

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490156** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.09.30

(22) Дата подачи заявки
2020.05.07

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) **ВИДЫ ИММУНОТЕРАПИИ, НАЦЕЛЕННОЙ НА CD33**

(31) **62/845,304; 62/898,392**

(32) **2019.05.08; 2019.09.10**

(33) **US**

(62) **202193072; 2020.05.07**

(71) Заявитель:
**ИНХИБРКС БАЙОСАЙЕНСИЗ,
ИНК.; 2СЕВЕНТИ БАЙО, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Джарджур Джордан, Погсон Марк,
Люн Вай-Хан, Джонс Кайл, Краго
Уильям, Санабрия Анжелика,
Холландс Эндрю, Гано Джейкоб, Ма
Милтон, Тиммер Джон С., Экельман
Брендан П. (US)**

(74) Представитель:
Кузнецова С.А. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к неприродной клетке, содержащей первый полипептид, содержащий: полипептид домена мультимеризации FRB или его вариант; трансмембранный домен CD8 α или трансмембранный домен CD4; домен костимуляции CD137 и/или домен передачи первичного сигнала CD3 ζ ; и второй полипептид, содержащий: антитело VHH к CD33, которое имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20; полипептид домена мультимеризации FKBP или его вариант и трансмембранный домен CD4 или трансмембранный домен CD8 α ; где мостиковый фактор способствует образованию полипептидного комплекса на поверхности клетки, при этом мостиковый фактор связан с доменами мультимеризации первого и второго полипептидов и располагается между ними. Также изобретение относится к слитому полипептиду, содержащему указанные первый и второй полипептиды и сигнал расщепления, полинуклеотиду, кодирующему указанные полипептиды, вектору, содержащему указанный полинуклеотид, клетке, содержащей указанный слитый полипептид, фармацевтической композиции, содержащей заявленную клетку, и способу лечения субъекта, у которого имеется солидный рак или гематологическое злокачественное новообразование, с помощью указанной композиции.

A1

202490156

202490156

A1

ВИДЫ ИММУНОТЕРАПИИ, НАЦЕЛЕННОЙ НА CD33

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет в соответствии с § 119(e) раздела 35 Свода федеральных законов США на основании предварительной заявки на патент США № 62/898392, поданной 10 сентября 2019 года, и предварительной заявки на патент США № 62/845304, поданной 8 мая 2019 года, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ЗАЯВЛЕНИЕ В ОТНОШЕНИИ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Перечень последовательностей, связанный с настоящей заявкой, предоставлен в виде файла в текстовом формате вместо бумажной копии и, тем самым, включен посредством ссылки в настоящее описание. Название текстового файла, содержащего перечень последовательностей, BLBD_119_02WO_ST25.txt. Текстовый файл размером 302 килобайта, был создан 5 мая 2020 года и предоставляется на рассмотрение в электронном виде посредством EFS-Web одновременно с подачей настоящего описания.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Область техники

Настоящее изобретение относится к улучшенным видам адоптивной клеточной терапии, направленным против CD33. Более конкретно, настоящее изобретение относится к химически контролируемым сигнальным молекулам, содержащим антитело VHH к CD33, химерным антигенным рецепторам, содержащим антитело VHH к CD33, клеткам, содержащим таковые, и соответствующим способам лечения с использованием таковых.

Описание предшествующего уровня техники

С 1975 по 2000 год количество случаев рака в мире удвоилось. Рак является второй ведущей причиной заболеваемости и смертности во всем мире: в 2012 г. было

зарегистрировано примерно 14,1 миллиона новых случаев заболевания и 8,2 миллиона смертей, связанных с раком. Наиболее распространенными видами рака являются рак молочной железы, рак легкого и бронхов, рак предстательной железы, рак толстой и прямой кишки, рак мочевого пузыря, меланома кожи, неходжкинская лимфома, рак щитовидной железы, рак почки и почечной лоханки, рак эндометрия, лейкоз и рак поджелудочной железы. По прогнозам, число новых случаев рака вырастет до 22 миллионов в течение следующих двух десятилетий.

Адоптивная клеточная терапия становится мощной парадигмой привлечения сложных биологических сигналов для лечения рака. В отличие от композиций на основе низкомолекулярных и биологических лекарственных средств, виды адоптивной клеточной терапии обладают потенциалом для выполнения уникальных терапевтических задач благодаря присущим им бесчисленным программам восприятия и реакции и все более четкому определению механизмов генетического контроля. Существующие способы в основном сосредоточены на химерных антигенных рецепторах (CAR) на основе scFv. CAR-T-клеточная терапия имела ограниченный успех из-за плохой экспрессии CAR, размножения CAR-T-клеток *in vivo*, быстрого исчезновения клеток после инфузии, не оправдавшей ожиданий клинической активности и ускользания антигена.

Существует потребность в модификации иммунных эффекторных клеток с использованием улучшенного пространственного расположения CAR (CARchitectures) и/или улучшенного механизма восприятия и интеграции химической и/или биологической информации, связанной с окружающей физиологической средой.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение в целом частично относится к регулируемым димеризирующим средством иммунорецепторным комплексам (DARIC) на основе VHH и химерным антигенным рецепторам (CAR), направленным против CD33, на основе VHH, полинуклеотидам, кодирующим таковые, композициям на их основе, а также способам их получения и применения для лечения рака.

В различных вариантах осуществления неприродная клетка содержит: первый полипептид, содержащий: полипептид домена мультимеризации FRB или его вариант; трансмембранный домен CD8 α или трансмембранный домен CD4; домен костимуляции

CD137 и/или домен передачи первичного сигнала CD3 ζ ; и второй полипептид, содержащий: антитело VHH к CD33, которое имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20; полипептид домена мультимеризации FKBP или его вариант; и трансмембранный домен CD4 или трансмембранный домен CD8 α ; где мостиковый фактор способствует образованию полипептидного комплекса на поверхности неприродной клетки с мостиковым фактором, связанным с доменами мультимеризации первого и второго полипептидов и расположенным между ними.

В конкретных вариантах осуществления домен мультимеризации FKBP представляет собой FKBP12.

В некоторых вариантах осуществления полипептид FRB представляет собой FRB с T2098L.

В определенных вариантах осуществления мостиковый фактор выбран из группы, состоящей из AP21967, сиролимуса, эверолимуса, новолимуса, пимекролимуса, ридафоролимуса, такролимуса, темсиролимуса, умиролимуса и зотаролимуса.

В различных вариантах осуществления первый полипептид содержит сигнальный пептид, трансмембранный домен CD8 α ; домен костимуляции CD137 и домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

В конкретных вариантах осуществления второй полипептид содержит сигнальный пептид и трансмембранный домен CD4.

В дополнительных вариантах осуществления второй полипептид содержит домен костимуляции.

В дополнительных вариантах осуществления домен костимуляции второго полипептида представляет собой домен костимуляции, выделенный из OX40 или TNFR2.

В дополнительных вариантах осуществления второй полипептид содержит последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 22—31.

В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой гемопоэтическую клетку.

В конкретных вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку, $\alpha\beta$ Т-клетку или $\gamma\delta$ Т-клетку.

В дополнительных вариантах осуществления клетка представляет собой клетку CD3+, CD4+ и/или CD8+.

В различных вариантах осуществления клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL) или хелперную Т-клетку.

В дополнительных вариантах осуществления клетка представляет собой естественную клетку-киллера (NK) или Т-клетку с функциями естественных киллеров (NKT).

В конкретных вариантах осуществления домен мультимеризации FRB и домен мультимеризации FKBP локализуются вне клетки, если экспрессируются в составе первого полипептида и второго полипептида.

В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид содержит: первый полипептид, содержащий: полипептид домена мультимеризации FRB или его вариант; трансмембранный домен CD8 α или трансмембранный домен CD4; домен костимуляции CD137 и/или домен передачи первичного сигнала CD3 ζ ; сигнал расщепления полипептида; и второй полипептид, содержащий: антитело VHH к CD33, которое имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20; полипептид домена мультимеризации FKBP или его вариант; и трансмембранный домен CD4 или трансмембранный домен CD8 α .

В конкретных вариантах осуществления домен мультимеризации FKBP представляет собой FKBP12.

В определенных вариантах осуществления полипептид FRB представляет собой FRB с T2098L.

В дополнительных вариантах осуществления первый полипептид содержит сигнальный пептид, трансмембранный домен CD8 α ; домен костимуляции CD137 и домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

В конкретных вариантах осуществления второй полипептид содержит сигнальный пептид и трансмембранный домен CD4.

В определенных вариантах осуществления слитый полипептид содержит последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 32—41.

В дополнительных вариантах осуществления второй полипептид содержит домен костимуляции.

В дополнительных вариантах осуществления домен костимуляции второго полипептида представляет собой домен костимуляции, выделенный из OX40 или TNFR2.

В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид содержит последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 42—61.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрен полинуклеотид, кодирующий первый или второй полипептид или слитый полипептид, рассматриваемые в данном документе.

В дополнительных вариантах осуществления предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотид, рассмотренный в данном документе.

В дополнительных вариантах осуществления ретровирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор.

В дополнительных вариантах осуществления предусмотрена клетка, содержащая слитый полипептид, рассматриваемый в данном документе.

В конкретных вариантах осуществления клетка представляет собой гемопоэтическую клетку.

В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку.

В различных вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку, $\alpha\beta$ Т-клетку или $\gamma\delta$ Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку CD3+, CD4+ и/или CD8+.

В конкретных вариантах осуществления клетка представляет собой цитотоксический Т-лимфоцит (CTL), инфильтрирующий опухоль лимфоцит (TIL) или хелперную Т-клетку.

В дополнительных вариантах осуществления клетка представляет собой естественную клетку-киллера (NK) или Т-клетку с функциями естественных киллеров (NKT).

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит клетку, рассмотренную в данном документе.

В дополнительных вариантах осуществления предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется солидный рак или гематологическое злокачественное новообразование, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, рассматриваемой в данном документе.

В различных вариантах осуществления солидный рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, колоректального рака, рака эндометрия, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака шейки матки, рака яичника, плоскоклеточной карциномы, рака щитовидной железы, рака мочевого пузыря, рака пищевода и рака головного мозга.

В различных вариантах осуществления гематологическое злокачественное новообразование представляет собой лейкоз, лимфому или множественную миелому.

В конкретных вариантах осуществления гематологическое злокачественное новообразование представляет собой острый миелогенный лейкоз (AML).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НЕКОТОРЫХ АСПЕКТОВ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **фигуре 1А** показано схематическое изображение полипептидного комплекса VHH-DARIC.

На **фигуре 1В** показано строение DARIC на основе VHH к CD33.

На **фигуре 2А** показан уровень экспрессии DARIC на основе VHH1-5 к CD33 в трансдуцированных Т-клетках, выявляемая с помощью окрашивания антителами к VHH (верхний ряд) и связывания Fc с CD33 (нижний ряд).

На **фигуре 2В** показан уровень экспрессии DARIC на основе VHH9-10 к CD33 в трансдуцированных Т-клетках, выявляемая с помощью связывания Fc с CD33.

На **фигуре 3А** показан фенотип Т-клеток, трансдуцированных с помощью DARIC на основе VHH1-5 к CD33 или контролей.

На **фигуре 3В** показан фенотип Т-клеток, трансдуцированных с помощью DARIC на основе VHH9-10 к CD33 или контролей.

На **фигуре 4А** показан уровень секреции IFN γ из клеток с DARIC на основе VHH1-5 к CD33 или контрольных клеток, культивируемых с THP-1 клетками CD33⁺ при соотношении Е:Т, составляющем 1:1, в присутствии или отсутствие AP21967 в течение 24 часов.

На **фигуре 4В** показана секреция IFN γ из клеток с DARIC на основе VHH9-10 к CD33 или контрольных клеток, культивируемых с THP-1 клетками CD33⁺ при соотношении Е:Т, составляющем 1:1, в присутствии или отсутствие AP21967 в течение 24 часов.

