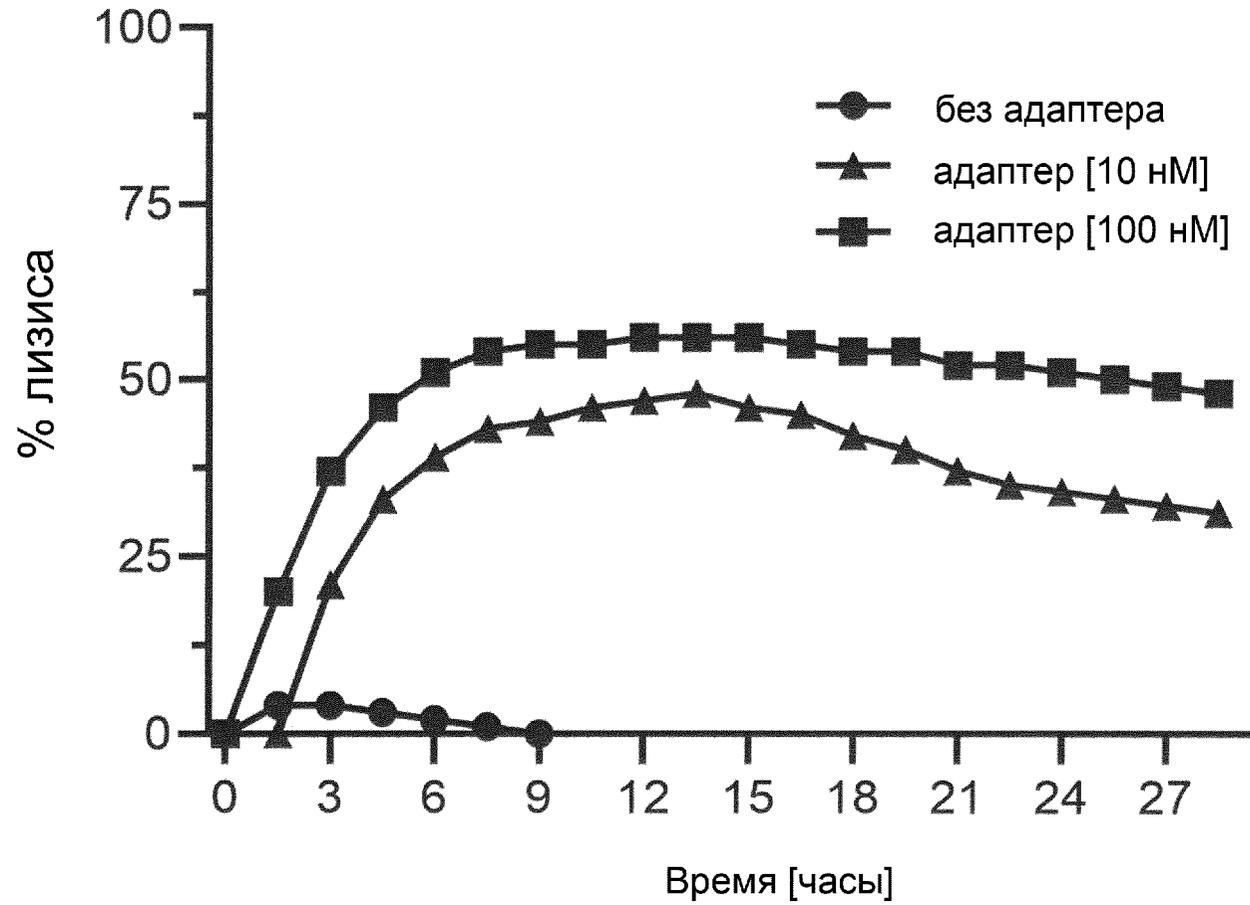
Фиг. 3

Связывание адаптера с клетками CAR-T



Фиг. 4

Уничтожение опухолевых клеток Ag⁺