На **фигуре 4С** показана секреция IFN γ из клеток DARIC на основе VHH9-10 к CD33 или контрольных клеток, культивируемых с модифицированными клетками 293Т, которые экспрессируют полноразмерный CD33 (CD33М) или сплайс-вариант CD33 (CD33m, C2) при соотношении Е:Т, составляющем 1:1, в присутствии или отсутствие AP21967 в течение 24 часов.

На **фигуре 5А** показан уровень экспрессии CD33 на клетках MV4-11, клетках MV4-11, сконструированных с обеспечением нокаута гена CD33 (клетки CD33-KO), и в неокрашенном контроле.

На **фигуре 5В** показан уровень секреции IFN γ Т-клетками с DARIC на основе антитела VHH9 к CD33 или нетрансдуцированными Т-клетками, совместно культивируемыми с клетками MV4-11 или клетками CD33-KO при соотношении Е:Т, составляющем 1:1, в присутствии или отсутствие AP21967 в течение 24 часов.

На **фигуре 5C** показана секреция $IFN\gamma$ нетрансдуцированными Т-клетками, Т-клетками с CAR к CD33 или Т-клетками с DARIC на основе антитела VHH к CD33, совместно культивированными с клетками MV4-11 (левая панель) или клетками CD33-КО, сконструированными с обеспечением экспрессии сплайс-варианта CD33m (клетки CD33-КО-C2; правая панель) при соотношении Е:Т, составляющем 1:1, в присутствии или отсутствие AP21967 в течение 24 часов.

На **фигуре 6** показана секреция $IFN\gamma$ Т-клетками с DARIC на основе антитела VHH к CD33, совместно культивированными с клетками THP-1 CD33⁺ при соотношении Е:Т, составляющем 1:1, в присутствии или отсутствие растворимого CD33 (CD33-Fc) и AP21967 в течение 24 часов.

На **фигуре 7** показана секреция $IFN\gamma$ Т-клетками с DARIC на основе антитела VHH к CD33, совместно культивированными с CD33^{отриц.} клетками 293Т, трансфектированными различными количествами мРНК, кодирующей CD33, при соотношении Е:Т, составляющем 1:1, в присутствии или отсутствие AP21967 в течение 24 часов.

На **фигуре 8A** показан рост опухоли, измеряемый в виде функциональной зависимости люминесценции у иммунодефицитных мышей NSG, инокулированных опухолевыми клетками AML HL60, экспрессирующими репортерный ген люциферазы, и обработанных через 10 дней после инокуляции (день 0) нетрансдуцированными Т-клетками или Т-клетками с DARIC на основе антитела VHH к CD33 в отсутствие рапамицина.

На **фигуре 8B** показан рост опухоли, измеряемый в виде функциональной зависимости люминесценции у иммунодефицитных мышей NSG, инокулированных опухолевыми клетками AML HL60, экспрессирующими репортерный ген люциферазы, и обработанных через 10 дней после инокуляции (день 0) нетрансдуцированными Т-клетками или Т-клетками с DARIC на основе антитела VHH к CD33 и рапамицином в дозе 0,1 мг/кг.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИДЕНТИФИКАТОРОВ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Под **SEQ ID NO:1** представлена аминокислотная последовательность полноразмерного CD33 человека.

Под **SEQ ID NO: 2—21** представлены аминокислотные последовательности доменов антитела VHH к CD33.

Под **SEQ ID NO: 22—31** представлены аминокислотные последовательности для связывающих компонентов DARIC на основе антитела VHH к CD33.

Под **SEQ ID NO: 32—41** представлены аминокислотные последовательности для слитых белков DARIC на основе антитела VHH к CD33.

Под **SEQ ID NO: 42—51** представлены аминокислотные последовательности для слитых белков DARIC на основе антитела VHH к CD33 и OX40.

Под **SEQ ID NO: 52—61** представлены аминокислотные последовательности для слитых белков DARIC на основе антитела VHH к CD33 и TNFR2.

Под **SEQ ID NO: 62—81** представлены аминокислотные последовательности для CAR на основе антитела VHH к CD33.

Под **SEQ ID NO: 82** представлена аминокислотная последовательность для компонента передачи сигналов DARIC на основе антитела VHH к CD33.

Под **SEQ ID NO: 83** представлена полинуклеотидная последовательность для последовательности Козак.

Под **SEQ ID NO: 84—94** представлены аминокислотные последовательности различных линкеров.

Под **SEQ ID NO: 95—119** представлены аминокислотные последовательности сайтов расщепления для протеазы и сайтов расщепления для саморасщепляющегося полипептида.

Если в вышеизложенных последовательностях присутствует обозначение Хаа, оно может относиться к любой аминокислоте или отсутствию аминокислоты. В предпочтительных вариантах осуществления ХааХаа относится к аминокислотной последовательности SS или KP.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

А. ОБЗОР

Рак является одной из ведущих причин смерти во всем мире. Приблизительно 10% случаев рака представляют собой гематологические злокачественные новообразования, включая лейкоз, лимфомы и миеломы. Острый миелоидный лейкоз (AML) является наиболее частым и смертельным гематологическим злокачественным новообразованием у взрослых. Несмотря на крупные научные открытия и новые методы лечения за последние четыре десятилетия, результаты лечения AML, особенно среди взрослых пациентов, остаются неутешительными. Стандартные виды химиотерапии могут вызвать полную ремиссию у отдельных пациентов; однако у большинства пациентов в конечном итоге возникает рецидив и заболевание приводит к летальному исходу. В 2012 году заболеваемость AML во всем мире составляла приблизительно 351965 человек, и приблизительно 265461 человек умерли от AML.

CD33 экспрессируется на большинстве лейкобластов при остром миелоидном лейкозе (AML) и, возможно, на лейкозных стволовых клетках. CD33 является сложной мишенью из-за его низкого уровня экспрессии и медленной интернализации; эти характеристики ограничивают антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность и накопление лекарственного средства внутри клетки и, следовательно, активность немеченых и переносящих токсины антител.

Настоящее изобретение в целом относится к улучшенным композициям и способам регулирования пространственного и временного контроля видов адоптивной клеточной терапии с использованием регулируемых димеризирующим средством иммунорецепторных комплексов (DARIC), которые связывают CD33. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, композиции и способы с использованием DARIC, рассматриваемые в данном документе, предусматривают многочисленные преимущества в сравнении с видами CAR-T-клеточной терапии, существующими в данной области техники, включая без ограничения обеспечение как пространственного, так и временного контроля связывания и сигнальной активности при передаче сигнала эффекторными клетками иммунной системы. При временном контроле DARIC происходит запуск механизма DARIC, обеспечивающего передачу сигналов через опосредованное мостиковым фактором объединение связывающего

компонента DARIC с компонентом передачи сигналов DARIC. При пространственном контроле DARIC задействуется сигнальный механизм посредством распознавания CD33 связывающим доменом DARIC связывающего компонента DARIC. Таким образом, иммунные эффекторные клетки с DARIC активируются, при наличии как клетки-мишени, экспрессирующей CD33, так и мостикового фактора.

Настоящее изобретение также относится к улучшенным вариантам пространственного расположения CAR к CD33, которые позволяют преодолеть потенциальные ограничения существующих вариантов CAR-T-клеточной терапии, включая без ограничения тоническую передачу сигналов или антиген-независимую передачу сигналов, недостаточный уровень экспрессии и/или уровень активности, недостаточный для достижения терапевтического эффекта.

В различных вариантах осуществления в настоящем раскрытии рассматриваются DARIC на основе антитела VHH к CD33 или CAR на основе VHH к CD33, которые вызывают противораковый ответ в отношении типов рака, *например* AML, при котором экспрессируется CD33, *например* полноразмерный CD33 и/или сплайс-вариант CD33.

В конкретных вариантах осуществления DARIC содержит полипептид (компонент передачи сигналов DARIC), который содержит полипептид домена мультимеризации или его вариант, трансмембранный домен, домен костимуляции и/или домен передачи первичного сигнала; и полипептид (связывающий компонент DARIC), который содержит антитело VHH к CD33, полипептид домена мультимеризации или его вариант, трансмембранный домен и необязательно домен костимуляции. В присутствии мостикового фактора связывающие компоненты и компоненты передачи сигналов DARIC связываются друг с другом посредством мостикового фактора с образованием функционально активного DARIC, который нацелен на клетки, экспрессирующие CD33.

В конкретных вариантах осуществления домены мультимеризации компонентов связывания DARIC и компонентов передачи сигналов DARIC расположены вне клетки. Внеклеточное расположение доменов мультимеризации обеспечивает многочисленные преимущества по сравнению с внутриклеточным расположением, включая без ограничения более эффективное расположение домена антитела VHH к CD33, более высокую временную чувствительность к регуляции посредством мостикового фактора

и меньшую токсичность благодаря использованию определенных мостиковых факторов в дозах, не вызывающих иммуносупрессивного эффекта.

Полинуклеотиды, кодирующие DARIC, связывающие компоненты DARIC и компоненты передачи сигналов DARIC; связывающие компоненты DARIC, компоненты передачи сигналов DARIC, белковые комплексы на основе DARIC, слитые белки на основе DARIC; клетки, содержащие полинуклеотиды, кодирующие DARIC, связывающие компоненты DARIC и компоненты передачи сигналов DARIC и/или экспрессирующие их; и в данном документе предусмотрены способы их использования для лечения иммунного нарушения.

Методы получения рекомбинантной (*m. e.* сконструированной) ДНК, синтеза пептидов и олигонуклеотидов, иммунологических анализов, тканевых культур, трансформации (*например*, электропорации, липофекции), ферментативных реакций, очистки и связанные с ними методы и процедуры в целом могут выполняться, как описано в различных общих и более конкретных ссылках по микробиологии, молекулярной биологии, биохимии, молекулярной генетике, клеточной биологии, вирусологии и иммунологии, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании. *См., например*, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк; *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, обновлено в июле 2008 г.); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, том I и II (IRL Press, Oxford Univ. Press, США, 1985 г.); *Current Protocols in Immunology* (под редакцией John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober, 2001 John Wiley & Sons, Нью-Йорк, штат Нью-Йорк); *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*, под редакцией Julie Logan, Kirstin Edwards и Nick Saunders, 2009 г., Caister Academic Press, Норфолк, Великобритания; Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, Нью-Йорк, 1992 г.); Guthrie and Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press, Нью-Йорк, 1991 г.); *Oligonucleotide Synthesis* (под ред. N. Gait, 1984 г.); *Nucleic Acid The Hybridization* (под ред. В. Hames и S. Higgins, 1985 г.); *Transcription and Translation* (под ред. В. Hames и S. Higgins, 1984 г.); *Animal Cell Culture* (под ред. R. Freshney, 1986 г.); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984 г.); *Next-Generation Genome Sequencing* (Janitz, 2008 г., Wiley-VCH); *PCR Protocols (Methods in Molecular Biology)* (под ред. Park, 3-е издание,

2010 г., Humana Press); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986 г.); научный труд, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., Нью-Йорк); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (под ред. J. H. Miller и M. P. Calos, 1987 г., Cold Spring Harbor Laboratory); Harlow and Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк, 1998 г.); *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (под ред. Mayer и Walker, Academic Press, Лондон, 1987 г.); *Handbook Of Experimental Immunology*, тома I-IV (под ред. D. M. Weir и C. C. Blackwell, 1986 г.); Roitt, *Essential Immunology*, 6-е издание, (Blackwell Scientific Publications, Оксфорд, 1988 г.); *Current Protocols in Immunology* (под ред. Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach и W. Strober, 1991 г.); *Annual Review of Immunology*; а также монографии в журналах, таких как *Advances in Immunology*.

В. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Перед более подробным изложением настоящего изобретения может быть полезно для его понимания предоставить определения определенных терминов, которые будут использоваться в данном документе.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое общеизвестно специалистам средней квалификации в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя при осуществлении конкретных вариантов осуществления на практике или при их тестировании могут быть использованы любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, предпочтительные варианты осуществления композиций, способов и материалов описаны в данном документе. Для целей настоящего изобретения ниже определены следующие термины.

Формы единственного и множественного числа, используемые в данном документе, обозначают один или более (*т. е.* по меньшей мере один или один или более) грамматических объектов предмета. В качестве примера, «элемент» означает один элемент или один или более элементов.

Использование альтернативы (*например*, «или») следует понимать как обозначение какой-либо одной, обеих или любой комбинации из альтернатив.

Термин «и/или» следует понимать как какую-либо одну или обе из альтернатив.

Используемый в данном документе термин «приблизительно» или «примерно» относится к количеству, уровню, значению, числу, частоте, процентной доле, измерению, размеру, величине, весу или длине, которые варьируют в пределах 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% относительно количества, уровня, значения, числа, частоты, процентной доли, измерения, размера, величины, веса или длины, используемых для сравнения. В одном варианте осуществления термин «приблизительно» или «примерно» относится к диапазону количества, уровня, значения, числа, частоты, процентной доли, измерения, размера, величины, веса или длины, составляющему $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, $\pm 8\%$, $\pm 7\%$, $\pm 6\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$ или $\pm 1\%$ относительно количества, уровня, значения, числа, частоты, процентной доли, измерения, размера, величины, веса или длины, используемых для сравнения.

В одном варианте осуществления диапазон, *например* от 1 до 5, от приблизительно 1 до 5 или от приблизительно 1 до приблизительно 5, относится к каждому числовому значению, входящему в диапазон. Например, в одном неограничивающем и только иллюстративном варианте осуществления диапазон «от 1 до 5» является в одинаково приемлемым для обозначения 1, 2, 3, 4, 5; или 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 или 5,0; или 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или 5,0.

Используемый в данном документе термин «значительно» относится к количеству, уровню, значению, числу, частоте, процентной доле, измерению, размеру, величине, весу или длине, которые составляют 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более по сравнению с количеством, уровнем, значением, числом, частотой, процентной долей, измерением, размером, величиной, весом или длиной, используемыми для сравнения. В одном варианте осуществления «практически такой же» относится к количеству, уровню, значению, числу, частоте, процентной доле, измерению, размеру, величине, весу или длине, которые оказывают действие, например физиологическое действие, которое является примерно таким же как оказываемое количеством, уровнем, значением, числом, частотой, процентной долей, измерением, размером, величиной, весом или длиной, которые используются для сравнения.

На протяжении настоящего описания, если контекст не требует иного, слова «содержат», «содержит» и «содержащий» следует понимать как подразумевающие

включение указанной стадии, или элемента, или группы стадий или элементов, но не исключение любой другой стадии, или элемента, или группы стадий или элементов. Под «состоящий из» подразумевается включение и ограничение тем, что следует за фразой «состоящий из». Таким образом, фраза «состоящий из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными, и что никакие другие элементы не могут присутствовать. Под «по существу состоящий из» подразумевают включение любых элементов, перечисленных после данной фразы, и ограничение другими элементами, которые не препятствуют активности или действию, указанным в настоящем раскрытии в отношении перечисленных элементов, или способствуют им. Таким образом, фраза «по существу состоящий из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными, и что не могут присутствовать другие элементы, оказывающие существенное негативное влияние на активность или действие перечисленных элементов.

Ссылка на протяжении настоящего описания на «один вариант осуществления», «вариант осуществления», «конкретный вариант осуществления», «сходный вариант осуществления», «определенный вариант осуществления», «дополнительный вариант осуществления» или «еще один вариант осуществления» или их комбинации означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в связи с данным вариантом осуществления, включены по меньшей мере в один из вариантов осуществления. Таким образом, появление всех вышеприведенных фраз в различных местах на протяжении настоящего описания не обязательно относится к одному и тому же варианту осуществления. Более того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть объединены любым подходящим образом в одном или более вариантах осуществления. Следует также понимать, что явное упоминание признака в одном варианте осуществления служит основанием для исключения данного признака в конкретном варианте осуществления.

«Антиген (Ag)» относится к соединению, композиции или веществу, которое может стимулировать выработку антител или Т-клеточный ответ у животного, в том числе к композициям (таким как композиция, содержащая опухолеспецифический белок), которые инъецируют животному или поглощаются животным. Примеры антигенов включают без исключения липиды, углеводы, полисахариды, гликопротеины, пептиды или нуклеиновые кислоты. Антиген реагирует с продуктами специфического гуморального или клеточного

иммунитета, в том числе с теми, которые были индуцированы под действием гетерологичных антигенов, таких как раскрытые антигены.

«Целевой антиген» или «целевой антиген, представляющий интерес» относится к части CD33, для связывания которой предназначен связывающий домен, рассматриваемый в данном документе. В конкретных вариантах осуществления целевой антиген представляет собой эпитоп аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1.

«CD33» относится к рецептору клеточной поверхности, также известному как иммуноглобулин-подобный лектин 3, связывающий сиаловую кислоту (SIGLEC-3), или GP67. Ген CD33 расположен в хромосоме 19 и продуцирует гликозилированный белок приблизительно 67 кДа. CD33 содержит два Ig-подобных домена, один домен V-набора и один домен C2-набора. CD33 играет роль в опосредовании межклеточных взаимодействий и в поддержании иммунных клеток в состоянии покоя. CD33 распознает и связывает альфа-2,3- и, в большей степени, альфа-2,6-связанные гликаны, несущие сиаловую кислоту. При взаимодействии лигандов, таких как C1q или сиалилированные гликопротеины, два иммунорецепторных тирозиновых ингибирующих мотива (ITIM), расположенных в цитоплазматическом хвосте CD33, фосфорилируются Src-подобными киназами, такими как LCK. Данные фосфорилирования предусматривают сайты для рекрутинга и активации протеинтирозинфосфатаз PTPN6/SHP-1 и PTPN11/SHP-2. CD33 также имеет по меньшей мере три идентифицированных сплайс-варианта. В сплайс-варианте CD33^{ΔE2} отсутствует аминокислотная последовательность, кодируемая экзоном 2 гена CD33 человека (аминокислоты 13–139 полноразмерного CD33; *например*, NP_001076087.1, C2). В сплайс-варианте CD33^{7a} отсутствуют 54 карбоксиконцевые аминокислоты из-за раннего сигнала остановки трансляции, находящегося в экзоне 7a (*например*, NP_001171079.1). В CD33^{ΔE2/7a} отсутствуют аминокислоты, кодируемые экзоном 2, и 54 карбоксиконцевые аминокислоты. CD33 обычно экспрессируется на субпопуляции нормальных В-клеток, активированных Т-клеток и естественных клеток-киллеров, но не экспрессируется на гемопоэтических стволовых клетках или вне кроветворной системы. Как полноразмерные CD33, так и/или варианты сплайсинга CD33 также экспрессируются в бластных клетках при остром миелоидном лейкозе (AML) у большинства пациентов с AML.

Термин «антитело» относится к связывающему средству, которое представляет собой полипептид, содержащий по меньшей мере переменную область легкой цепи или тяжелой цепи иммуноглобулина, которая специфически распознает и связывает эпитоп антигена, такого как липид, углевод, полисахарид, гликопротеин, пептид или нуклеиновая кислота, содержащие антигенную детерминанту, распознаваемую иммунной клеткой.

Ссылки на «V_H» или «V_H» относятся к переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина или ее антигенсвязывающим фрагментам.

Термин «антитело, состоящее только из тяжелых цепей» относится к антителу, которое содержит два домена V_H и не содержит легких цепей (Riechmann L. *et al*, *J. Immunol. Methods* 231:25–38 (1999); WO 94/04678; WO 94/25591; патент США № 6005079). Антитело верблюдовых относится к антителу, выделенному из верблюда, альпаки или ламы, которое содержит два домена V_H и не содержит легких цепей. «Гуманизированное V_HH» или «гуманизированное антитело верблюдовых» относится к V_HH, отличному от человеческого, или антителу верблюдовых, которое подверглось гуманизации для снижения потенциальной иммуногенности антитела у людей-реципиентов.

«V_HH», «антитело V_HH» или «домен V_HH», используемые в данном документе, относятся к фрагменту антитела, который содержит наименьшую известную антигенсвязывающую единицу переменной области тяжелой цепи антитела (Koch-Nolte, *et al*, *FASEB J.*, 21: 3490-3498 (2007)).

«Линкер» относится к совокупности аминокислотных остатков между различными полипептидными доменами, добавленной для обеспечения их правильного расположения в пространстве и обеспечения правильной конформации молекулы. В конкретных вариантах осуществления линкер разделяет один или более доменов V_HH, шарнирных доменов, доменов мультимеризации, трансмембранных доменов, доменов костимуляции и/или доменов передачи первичного сигнала.

Иллюстрированные примеры линкеров, подходящих для использования в конкретных вариантах осуществления, рассматриваемых в данном документе, включают без ограничения следующие аминокислотные последовательности: GGG; DGGGS (SEQ ID NO: 84); TGEKP (SEQ ID NO: 85) (см., например, Liu *et al.*, PNAS 5525-5530

(1997)); GGRR (SEQ ID NO: 86) (Pomerantz *et al.* 1995, см. выше); (GGGS)_n, где n = 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 87) (Kim *et al.*, PNAS 93, 1156-1160 (1996); EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO: 88) (Chaudhary *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070); KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 89) (Bird *et al.*, 1988, Science 242:423-426), GGRRGGGS (SEQ ID NO: 90); LRQRDGERP (SEQ ID NO: 91); LRQKDGGGSERP (SEQ ID NO: 92); LRQKD(GGGS)₂ ERP (SEQ ID NO: 93). В качестве альтернативы гибкие линкеры можно рационально разработать с использованием компьютерной программы, способной моделировать как сайты связывания ДНК, так и сами пептиды (Desjarlais & Berg, PNAS 90:2256-2260 (1993), PNAS 91:11099-11103 (1994) или посредством способов на основе фагового дисплея. В одном варианте осуществления линкер содержит следующую аминокислотную последовательность: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 94) (Cooper *et al.*, Blood, 101(4): 1637-1644 (2003)).

«Спейсерный домен» относится к полипептиду, который разделяет два домена. В одном варианте осуществления спейсерный домен перемещает домен V_HH от поверхности эффекторной клетки для обеспечения надлежащего контакта клетка/клетка, связывания антигена и активации (Patel *et al.*, Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). В конкретных вариантах осуществления спейсерный домен разделяет один или более доменов V_HH, доменов мультимеризации, трансмембранных доменов, доменов костимуляции и/или доменов передачи первичного сигнала. Спейсерный домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. В определенных вариантах осуществления спейсерный домен представляет собой часть иммуноглобулина, включающую без ограничения одну или более константных областей тяжелой цепи, например CH₂ и CH₃. Спейсерный домен может включать аминокислотную последовательность из встречающейся в природе шарнирной области иммуноглобулина или измененной шарнирной области иммуноглобулина.

«Шарнирный домен» относится к полипептиду, который играет роль в регуляции положения антиген-связывающего домена, отодвигая его от поверхности эффекторной клетки для обеспечения надлежащего контакта клетка/клетка, связывания антигена и активации. В конкретных вариантах осуществления полипептиды могут содержать один или более шарнирных доменов между связывающим доменом и доменом мультимеризации, между связывающим доменом и трансмембранным доменом (ТМ)

или между доменом мультимеризации и трансмембранным доменом. Шарнирный домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. Шарнирный домен может включать аминокислотную последовательность из встречающейся в природе шарнирной области иммуноглобулина или измененной шарнирной области иммуноглобулина.