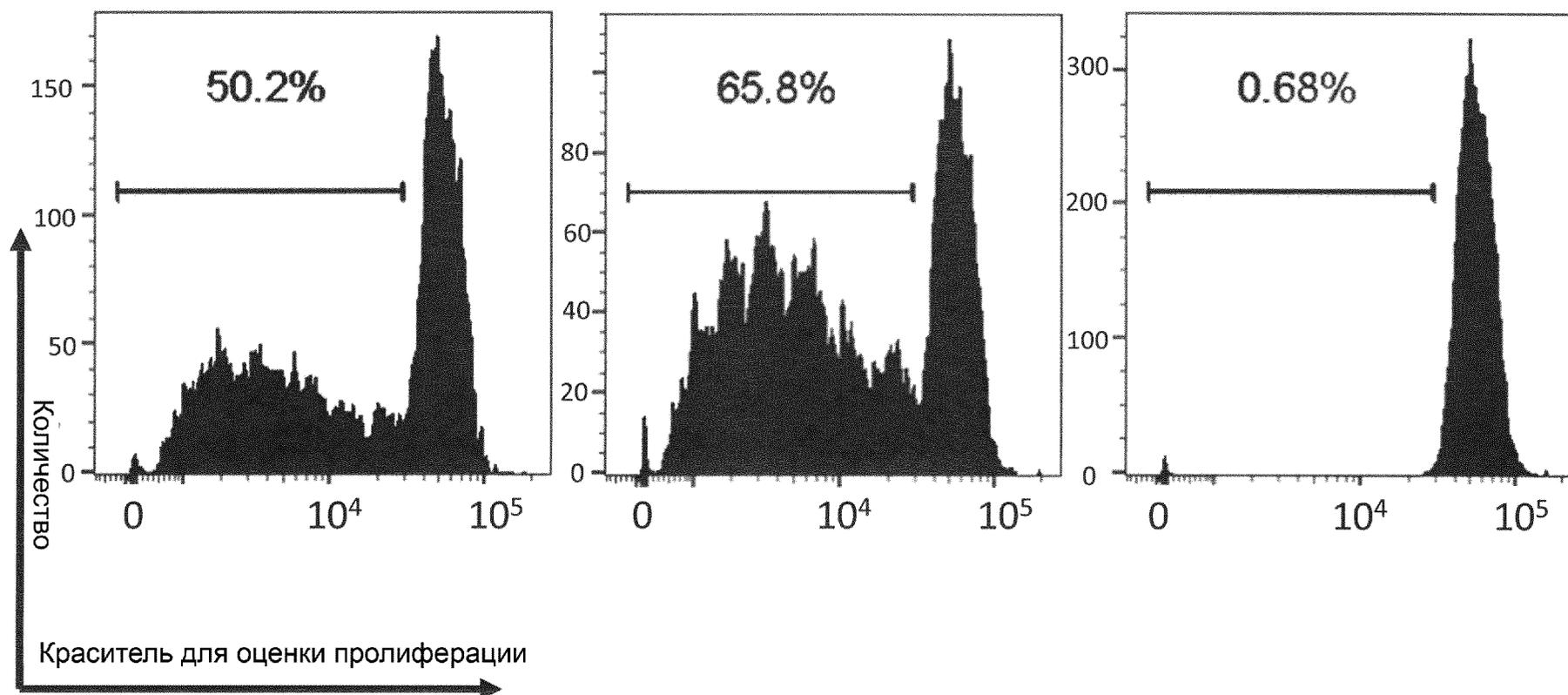
Фиг. 5

VHH(aALFA)^{PE}-CAR

TNFL9-ALFA

ALFA-(EA₃K)₃GPI

Контроль



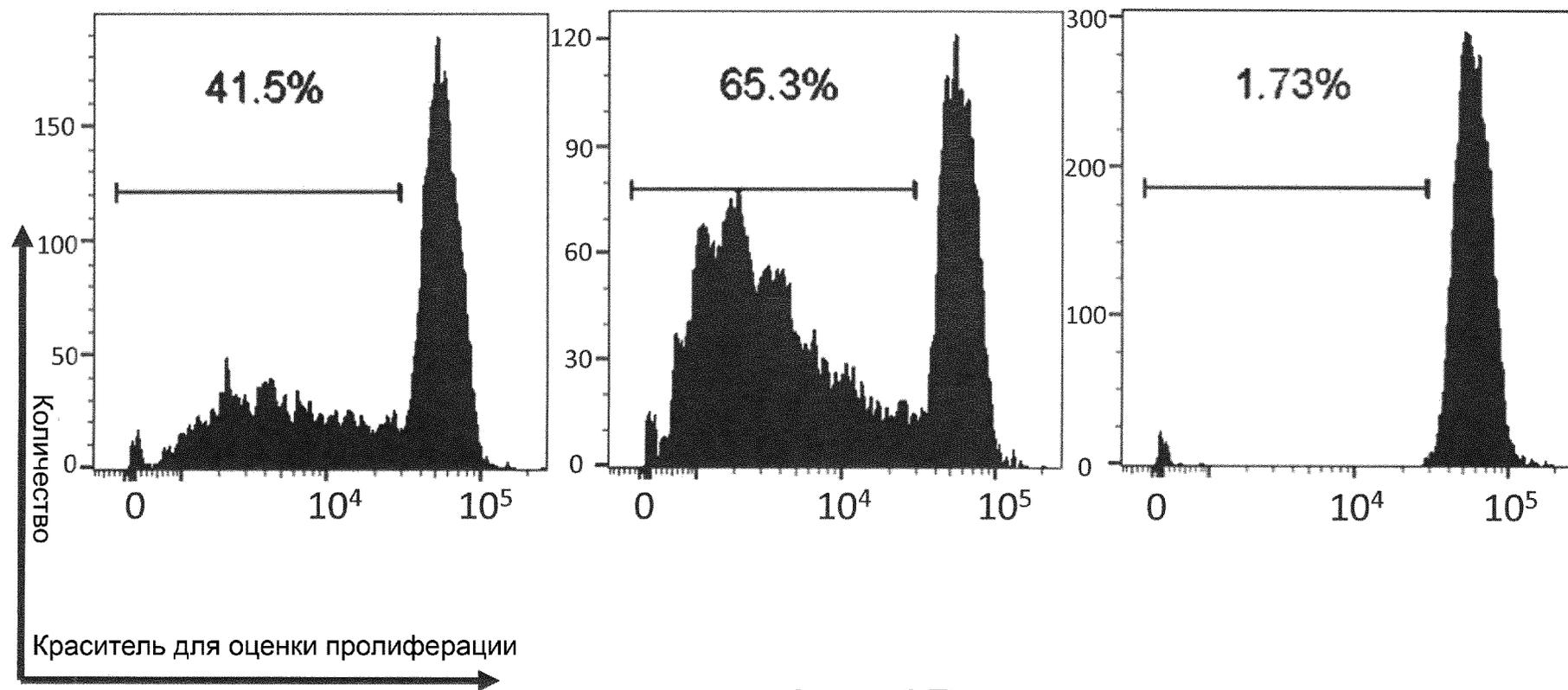