Термин «домен мультимеризации», который используется в данном документе, относится к полипептиду, который предпочтительно взаимодействует или связывается с другим отличающимся от него полипептидом напрямую или с помощью мостиковой молекулы, *например* химически индуцируемый димеризатор, где взаимодействие разных доменов мультимеризации вносит существенный вклад в осуществление мультимеризации (*т. е.*, образование димера, тримера или комплекса из нескольких частей, который может быть гомодимером, гетеродимером, гомотримером, гетеротримером, гомомультимером, гетеромультимером) или эффективно способствует ей. Домен мультимеризации может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника.

Иллюстративные примеры доменов мультимеризации, подходящие для использования в конкретных вариантах осуществления, рассматриваемых в данном документе, включают полипептид FK506-связывающего белка (FKBP) или его варианты, FKBP-рапамицин-связывающий полипептид (FRB) или его варианты, полипептид кальциневрина или его варианты, полипептид циклофилина или его варианты, полипептид бактериальной дигидрофолатредуктазы (DHFR) или его варианты, полипептид PYR1-подобного белка 1 (PYL1) или его варианты, полипептид белка нечувствительности к абсцизовой кислоте 1 (ABI1) или его варианты, полипептид GIB1 или его варианты или полипептид GAI или его варианты.

Используемый в данном документе термин «FKBP-рапамицин-связывающий полипептид» относится к полипептиду FRB. В конкретных вариантах осуществления полипептид FRB представляет собой FKBP12-рапамицин связывающий полипептид. Полипептиды FRB, подходящие для использования в конкретных вариантах осуществления, рассматриваемых в данном документе, в целом содержат от по меньшей мере приблизительно 85 до приблизительно 100 аминокислотных остатков. В определенных вариантах осуществления полипептид FRB содержит последовательность из 93 аминокислот с Ile-2021 по Lys-2113 и мутацию T2098L, со ссылкой номер доступа в GenBank L34075.1. Рассматриваемый в

данном документе полипептид FRB связывается с полипептидом FKBP посредством мостикового фактора, тем самым образуя тройной комплекс.

Используемый в данном документе термин «FK506-связывающий белок» относится к полипептиду FKBP. В конкретных вариантах осуществления полипептид FKBP представляет собой полипептид FKBP12 или полипептид FKBP12, содержащий мутацию F36V. В определенных вариантах осуществления домен FKBP также может называться «доменом, связывающим рапамицин». Информация, касающаяся нуклеотидных последовательностей, клонирования и других аспектов различных видов FKBP, известна в данной области техники (см., например, Staendart *et al.*, *Nature* 346:671, 1990 (FKBP12 человека); Кау, *Biochem. J.* 314:361, 1996). Рассматриваемый в данном документе полипептид FKBP связывается с полипептидом FRB посредством мостикового фактора, тем самым образуя тройной комплекс.

«Мостиковый фактор» относится к молекуле, которая связывается с двумя или более доменами мультимеризации и расположена между ними. В конкретных вариантах осуществления домены мультимеризации вносят существенный вклад в образование полипептидного комплекса или эффективно способствуют этому только в присутствии мостикового фактора. В конкретных вариантах осуществления домены мультимеризации не вносят вклад в образование полипептидного комплекса или не способствуют этому эффективно в отсутствие мостикового фактора. Иллюстративные примеры мостиковых факторов, подходящих для использования в конкретных вариантах осуществления, рассматриваемых в данном документе, включают без ограничения AP21967 рапамицин (сиролимус) или его рапалог, кумермицин или его производное, гиббереллин или его производное, абсцизовую кислоту (ABA) или ее производное, метотрексат или его производное, циклоспорин А или его производное, FKCsA или его производное, триметоприм (Tmr)-синтетический лиганд для FKBP (SLF) или его производное или любую их комбинацию.

Аналоги рапамицина (рапалоги) включают без ограничения те, что раскрыты в патенте США № 6649595, при этом структуры рапалогов включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В определенных вариантах осуществления мостиковый фактор представляет собой рапалог со значительно сниженным иммуносупрессивным эффектом по сравнению с рапамицином. В предпочтительном варианте осуществления рапалог представляет собой AP21967 (также известный как C-16-

(S)-7-метилендотрапамидин, $IC_{50} = 10$ нМ, химически модифицированный неиммуносупрессивный аналог рапамицина). Другие иллюстративные рапалоги, подходящие для использования в конкретных вариантах осуществления, рассматриваемых в данном документе, включают без ограничения эверолимус, новолимус, пимекролимус, ридафоролимус, такролимус, темсиролимус, умиролимус и зотаролимус.

«Значительно сниженный иммуносупрессивный эффект» относится к иммуносупрессивному эффекту, который по меньшей мере в 0,1—0,005 раза меньше, чем наблюдаемый или ожидаемый для той же дозы, измеренной клинически или соответствующим суррогатным маркером иммуносупрессивной активности человека *in vitro* (например, ингибирование пролиферации Т-клеток) или *in vivo*.

«Трансмембранный домен» или «ТМ-домен» представляет собой домен, который прикрепляет полипептид к плазматической мембране клетки. ТМ-домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника.

Термин «эффекторная функция» или «эффекторная функция клетки» относится к специализированной функции иммунной эффекторной клетки. Эффекторная функция включает без ограничения активацию, продукцию цитокинов, пролиферацию и цитотоксическую активность, включая высвобождение цитотоксических факторов, или другие клеточные ответы, вызванные связыванием антигена с рецептором, экспрессируемым на иммунной эффекторной клетке.

«Внутриклеточный домен передачи сигналов» или «эндодомен» относится к части белка, которая передает сигнал для запуска эффекторной функции и которая обуславливает выполнение клеткой специализированной функции. Несмотря на то, что обычно можно использовать целый внутриклеточный домен передачи сигнала, во многих случаях отсутствует необходимость применения целого домена. В тех случаях, когда применяют усеченную часть внутриклеточного домена передачи сигнала, такую усеченную часть можно применять вместо целого домена, при условии что она передает сигнал для запуска эффекторной функции. Термин внутриклеточный домен передачи сигнала подразумевает, что он включает любую усеченную часть внутриклеточного домена передачи сигнала, необходимую или достаточную для передачи сигнала для запуска эффекторной функции.

Известно, что сигналы, генерируемые посредством только TCR, являются недостаточными для полной активации Т-клетки, и что также требуется вторичный или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация Т-клетки опосредуется двумя различными классами внутриклеточных доменов передачи сигнала: доменами передачи первичного сигнала, которые инициируют антиген-зависимую первичную активацию посредством TCR (*например*, комплекса TCR/CD3), и доменами передачи костимулирующего сигнала, которые действуют независимо от антигена образом с обеспечением вторичного или костимулирующего сигнала.

«Домен передачи первичного сигнала» относится к внутриклеточному домену передачи сигналов, который регулирует первичную активацию комплекса TCR либо по пути стимулирования, либо по пути ингибирования. Домены передачи первичного сигнала, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать мотивы передачи сигнала, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM. Иллюстративные примеры ITAM-содержащих доменов передачи первичного сигнала, которые подходят для использования в конкретных вариантах осуществления, включают без ограничения те, которые получены из TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

Используемый в данном документе термин «домен передачи костимулирующего сигнала» или «домен костимуляции» относится к внутриклеточному домену передачи сигнала костимулирующей молекулы. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, не являющиеся антигенными рецепторами или Fc-рецепторами, которые обеспечивают вторичный сигнал, требуемый для эффективной активации и функционирования Т-лимфоцитов после связывания с антигеном. Иллюстративные примеры таких костимулирующих молекул, из которых могут быть выделены домены костимуляции, включают без ограничения: Toll-подобный рецептор 1 (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, представитель 11 семейства доменов рекрутирования каспаз (CARD11), CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD94, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), белок активации DNAX 10 (DAP10), представитель 1 семейства линкеров для активации Т-клеток (LAT), содержащий SH2-домен лейкоцитарный белок с молекулярной массой 76 кДа (SLP76), трансмембранный адаптер 1, ассоциированный с рецептором Т-клетки (TRAT1), TNFR2, представитель 14 суперсемейства рецепторов TNF (TNFRS14; HVEM), представитель 18 суперсемейства рецепторов TNF (TNFRS18;

GITR), представитель 25 суперсемейства рецепторов TNF (TNFRS25; DR3) и дзета-цепь протеинкиназы 70, ассоциированную с рецептором Т-клетки (ZAP70).

«Иммунное нарушение» относится к заболеванию, которое вызывает ответ иммунной системы. В конкретных вариантах осуществления термин «иммунное нарушение» относится к раку, аутоиммунному заболеванию или иммунодефициту.

Используемый в данном документе термин «рак» относится, в целом, к классу заболеваний или состояний, при которых аномальные клетки бесконтрольно делятся и способны инвазировать близлежащие ткани.

Используемый в данном документе термин «злокачественный» относится к раку, при котором группа опухолевых клеток проявляет одно или более из неконтролируемого роста (*т. е.* деления сверх пределов нормы), инвазии (*т. е.* внедрения в прилегающие ткани и их разрушения) и метастазирования (*т. е.* распространения в другие участки организма посредством лимфы или крови). Используемый в данном документе термин «метастазировать» относится к распространению рака из одной части организма в другую. Опухоль, образованная распространившимися клетками, называется «метастатическая опухоль» или «метастаз». Метастатическая опухоль состоит из клеток, аналогичных клеткам исходной (первичной) опухоли.

Используемый в данном документе термин «доброкачественный» или «незлокачественный» относится к опухолям, которые могут увеличиваться в размере, но не распространяются в другие части организма. Доброкачественные опухоли являются самоограничивающимися и обычно не склонны к инвазии или метастазированию.

«Раковая клетка» относится к отдельной клетке раковой опухоли или ткани. Раковые клетки включают как солидные опухоли, так и гемобластозы. «Опухоль» или «опухолевая клетка» обычно относится к вздутию или патологическому изменению, образованному вследствие аномального роста клеток, которое может быть доброкачественным, предраковым или злокачественным. Большинство форм рака образуют опухоли, но гемобластозы, *например*, лейкозы, не обязательно образуют опухоли. Для тех форм рака, которые образуют опухоли, термины раковая (клетка) и опухолевая (клетка) используются взаимозаменяемо. Количество опухоли у

индивидуума представляет собой «опухолевую нагрузку», которую можно измерить как число, объем или вес опухоли.

Термин «рецидив» относится к диагностике возвращения, или признакам и симптомам возвращения рака после периода улучшения или ремиссии.

«Ремиссия» также называется «клинической ремиссией» и включает как частичную, так и полную ремиссию. При частичной ремиссии исчезают некоторые, но не все признаки и симптомы рака. При полной ремиссии все признаки и симптомы рака исчезают, хотя рак все еще может присутствовать в организме.

«Рефрактерный» относится к раку, который является устойчивым или невосприимчивым к лечению конкретным терапевтическим средством. Рак может быть рефрактерным с начала лечения (*т. е.* рефрактерным к начальному воздействию терапевтического средства) или стать таковым в результате развития устойчивости к терапевтическому средству, либо в течение первого периода лечения, либо в течение последующего периода лечения.

Используемые в данном документе термины «индивидуум» и «субъект» зачастую используются взаимозаменяемо и относятся к любому животному, у которого обнаружен симптом рака или другого иммунного нарушения, которое можно лечить с помощью композиций и способов, рассматриваемых в других частях данного документа. Подходящие субъекты (*например*, пациенты) включают лабораторных животных (таких как мышь, крыса, кролик или морская свинка), сельскохозяйственных животных и домашних животных или питомцев (таких как кошка или собака). Включены отличные от человека приматы и, предпочтительно, пациенты-люди. Типичными субъектами являются пациенты-люди, у которых есть, был диагностирован рак или другое иммунное нарушение или которые подвержены риску развития такового.

Используемый в данном документе термин «пациент» относится к субъекту, у которого был диагностирован рак или другое иммунное нарушение, которое можно лечить с помощью композиций и способов, раскрытых в других частях данного документа.

Используемые в данном документе термины «лечение» или «осуществление лечения» включают любой положительный или необходимый эффект в отношении симптомов или патологических признаков заболевания или патологического состояния, и может включать даже небольшое снижение одного или более измеряемых маркеров

заболевания или состояния, подлежащего лечению. Лечение может необязательно подразумевать либо уменьшение проявления заболевания или состояния, либо задержку прогрессирования заболевания или состояния, *например* задержку роста опухоли. «Лечение» необязательно означает полное устранение или излечение заболевания или состояния, или связанных с ними симптомов.

Используемый в данном описании термин «предупреждать» и аналогичные слова, такие как «предупрежденный», «предупреждение» *и т. д.*, обозначают подход, обеспечивающий предупреждение, ингибирование или снижение вероятности возникновения или рецидива заболевания или состояния. Он также относится к отсрочке манифестации или рецидива заболевания или состояния или к отсрочке появления или рецидива симптомов заболевания или состояния. Используемый в данном документе термин «предупреждение» и аналогичные слова также включают снижение интенсивности, эффекта, симптомов и/или нагрузки заболевания или состояния до манифестации или рецидива заболевания или состояния.

Используемая в данном документе фраза «облегчение по меньшей мере одного симптома» относится к уменьшению интенсивности одного или более симптомов заболевания или состояния, от которого лечат субъекта. В конкретных вариантах осуществления заболевание или состояние, которое лечат, представляет собой рак, где один или более симптомов, которые облегчаются, включают без ограничения слабость, утомляемость, одышку, склонность к образованию синяков и кровотечения, частые инфекции, увеличение лимфатических узлов, вздутие живота или болезненный живот (из-за увеличения органов брюшной полости), боль в костях или суставах, переломы, незапланированную потерю веса, плохой аппетит, ночную потливость, постоянную умеренно повышенную температуру и ухудшение мочеиспускания (из-за нарушения функции почек).

Термины «усиливать», или «содействовать», или «увеличивать», или «повышать» в целом относятся к способности композиции, рассматриваемой в данном документе, вызывать, запускать или обуславливать более сильную физиологическую реакцию (*т. е.* последующие эффекты) по сравнению с реакцией, вызванной либо средой-носителем, либо контрольной молекулой/композицией. Измеряемая физиологическая реакция может включать усиление размножения, активации, персистенции Т-клеток, секреции ими цитокинов и/или повышение их способности вызывать цитолиз раковых

клеток, наряду с прочим, очевидным из понимания в уровне техники и описания в данном документе. «Повышенное» или «увеличенное» количество, как правило, представляет собой «статистически значимое» количество и может включать повышение, которое в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 или более раз (*например*, 500, 1000 раз) (включая все целые числа и десятичные знаки между ними, превышающие 1, *например*, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и *т. д.*) превышает значение ответа, получаемого при использовании среды-носителя или контрольной композиции.

Термины «Уменьшать», или «понижать», или «облегчать», или «снижать», или «ослаблять» в целом относятся к способности композиции, рассматриваемой в данном документе, вызывать, запускать или обуславливать более слабую физиологическую реакцию (*т. е.* последующие эффекты) по сравнению с реакцией, вызванной либо средой-носителем, либо контрольной молекулой/композицией. «Пониженное» или «уменьшенное» количество, как правило, представляет собой «статистически значимое» количество, и может включать уменьшение, которое в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 или более раз (*например*, 500, 1000 раз) (включая все целые числа и десятичные знаки между ними, превышающие 1, *например*, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и *т. д.*) меньше значения ответа (значения ответа, используемого для сравнения), полученного при использовании среды-носителя, контрольной композиции, или значения ответа в конкретной линии клеток.

Термины «поддерживать», или «сохранять», или «поддержание», или «без изменений», или «без существенных изменений», или «без существенного снижения» в целом относятся к способности композиции, рассматриваемой в данном документе, вызывать, запускать или обуславливать практически сходный или сопоставимый физиологический ответ (*т. е.* последующие эффекты) в клетке по сравнению с ответом, обусловленным либо средой-носителем, либо контрольной молекулой/композицией, или ответом в конкретной линии клеток. Сопоставимый ответ представляет собой ответ, который существенно не отличается или не отличается измеримо от значения ответа, используемого для сравнения.

Дополнительные определения изложены в данном раскрытии.

С. DARIC НА ОСНОВЕ VHH К CD33

В конкретных вариантах осуществления рассматривается рецептор DARIC, содержащий домен антитела VHH к CD33, который перенаправляет цитотоксичность иммунных эффекторных клеток на раковые клетки, экспрессирующие CD33. Используемые в данном документе термины «рецептор DARIC на основе VHH к CD33», «рецептор DARIC на основе антитела VHH к CD33», «DARIC на основе VHH к CD33» или «DARIC на основе антитела VHH к CD33» используются взаимозаменяемо и относятся к одному или более полипептидам, не встречающимся в природе, которые преобразовывают сигнал иммуностимуляции в эффекторной иммунной клетке после воздействия, осуществляемого клеткой-мишенью, экспрессирующей полноразмерный CD33 или сплайс-вариант CD33, и средством мультимеризации или мостиковым фактором, с обеспечением, *например*, стимуляции активности и функции иммунных эффекторных клеток, увеличения продукции и/или секреции провоспалительных цитокинов. В предпочтительных вариантах осуществления DARIC на основе VHH к CD33 представляет собой многоцепочечный химерный рецептор, содержащий компонент передачи сигналов DARIC и связывающий компонент DARIC, содержащий домен VHH, который распознает полноразмерный CD33 и/или сплайс-вариант CD33.

В одном варианте осуществления компонент передачи сигналов DARIC и связывающий компонент DARIC экспрессируются одной и той же клеткой. В другом варианте осуществления компонент передачи сигналов DARIC и связывающий компонент DARIC экспрессируются разными клетками. В конкретном варианте осуществления компонент передачи сигналов DARIC экспрессируется клеткой, а связывающий компонент DARIC доставляется извне в виде полипептида. В одном варианте осуществления связывающий компонент DARIC, предварительно нагруженный мостиковым фактором, доставляется извне в клетку, экспрессирующую компонент передачи сигналов DARIC.

1. КОМПОНЕНТ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ DARIC К CD33

Термины «компонент передачи сигналов DARIC», «компонент передачи сигналов DARIC к CD33», «полипептид передачи сигналов DARIC» или «компонент передачи сигналов DARIC» используются взаимозаменяемо и относятся к полипептиду, содержащему один или более доменов мультимеризации, трансмембранный домен и

один или более внутриклеточных доменов передачи сигналов. В конкретных вариантах осуществления компонент передачи сигналов DARIC содержит домен мультимеризации, трансмембранный домен, домен костимуляции и/или домен передачи первичного сигнала. В конкретных вариантах осуществления компонент передачи сигналов DARIC содержит первый домен мультимеризации, первый трансмембранный домен, первый домен костимуляции и/или домен передачи первичного сигнала.

В конкретных вариантах осуществления компонент передачи сигналов DARIC содержит один или более доменов мультимеризации.

Иллюстративные примеры доменов мультимеризации, подходящие для использования в конкретных компонентах передачи сигналов DARIC к CD33, рассматриваемых в данном документе, включают без ограничения полипептид FK506-связывающего белка (FKBP) или его варианты, FKBP-рапамицин-связывающий полипептид (FRB) или его варианты, полипептид кальциневрина или его варианты, полипептид циклофилина или его варианты, полипептид бактериальной дигидрофолатредуктазы (DHFR) или ее варианты, полипептид PYR1-подобного белка 1 (PYL1) или его варианты и полипептид белка нечувствительности к абсцизовой кислоте 1 (ABI1) или его варианты.

В конкретных вариантах осуществления компонент передачи сигналов DARIC к CD33 предусматривает полипептид FRB.

В конкретных предпочтительных вариантах осуществления компонент передачи сигналов DARIC к CD33 предусматривает полипептид FRB, содержащий мутацию T2098L, или его вариант. В определенных предпочтительных вариантах осуществления компонент передачи сигналов DARIC к CD33 предусматривает полипептид FKBP12 или его вариант.

В некоторых вариантах осуществления компонент передачи сигналов DARIC на основе VHH к CD33 содержит шарнирный домен.

Иллюстративные шарнирные домены, подходящие для использования в компоненте передачи сигналов DARIC на основе VHH к CD33, описанного в данном документе, включают шарнирную область, полученную из внеклеточных областей мембранных

белков типа 1, таких как CD28, CD8 α и CD4, которые могут представлять собой шарнирные области дикого типа из этих молекул или могут быть измененными.

В конкретных вариантах осуществления компонент передачи сигналов DARIC содержит трансмембранный домен.

В конкретных вариантах осуществления компонент передачи сигналов DARIC содержит шарнирный домен и трансмембранный домен.

Иллюстративные примеры трансмембранных доменов, подходящих для использования в конкретных компонентах передачи сигналов DARIC к CD33, рассматриваемых в данном документе, включают без ограничения трансмембранную(-е) область(-и) альфа-, бета-, гамма- или дельта-цепи рецептора Т-клеток, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD71, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154, белка амнионлес (AMN) и белка 1 запрограммированной гибели клеток (PDCD1). В предпочтительном варианте осуществления компонент передачи сигналов DARIC к CD33 содержит трансмембранный домен CD4. В предпочтительном варианте осуществления компонент передачи сигналов DARIC к CD33 содержит трансмембранный домен CD8 α .

В конкретных вариантах осуществления компонент передачи сигналов DARIC содержит линкер, который связывает С-конец трансмембранного домена с N-концом внутриклеточного домена передачи сигналов. В различных предпочтительных вариантах осуществления короткий олиго- или полипептидный линкер, предпочтительно длиной от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, связывает трансмембранный домен и внутриклеточный домен передачи сигналов. Линкер на основе глицина-серина является особенно подходящим линкером.

Компоненты передачи сигналов DARIC, рассматриваемые в конкретных вариантах осуществления в данном документе, содержат один или более внутриклеточных доменов передачи сигналов. В одном варианте осуществления компонент передачи сигналов DARIC к CD33 содержит один или более доменов передачи костимулирующего сигнала и/или доменов передачи первичного сигнала. В одном варианте осуществления внутриклеточный домен передачи сигналов содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

Иллюстративные примеры ITAM-содержащих доменов передачи первичного сигнала, которые подходят для использования в конкретных компонентах передачи сигналов DARIC к CD33, рассматриваемых в данном документе, включают без ограничения те, которые получены из TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В предпочтительных вариантах осуществления компонент передачи сигналов DARIC к CD33 содержит домен передачи первичного сигнала CD3 ζ и один или более доменов передачи костимулирующего сигнала. Домены передачи первичного сигнала и передачи костимулирующего сигнала могут быть присоединены в любом порядке последовательно к карбоксильному концу трансмембранного домена.

Иллюстративные примеры доменов костимуляции, подходящих для использования в конкретных компонентах передачи сигналов DARIC к CD33, рассматриваемых в данном документе, включают без ограничения домены, выделенные из следующих костимулирующих молекул: Toll-подобного рецептора 1 (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, представителя 11 семейства доменов рекрутирования каспаз (CARD11), CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD94, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), белка 10 активации DNAX (DAP10), представителя 1 семейства линкеров для активации Т-клеток (LAT), содержащего SH2-домен лейкоцитарного белка с молекулярной массой 76 кДа (SLP76), трансмембранного адаптера 1, ассоциированного с рецептором Т-клетки (TRAT1), TNFR2, представителя 14 суперсемейства рецепторов TNF (TNFRS14; HVEM), представителя 18 суперсемейства рецепторов TNF (TNFRS18; GITR), представителя 25 суперсемейства рецепторов TNF (TNFRS25; DR3) и дзета-цепи протеинкиназы 70, ассоциированной с рецептором Т-клетки (ZAP70).