Фиг. 6А

VHH (αALFA)-CAR

TNFL9-ALFA

ALFA-(EA₃K)₃GPI

Контроль

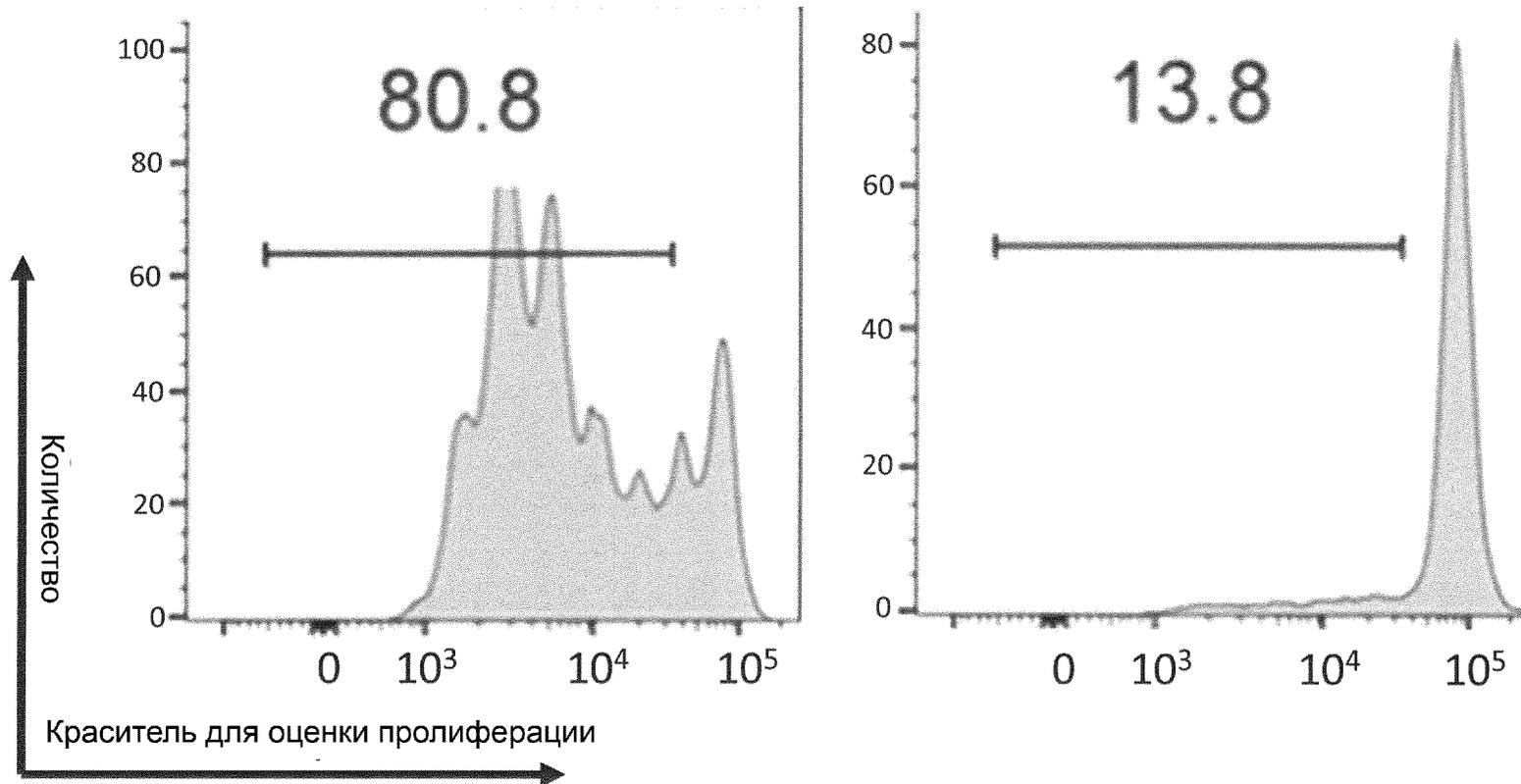