В конкретных вариантах осуществления компонент передачи сигналов DARIC к CD33, рассматриваемый в данном документе, содержит сигнальный пептид. Иллюстративные примеры сигнальных пептидов, подходящих для использования, в частности компонентов передачи сигналов DARIC к CD33, включают без ограничения сигнальный полипептид тяжелой цепи IgG1, сигнальный полипептид легкой цепи Igk, сигнальный полипептид CD8 α или сигнальный полипептид альфа-субъединицы рецептора GM-CSF человека. В различных предпочтительных вариантах осуществления компонент передачи сигналов DARIC к CD33 содержит сигнальный полипептид CD8 α .

В конкретных вариантах осуществления компонент передачи сигналов DARIC к CD33 содержит один или более доменов передачи костимулирующего сигнала, выбранных из группы, состоящей из CD28, CD137 и CD134. В конкретных вариантах осуществления компонент передачи сигналов DARIC к CD33 содержит один или более доменов передачи костимулирующего сигнала, выбранных из группы, состоящей из CD28, CD137 и CD134, а также домен передачи первичного сигнала CD3 ζ . В конкретном варианте осуществления компонент передачи сигналов DARIC к CD33 содержит домен костимуляции CD137 и домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

В предпочтительном варианте осуществления компонент передачи сигналов DARIC к CD33 содержит домен мультимеризации FRB с T2098L, трансмембранный домен CD8 α , домен костимуляции CD137 и домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

В предпочтительных вариантах осуществления компонент передачи сигналов DARIC на основе VHH к CD33 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO 82.

2. СВЯЗЫВАЮЩИЙ КОМПОНЕНТ DARIC К CD33

Термины «связывающий компонент DARIC», «связывающий полипептид DARIC», «связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33» или «связывающий полипептид DARIC на основе VHH к CD33» используются взаимозаменяемо и относятся к полипептиду, содержащему домен антитела VHH к CD33 и один или более доменов мультимеризации. В конкретных вариантах осуществления связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит домен антитела VHH к CD33, домен мультимеризации и трансмембранный домен. В конкретных вариантах осуществления связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит домен антитела VHH к CD33, второй домен мультимеризации и второй трансмембранный домен. В других конкретных вариантах осуществления связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит домен антитела VHH к CD33, домен мультимеризации, трансмембранный домен и один или более внутриклеточных доменов передачи сигналов. В конкретных вариантах осуществления связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит домен антитела VHH к CD33, второй домен мультимеризации, второй трансмембранный домен и второй домен костимуляции.

В конкретных вариантах осуществления связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит один или более доменов антитела VHH к CD33.

В конкретных предпочтительных вариантах осуществления домен антитела VHH к CD33 представляет собой гуманизованное VHH верблюдовых. В конкретных вариантах осуществления домен антитела VHH к CD33 представляет собой гуманизованное VHH верблюдовых, которое связывает один или более эпитопов полноразмерного CD33 (например, SEQ ID NO: 1) или один или более эпитопов сплайс-варианта CD33. В конкретных вариантах осуществления домен антитела VHH к CD33 представляет собой гуманизованное VHH верблюдовых, которое связывает один и тот же эпитоп или несколько эпитопов, представленных как на полноразмерном CD33, так и на сплайс-варианте CD33.

В конкретных предпочтительных вариантах осуществления домен антитела VHH к CD33 представляет собой гуманизованное VHH верблюдовых, содержащее аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 3—6, 10—11, 13—16 и 20—21. В определенных предпочтительных вариантах осуществления домен антитела VHH к CD33 представляет собой гуманизованное VHH верблюдовых, содержащее аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10. В определенных предпочтительных вариантах осуществления домен антитела VHH к CD33 представляет собой гуманизованное VHH верблюдовых, содержащее аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20.

В конкретных вариантах осуществления связывающий компонент DARIC содержит один или более доменов мультимеризации.

Иллюстративные примеры доменов мультимеризации, подходящие для использования в конкретных связывающих компонентах DARIC на основе VHH к CD33, рассматриваемых в данном документе, включают без ограничения полипептид FKBP или его варианты, полипептид FRB или его варианты, полипептид кальциневрина или его варианты, полипептид циклофилина или его варианты, полипептид DHFR или ее варианты, полипептид PYL1 или его варианты и полипептид ABI1 или его варианты.

В конкретных вариантах осуществления связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит полипептид FRB или его вариант, и компонент передачи

сигналов DARIC содержит полипептид FKBP или его вариант. В предпочтительном варианте осуществления связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит полипептид FRB, содержащий мутацию T2098L, или его вариант, и компонент передачи сигналов DARIC содержит полипептид FKBP12 или его вариант.

В конкретных вариантах осуществления связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит полипептид FKBP или его вариант, и компонент передачи сигналов DARIC содержит полипептид FRB или его вариант. В предпочтительном варианте осуществления связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит полипептид FKBP12 или его вариант, и компонент передачи сигналов DARIC содержит полипептид FRB, содержащий мутацию T2098L, или его вариант.

В некоторых вариантах осуществления связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит шарнирный домен.

Иллюстративные шарнирные домены, подходящие для использования в связывающем компоненте DARIC на основе VHH к CD33, описанном в данном документе, включают шарнирную область, полученную из внеклеточных областей мембранных белков типа 1, таких как CD28, CD8 α и CD4, которые могут представлять собой шарнирные области дикого типа из этих молекул или могут быть измененными.

В конкретных вариантах осуществления связывающий компонент DARIC содержит трансмембранный домен. В конкретных вариантах осуществления связывающий компонент DARIC содержит шарнирный домен и трансмембранный домен. В одном варианте осуществления трансмембранный домен может быть таким же, как трансмембранный домен, используемый в компоненте передачи сигналов DARIC. В одном варианте осуществления трансмембранный домен может отличаться от трансмембранного домена, используемого в компоненте передачи сигналов DARIC.

Иллюстративные примеры трансмембранных доменов, подходящих для использования в конкретных связывающих компонентах DARIC на основе VHH к CD33, рассматриваемых в данном документе, включают без ограничения трансмембранную(-е) область(-и) альфа-, бета-, гамма- или дельта-цепи рецептора Т-клеток, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD71, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154, белка амнионлес (AMN) и белка 1 запрограммированной гибели клеток (PDCD1). В предпочтительном варианте

осуществления связывающий компонент DARIC к CD33 содержит трансмембранный домен CD8 α . В предпочтительном варианте осуществления связывающий компонент DARIC к CD33 содержит трансмембранный домен CD4.

В различных предпочтительных вариантах осуществления короткой олиго- или полипептидный линкер, предпочтительно длиной от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 до 10 аминокислот, связывает трансмембранный домен и внутриклеточный домен передачи сигналов. Линкер на основе глицина-серина является особенно подходящим линкером.

Связывающие компоненты DARIC, рассматриваемые в конкретных вариантах осуществления в данном документе, не содержат один или более внутриклеточных доменов передачи сигналов.

В других конкретных вариантах осуществления связывающие компоненты DARIC на основе VHH к CD33, рассматриваемые в данном документе, содержат один или более внутриклеточных доменов передачи сигналов. В предпочтительных вариантах осуществления, где связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 включает один или более внутриклеточных доменов передачи сигналов, которые отличаются от внутриклеточных доменов передачи сигналов, присутствующих в родственном компоненте передачи сигналов DARIC к CD33. В одном варианте осуществления связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит домен передачи костимулирующего сигнала.

Иллюстративные примеры доменов костимуляции, подходящих для использования в конкретных связывающих компонентах DARIC на основе VHH к CD33, рассматриваемых в данном документе, включают без ограничения те домены, которые выделены из следующих костимулирующих молекул: Toll-подобного рецептора 1 (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, представителя 11 семейства доменов рекрутирования каспаз (CARD11), CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD94, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), белка 10 активации DNAX (DAP10), представителя 1 семейства линкеров для активации Т-клеток (LAT), содержащего SH2-домен лейкоцитарного белка с молекулярной массой 76 кДа (SLP76), трансмембранного адаптера 1, ассоциированного с рецептором Т-клетки (TRAT1), TNFR2, представителя 14 суперсемейства рецепторов TNF (TNFRS14;

HVEM), представителя 18 суперсемейства рецепторов TNF (TNFRS18; GITR), представителя 25 суперсемейства рецепторов TNF (TNFRS25; DR3) и дзета-цепи протеинкиназы 70, ассоциированной с рецептором Т-клетки (ZAP70). В предпочтительных вариантах осуществления домен костимуляции происходит, получен или выделен из TNFR2 или OX40.

В конкретных вариантах осуществления связывающий компонент DARIC, рассматриваемый в данном документе, содержит сигнальный пептид. Иллюстративные примеры сигнальных пептидов, подходящих для использования, в частности, связывающих компонентов DARIC на основе VHH к CD33, включают без ограничения сигнальный полипептид тяжелой цепи IgG1, сигнальный полипептид легкой цепи Igk, сигнальный полипептид CD8 α или сигнальный полипептид альфа-субъединицы рецептора GM-CSF человека. В различных предпочтительных вариантах осуществления связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит сигнальный полипептид CD8 α .

В конкретных вариантах осуществления связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит домен VHH, который связывается с CD33, домен мультимеризации FKBP12 и трансмембранный домен CD4 и, необязательно, домен костимуляции.

В определенных вариантах осуществления связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит VHH, который связывается с CD33, и домен мультимеризации FKBP12.

В некоторых вариантах осуществления связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит домен VHH, содержащий аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 2—21, домен мультимеризации FKBP12 и трансмембранный домен CD4 и, необязательно, домен костимуляции.

В некоторых вариантах осуществления связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит домен VHH, содержащий аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 20, домен мультимеризации FKBP12 и трансмембранный домен CD4 и, необязательно, домен костимуляции.

В некоторых вариантах осуществления связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит домен VHH, содержащий аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 2—21, и домен мультимеризации FKBP12.

В некоторых вариантах осуществления связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит домен VHH, содержащий аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 20, и домен мультимеризации FKBP12.

В некоторых вариантах осуществления связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 22—31.

В некоторых вариантах осуществления связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 30.

3. Мостиковый фактор

Мостиковые факторы, рассматриваемые в конкретных вариантах осуществления в данном документе, опосредуют связывание компонента передачи сигналов DARIC к CD33 со связывающим компонентом DARIC на основе VHH к CD33 посредством доменов мультимеризации в соответствующих компонентах, или способствуют этому. Мостиковый фактор связывается с доменами мультимеризации и располагается между ними с обеспечением связывания компонента передачи сигналов DARIC к CD33 и связывающего компонента DARIC на основе VHH к CD33. В присутствии мостикового фактора связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 и компонент передачи сигналов DARIC к CD33 связываются и инициируют активность иммунной эффекторной клетки в отношении клетки-мишени, когда связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 связывается с CD33, экспрессируемым на клетке-мишени. В отсутствие мостикового фактора связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 не связывается с компонентом передачи сигналов DARIC к CD33, и DARIC на основе VHH к CD33 неактивен.

В конкретных вариантах осуществления компонент передачи сигналов DARIC к CD33 и связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержат когнатную пару

доменов мультимеризации, выбранных из группы, состоящей из FKBP и FKBP12-рапамицин-связывающего белка (FRB), FKBP и кальциневрина, FKBP и циклофилина, FKBP и бактериальной дигидрофолатредуктазы (DHFR), кальциневрина и циклофилина, а также PYR1-подобного белка 1 (PYL1) и белка 1 нечувствительности к абсцизовой кислоте (ABI1).

В некоторых вариантах осуществления домены мультимеризации компонентов передачи сигнала и связывания DARIC на основе VHH к CD33 связываются с мостиковым фактором, выбранным из группы, состоящей из рапамицина или его рапалога, кувермицина или его производного, гиббереллина или его производного, абсцизовой кислоты (ABA) или ее производного, метотрексата или его производного, циклоспорина А или его производного, FK506/циклоспорина А (FKCsA) или его производного и триметоприма (Tnp) - синтетического лиганда для FK506-связывающего белка (FKBP) (SLF) или его производного.

В конкретных вариантах осуществления компонент передачи сигналов DARIC к CD33 и связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержат один или более доменов мультимеризации FRB и/или FKBP или их вариантов. В определенных вариантах осуществления компонент передачи сигналов DARIC к CD33 содержит домен мультимеризации FRB или его вариант и связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит домен мультимеризации FKBP или его вариант. В конкретных предпочтительных вариантах осуществления компонент передачи сигналов DARIC к CD33 содержит домен мультимеризации FRB с T2098L или его вариант, а связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 содержит домены мультимеризации FKBP12 или FKBP12 с F36V или их вариант.

Иллюстративные примеры мостиковых факторов, подходящих для использования в конкретных вариантах осуществления, рассматриваемых в данном документе, включают без ограничения AP1903, AP20187, AP21967 (также известный как C-16-(S)-7-метилиндолрапамицин), эверолимус, новолимус, пимекролимус, ридафоролимус, такролимус, темсиролимус, умиролимус и зотаролимус. В конкретных предпочтительных вариантах осуществления мостиковый фактор представляет собой AP21967. В определенных предпочтительных вариантах осуществления мостиковый фактор представляет собой неиммуносуппрессивную дозу сиролимуса (рапамицина).

D. ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ К CD33

В конкретных вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки, рассматриваемые в данном документе, содержат CAR на основе антитела VHH к CD33. Химерные антигенные рецепторы (CAR) представляют собой молекулы, в которых объединена специфичность антитела к целевому антигену (*например*, опухолевому антигену) с внутриклеточным активирующим доменом Т-клеточного рецептора с получением химерного белка, который проявляет специфическую противоопухолевую клеточную иммунную активность. Используемый в данном документе термин «химерный» обозначает составленный из частей различных белков или ДНК из различных источников.

В конкретных вариантах осуществления Т-клетки конструируют посредством введения полинуклеотида, кодирующего CAR на основе антитела VHH к CD33.

В конкретных вариантах осуществления Т-клетки конструируют посредством введения вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий CAR на основе антитела VHH к CD33.

В различных вариантах осуществления CAR к CD33 содержит домен VHH, который связывает CD33, трансмембранный домен и один или более внутриклеточных доменов передачи сигналов. Основной характеристикой CAR является их способность перенаправлять специфичность иммунной эффекторной клетки, запуская тем самым пролиферацию, продукцию цитокинов, фагоцитоз или образование молекул, которые могут опосредовать клеточную гибель клетки, экспрессирующей целевой антиген, независимым от главного комплекса гистосовместимости (МНС) способом, с использованием специфических в отношении клетки нацеливающих способностей моноклональных антител, растворимых лигандов или специфических в отношении клетки корецепторов.

В некоторых вариантах осуществления CAR на основе антитела VHH к CD33 содержит спейсерный домен. В конкретных вариантах осуществления спейсерный домен содержит CH2 и CH3 из IgG1, IgG4 или IgD.

Иллюстративные шарнирные домены, подходящие для использования в CAR на основе антитела VHH к CD33, описанных в данном документе, включают шарнирную область,

полученную из внеклеточных областей мембранных белков типа 1, таких как CD28, CD8 α и CD4, которые могут представлять собой шарнирные области дикого типа из этих молекул или могут быть измененными. В другом варианте осуществления шарнирный домен содержит шарнирную область CD8 α .

Трансмембранный (ТМ) домен CAR объединяет внеклеточную связывающую часть и внутриклеточный домен передачи сигналов и прикрепляет CAR к плазматической мембране иммунной эффекторной клетки. ТМ-домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника.

Иллюстративные ТМ-домены могут быть получены из (т. е. содержать по меньшей мере трансмембранную область(-и)) альфа-, бета-, гамма или дельта-цепи Т-клеточного рецептора, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD71, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154, AMN и PDCD1.

В одном варианте осуществления CAR на основе антитела VHH к CD33 содержит ТМ-домен, полученный из CD8 α . В другом варианте осуществления CAR, рассмотренный в данном документе, содержит ТМ-домен, полученный из CD8 α , и короткий олиго- или полипептидный линкер длиной предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, который связывает ТМ-домен и внутриклеточный домен передачи сигнала CAR. Глицин-сериновый линкер является особенно подходящим линкером.

В предпочтительных вариантах осуществления CAR на основе антитела VHH к CD33 содержит внутриклеточный домен передачи сигнала, который содержит один или более доменов передачи костимулирующего сигнала и домен передачи первичного сигнала.

Домены передачи первичного сигнала, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать мотивы передачи сигнала, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ИТАМ.

Иллюстративные примеры ИТАМ, содержащих домены передачи первичных сигналов, которые подходят для использования в CAR на основе антитела VHH к CD33, рассмотренных в конкретных вариантах осуществления, включают ИТАМ, полученные из FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В конкретных предпочтительных вариантах осуществления CAR содержит домен передачи

первичного сигнала CD3 ζ и один или более доменов передачи костимулирующего сигнала. Внутриклеточные домены передачи первичного сигнала и передачи костимулирующего сигнала могут быть присоединены в любом порядке последовательно к карбоксильному концу трансмембранного домена.

В конкретных вариантах осуществления CAR на основе антитела VHH к CD33 содержит один или более доменов передачи костимулирующего сигнала для повышения эффективности и усиления размножения Т-клеток, экспрессирующих CAR-рецепторы.

Иллюстративные примеры таких костимулирующих молекул, подходящих для использования в CAR на основе антитела VHH к CD33, рассмотренных в конкретных вариантах осуществления, включают без ограничения TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD94, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, SLP76, TRAT1, TNFR2 и ZAP70. В одном варианте осуществления CAR содержит один или более доменов передачи костимулирующего сигнала, выбранных из группы, состоящей из CD28, CD137 и CD134, а также домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

В различных вариантах осуществления CAR на основе антитела VHH к CD33 содержит: VHH, который связывается с CD33; трансмембранный домен, выделенный из полипептида, выбранного из группы, состоящей из CD4, CD8 α , CD154 и PD-1; один или более внутриклеточных доменов передачи костимулирующего сигнала, выделенных из полипептида, выбранного из группы, состоящей из CD28, CD134 и CD137; и домен передачи сигнала, выделенный из полипептида, выбранного из группы, состоящей из FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

В различных вариантах осуществления CAR на основе антитела VHH к CD33 содержит: VHH, который связывается с CD33; трансмембранный домен, выделенный из полипептида, выбранного из группы, состоящей из CD4, CD8 α , CD154 и PD-1; один или более внутриклеточных доменов передачи костимулирующего сигнала, выделенных из полипептида, выбранного из группы, состоящей из CD28, CD134 и CD137; и домен передачи сигнала, выделенный из полипептида, выбранного из группы, состоящей из FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

В предпочтительных вариантах осуществления CAR на основе антитела VHH к CD33 содержит VHH, который содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 2—21, шарнирный домен CD8 α , трансмембранный домен CD8 α , домен костимуляции 4-1BB и домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

В предпочтительных вариантах осуществления CAR на основе антитела VHH к CD33 содержит VHH, который содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10, шарнирный домен CD8 α , трансмембранный домен CD8 α , домен костимуляции 4-1BB и домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

В конкретных вариантах осуществления CAR на основе антитела VHH к CD33 содержит последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 62—81.

В конкретных вариантах осуществления CAR на основе антитела VHH к CD33 содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 80.

Е. Полипептиды

В данном документе рассматриваются различные полипептиды, включая без ограничения DARIC на основе VHH к CD33, связывающие компоненты DARIC на основе VHH к CD33, компоненты передачи сигналов DARIC к CD33, CAR на основе антитела VHH к CD33 и их фрагменты. В предпочтительных вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 2—82. Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются взаимозаменяемо, если не указано обратное, и в соответствии с общепринятым значением, *т. е.* в качестве обозначения последовательности аминокислот. В одном варианте осуществления «полипептид» включает слитые полипептиды и другие варианты. Полипептиды могут быть получены с помощью любой из множества хорошо известных методик рекомбинации и/или синтеза. Полипептиды не ограничены определенной длиной, например, они могут содержать последовательность полноразмерного белка или фрагмента полноразмерного белка или слитого белка, и могут включать посттрансляционные модификации полипептида, например гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования и т. п., а также другие модификации, известные из уровня техники, как встречающиеся, так и не встречающиеся в природе. В конкретных предпочтительных вариантах осуществления

слитые полипептиды, полипептиды, фрагменты и другие их варианты синтезируют, получают или выделяют из одного или более полипептидов человека.

Выражения «выделенный пептид» или «выделенный полипептид» и т. п., используемые в данном документе, относятся к выделению и/или очистке *in vitro* пептидной или полипептидной молекулы из клеточного окружения, а также от связи с другими компонентами клетки, *т. е.* таким образом, что молекула в значительной степени не связана с веществами, с которыми она связана *in vivo*. В конкретных вариантах осуществления выделенный полипептид представляет собой синтетический полипептид, полусинтетический полипептид или полипептид, полученный или происходящий из рекомбинантного источника.

Полипептиды включают «варианты полипептида». Варианты полипептида могут отличаться от встречающегося в природе полипептида одной или более заменами, делециями, добавлениями и/или вставками. Такие варианты могут быть встречающимися в природе, *например* сплайс-вариант, или могут быть получены синтетическим путем, например посредством модификации одной или более упомянутых выше полипептидных последовательностей. Например, в конкретных вариантах осуществления может быть необходимым улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства полипептида посредством введения одной или более замен, делеций, добавлений и/или вставок в полипептид. В конкретных вариантах осуществления полипептиды включают полипептиды, характеризующиеся по меньшей мере приблизительно 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 86%, 97%, 98% или 99% аминокислотной идентичностью с любой из эталонных последовательностей, рассматриваемых в данном документе, при этом, как правило, вариант сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность эталонной последовательности. В конкретных вариантах осуществления биологическая активность представляет собой аффинность связывания. В конкретных вариантах осуществления биологическая активность представляет собой цитолитическую активность.

Варианты полипептидов включают биологически активные «полипептидные фрагменты». Иллюстративные примеры биологически активных полипептидных фрагментов включают домены антител VHH к CD33, внутриклеточные домены передачи сигналов и т. п.

Используемый в данном документе термин «биологически активный фрагмент» или «минимальный биологически активный фрагмент» относится к полипептидному фрагменту, который сохраняет по меньшей мере 100%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 10% или по меньшей мере 5% активности полипептида, встречающегося в природе. В определенных вариантах осуществления фрагмент полипептида может содержать аминокислотную цепь, длина которой составляет от по меньшей мере 5 до приблизительно 1700 аминокислот. Следует иметь в виду, что в определенных вариантах осуществления длина фрагментов составляет по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700 или больше аминокислот.

В конкретных вариантах осуществления полипептиды, представленные в данном документе, могут содержать одну или более аминокислот с обозначениями «X» или «Хаа», которые используются взаимозаменяемо. Если в аминокислотной SEQ ID NO присутствует «X», это обозначает любую одну или более аминокислот. В конкретных вариантах осуществления SEQ ID NO, обозначающие слитый белок, содержат последовательность непрерывных остатков X, которые в совокупности представляют любую аминокислотную последовательность. В конкретных вариантах осуществления «XX» представляет собой любую комбинацию двух аминокислот. В определенных вариантах осуществления «XX» представляет два серина, SS. В определенных вариантах осуществления «XX» представляет любую комбинацию двух аминокислот, которая обеспечивает снижение иммуногенности.