Фиг. 6В

ALFA-CAR

VHH(α ALFA)-(EA₃K)₃GPI

Контроль



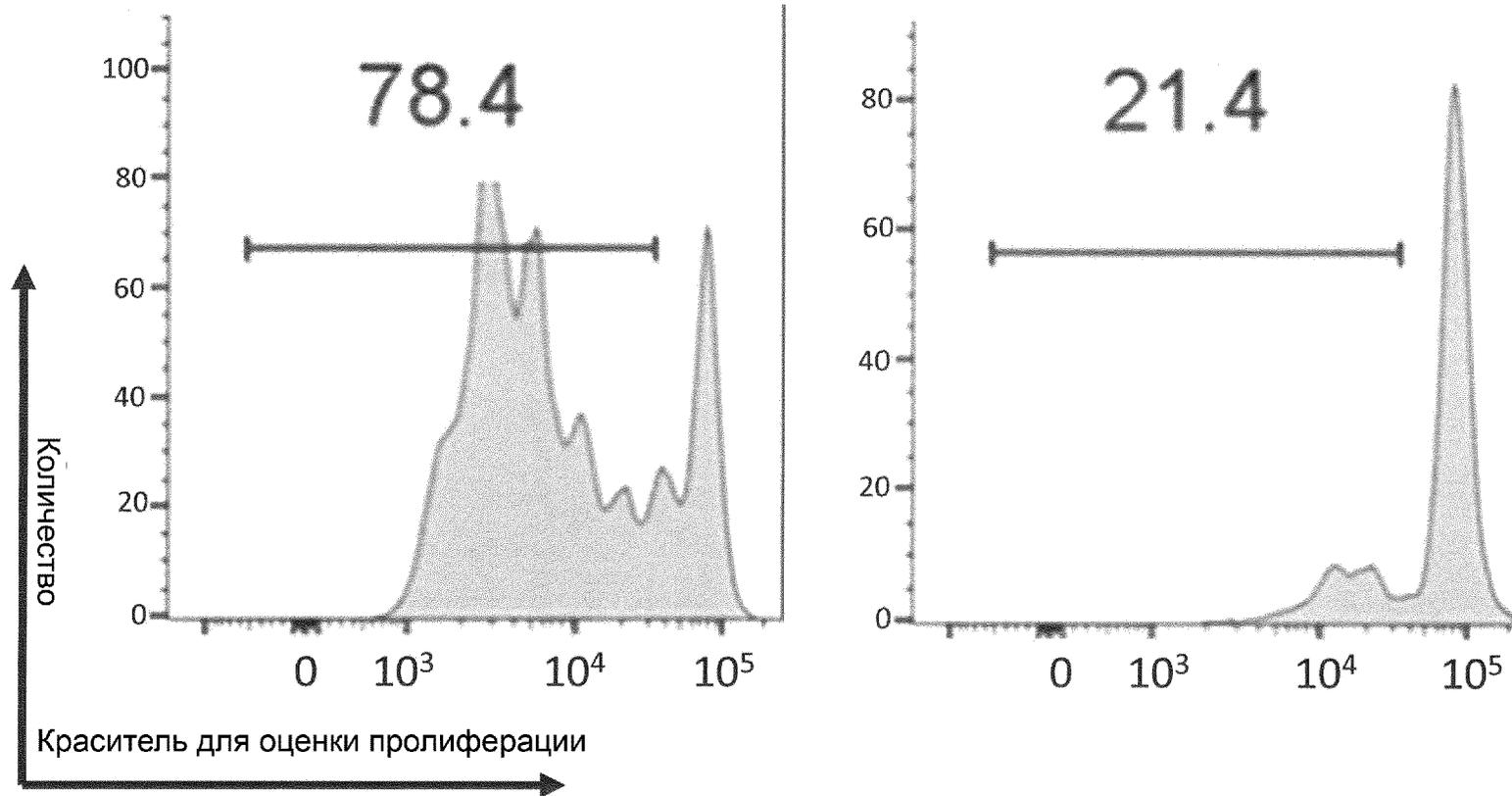
8/10

Фиг. 6С

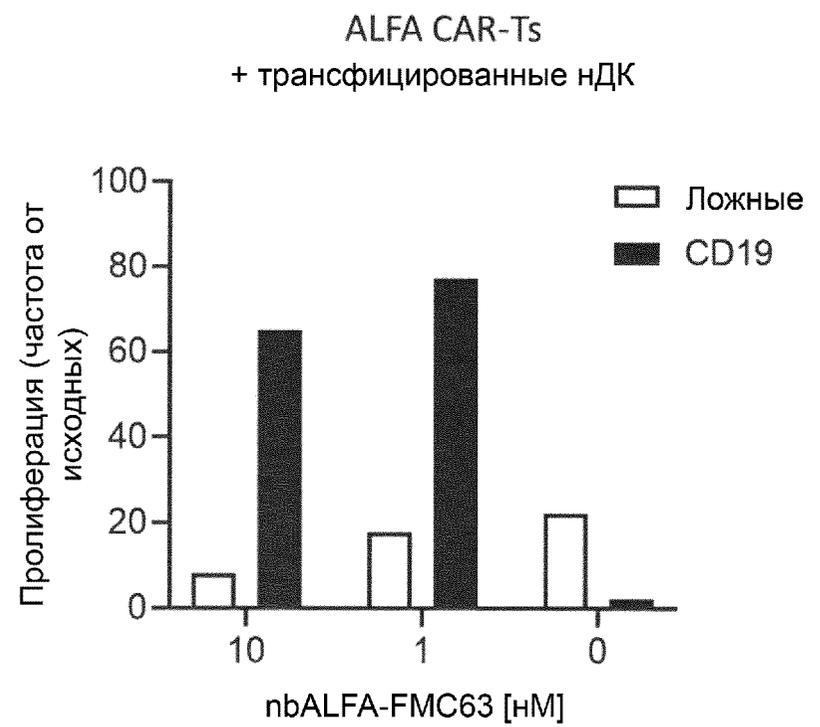
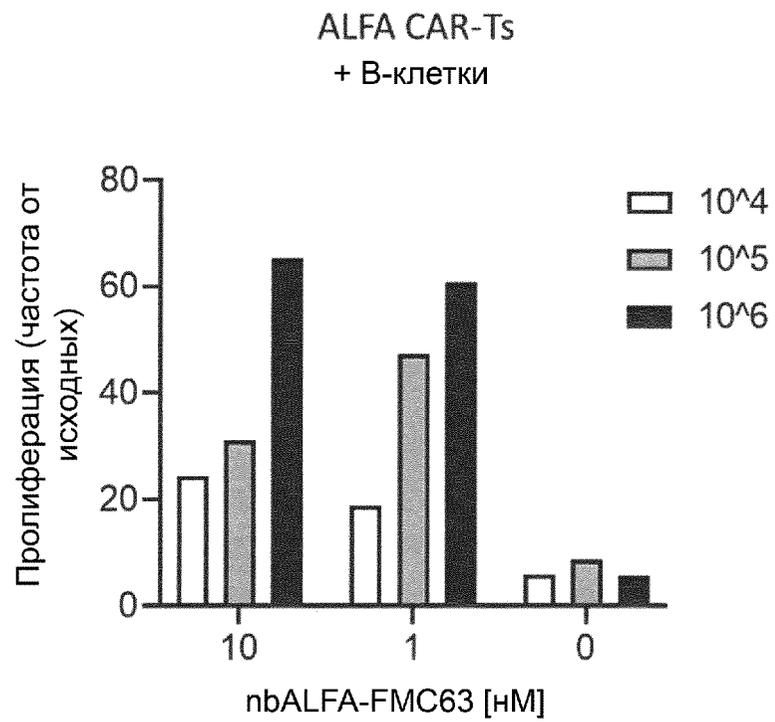
ALFA-линкер-CAR

VHH(α ALFA)-(EA₃K)₃GPI

Контроль



Фиг. 6D



10/10

Фиг. 7