В предпочтительных вариантах осуществления «XX» представляет собой аминокислоты КР.

Как уже отмечалось выше, полипептиды могут быть изменены различными путями, в том числе включать аминокислотные замены, делеции, усечения и вставки. Способы таких манипуляций общеизвестны из уровня техники. Например, варианты аминокислотной последовательности эталонного полипептида могут быть получены посредством введения мутаций в ДНК. Способы мутагенеза и изменений нуклеотидной последовательности

хорошо известны из уровня техники. См., например, Kunkel (1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82: 488-492), Kunkel *et al.*, (1987, *Methods in Enzymol*, 154: 367-382), U.S. Pat. № 4873192, Watson, J. D. *et al.*, (*Molecular Biology of the Gene*, четвертое издание, Benjamin/Cummings, Менло-Парк, штат Калифорния, 1987 г.) и ссылочные документы, процитированные в них. Рекомендации, касающиеся подходящих аминокислотных замен, которые не влияют на биологическую активность представляющего интерес белка, можно найти в модели Dayhoff *et al.*, (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found.*, Вашингтон).

В определенных вариантах осуществления вариант полипептида содержит одну или более консервативных замен. «Консервативной заменой» является та, при которой аминокислота замещена на другую аминокислоту, которая характеризуется аналогичными свойствами, вследствие чего специалист в области техники, связанной с химией пептидов, может ожидать, что вторичная структура и гидрофобная природа полипептида практически не изменятся. В структуре полинуклеотидов и полипептидов, рассмотренных в конкретных вариантах осуществления, можно выполнять модификации и, тем не менее, получать функциональную молекулу, которая кодирует вариантный или производный полипептид с необходимыми характеристиками. Когда необходимо изменить аминокислотную последовательность полипептида для создания эквивалентного или даже улучшенного вариантного полипептида, специалист в данной области, например, может изменить один или более кодонов кодирующей ДНК-последовательности, *например*, в соответствии с таблицей 1.

ТАБЛИЦА 1. Кодоны аминокислот

Аминокислоты	Однобук- венный код	Трехбук- венный код	Кодоны			
Аланин	A	Ala	GCA	GCC	GCG	GCU
Цистеин	C	Cys	UGC	UGU		
Аспарагиновая кислота	D	Asp	GAC	GAU		
Глутаминовая кислота	E	Glu	GAA	GAG		

Фенилаланин	F	Phe	UUC	UUU				
Глицин	G	Gly	GGA	GGC	GGG	GGU		
Гистидин	H	His	CAC	CAU				
Изолейцин	I	Iso	AUA	AUC	AUU			
Лизин	K	Lys	AAA	AAG				
Лейцин	L	Leu	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Метионин	M	Met	AUG					
Аспарагин	N	Asn	AAC	AAU				
Пролин	P	Pro	CCA	CCC	CCG	CCU		
Глутамин	Q	Gln	CAA	CAG				
Аргинин	R	Arg	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Серин	S	Ser	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Треонин	T	Thr	ACA	ACC	ACG	ACU		
Валин	V	Val	GUA	GUC	GUG	GUU		
Триптофан	W	Trp	UGG					
Тирозин	Y	Tyr	UAC	UAU				

Рекомендации по определению того, какие аминокислотные остатки можно заменить, вставить или удалить без потери биологической активности, можно найти с использованием компьютерных программ, хорошо известных из уровня техники, таких как программное обеспечение DNASTAR, DNA Strider, Geneious, Mac Vector или Vector NTI. Предпочтительно аминокислотные изменения в вариантах белка, раскрытых в данном документе, представляют собой консервативные аминокислотные изменения, *т. е.* замены на аналогично заряженные или незаряженные аминокислоты. Консервативное аминокислотное изменение предусматривает замену в пределах одного семейства аминокислот, которые имеют сходные боковые цепи. Встречающиеся в природе аминокислоты, как правило, подразделяют на четыре семейства: кислотные (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 выделяют в качестве группы ароматических аминокислот. Подходящие консервативные замены аминокислот в пептиде или белке известны специалистам в данной области техники и, как правило, их можно выполнять без изменения биологической активности полученной молекулы. Специалистам в данной области техники будет понятно, что, как правило, одиночные аминокислотные замены в несущественных областях полипептида практически не изменяют биологическую активность (см., например, *Watson et al. Molecular Biology of the Gene*, 4-е издание, 1987 г., The Benjamin/Cummings Pub. Co., стр. 224).

В одном варианте осуществления, в котором необходима экспрессия двух или более полипептидов, полинуклеотидные последовательности, кодирующие их, можно разделять с помощью последовательности IRES или полинуклеотидной последовательности, кодирующей последовательность, обеспечивающую прорыв рибосомы, которая раскрыта в данном документе в другом месте.

Полипептиды, рассматриваемые в конкретных вариантах осуществления, включают слитые полипептиды. В конкретных вариантах осуществления предусмотрены слитые полипептиды и полинуклеотиды, кодирующие слитые полипептиды. Слитыми полипептидами и белками слияния называют полипептид, который имеет по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять полипептидных сегментов. В предпочтительных вариантах осуществления слитый полипептид содержит один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33. В других предпочтительных вариантах осуществления слитый полипептид содержит один или более DARIC на основе VHH к CD33.

В другом варианте осуществления два или более компонента DARIC на основе VHH к CD33 и/или другие полипептиды могут экспрессироваться в качестве слитого белка, который содержит одну или более саморасщепляющихся пептидных последовательностей между полипептидами, как раскрыто в данном документе в другом месте.

В конкретных вариантах осуществления слитый полипептид содержит компонент передачи сигналов DARIC к CD33, последовательность саморасщепляющегося полипептида или последовательность, обеспечивающую прорыв рибосомы, и связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33.

В конкретных вариантах осуществления слитый полипептид содержит компонент передачи сигналов DARIC к CD33, последовательность саморасщепляющегося полипептида или последовательность, обеспечивающую проскок рибосомы, связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33, другую последовательность саморасщепляющегося полипептида или последовательность, обеспечивающую проскок рибосомы, и другой связывающий компонент DARIC, который направлен на другой антиген-мишень.

Слитые полипептиды могут содержать один или более полипептидных доменов или сегментов, включая без ограничения сигнальные пептиды, домены проникающих в клетки пептидов (CPP), связывающие домены, домены передачи сигналов и *т. д.*, эпитопные метки (*например*, мальтозо-связывающий белок («MBP»)), глутатион-S-трансферазу (GST), HIS6, MYC, FLAG, V5, VSV-G и HA), полипептидные линкеры и сигналы расщепления полипептидов. Слитые полипептиды, как правило, присоединены С-концом к N-концу, хотя они также могут быть присоединены С-концом к С-концу, N-концом к N-концу или N-концом к С-концу. В конкретных вариантах осуществления полипептиды в слитом белке могут находиться в любом порядке. Слитые полипептиды или слитые белки могут также включать консервативно модифицированные варианты, полиморфные варианты, аллели, мутанты, подпоследовательности и межвидовые гомологи, при условии сохранения необходимой активности слитого полипептида. Слитые полипептиды можно получать с помощью способов химического синтеза, или с помощью химического связывания двух фрагментов, или, как правило, можно получать с помощью других стандартных методик. Лигированные последовательности ДНК, кодирующие слитый полипептид, функционально связаны с подходящими элементами контроля транскрипции или трансляции, как раскрыто в других частях данного документа.

Слитые полипептиды могут необязательно содержать один или более линкеров, которые можно использовать для связывания одного или более полипептидов или доменов внутри полипептида. Последовательность пептидного линкера может быть использована для разделения любых двух или более полипептидных компонентов на расстояние, достаточное для обеспечения того, чтобы каждый полипептид складывался в свои соответствующие вторичные и третичные структуры, чтобы позволить полипептидным доменам выполнять свои необходимые функции. Такую пептидную линкерную последовательность включают в слитый полипептид с использованием стандартных методов в данной области техники. Подходящие пептидные линкерные

последовательности могут быть выбраны на основании следующих факторов: (1) их способности принимать гибкую вытянутую конформацию; (2) их неспособности принимать вторичную структуру, которая могла бы взаимодействовать с функциональными эпитопами на первом и втором полипептидах; и (3) отсутствия гидрофобных или заряженных остатков, которые могли бы реагировать с полипептидными функциональными эпитопами. В конкретных вариантах осуществления предпочтительные пептидные линкерные последовательности содержат остатки Gly, Asn и Ser. Другие почти нейтральные аминокислоты, такие как Thr и Ala, также могут быть использованы в линкерной последовательности. Аминокислотные последовательности, которые можно успешно использовать в качестве линкеров, включают последовательности, раскрытые в Maratea *et al.*, *Gene* 40:39-46, 1985; Murphy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8258-8262, 1986; патент США № 4935233 и патент США № 4751180. Линкерные последовательности не требуются, если конкретный сегмент слитого полипептида содержит несущественные N-концевые аминокислотные области, которые можно использовать для разделения функциональных доменов и предупреждения пространственного влияния. В конкретных вариантах осуществления предпочтительные линкеры, как правило, представляют собой гибкие аминокислотные подпоследовательности, которые синтезируются в качестве части рекомбинантного слитого белка. Длина линкерных полипептидов может составлять от 1 до 200 аминокислот, от 1 до 100 аминокислот или от 1 до 50 аминокислот, включая все целые числа между ними.

Примеры сигналов расщепления полипептида включают сайты распознавания для расщепления полипептида, такие как сайты расщепления для протеазы, сайты расщепления для нуклеазы (*например*, сайты распознавания для редкощеплящего фермента рестрикции, сайты распознавания для саморасщепляющихся рибозимов) и саморасщепляющиеся вирусные олигопептиды (*см.* deFelipe and Ryan, 2004. *Traffic*, 5(8); 616-26).

Подходящие сайты расщепления для протеазы и саморасщепляющихся пептидов хорошо известны специалисту в данной области техники (*см.*, *например*, в Ryan *et al.*, 1997. *J. Gener. Virol.* 78, 699-722; Scymczak *et al.* (2004) *Nature Biotech.* 5, 589-594). Примеры сайтов расщепления для протеазы включают без ограничения сайты расщепления для N1a-протеаз потивируса (*например*, протеаза вируса гравировки табака), HC-протеаз потивируса, P1 (P35)-протеаз потивируса, N1a-протеаз бимовируса, RNA-2-кодируемых протеаз бимовируса, L-протеаз афтоввируса, 2A-протеаз энтеровируса, 2A-протеаз риновируса, 3C-

протеаз пикорнавируса, 24К-протеаз комовируса, 24К-протеаз неовируса, 3С-подобной протеазы RTSV (сферический вирус тунгро риса), 3С-подобной протеазы PYVF (вирус желтой пятнистости пастернака), гепарина, тромбина, фактора Ха и энтерокиназы. В одном варианте осуществления вследствие высокой точности расщепления предпочтительными являются сайты расщепления для протеазы TEV (вирус гравировки табака), *например* EXXYXQ(G/S) (SEQ ID NO:95), например ENLYFQG (SEQ ID NO:96) и ENLYFQS (SEQ ID NO:97), где X представляет собой любую аминокислоту (расщепление посредством TEV происходит между Q и G или Q и S).

В конкретных вариантах осуществления сигнал расщепления полипептида представляет собой вирусный саморасщепляющийся пептид или последовательность, обеспечивающую прорыв рибосомы.

Иллюстративные примеры последовательностей, обеспечивающих прорыв рибосомы, включают без ограничения: 2А-сайт или 2А-подобный сайт, последовательность или домен (Donnelly *et al.*, 2001. *J. Gen. Virol.* 82:1027-1041). В конкретном варианте осуществления вирусный пептид 2А представляет собой пептид 2А афтовируса, пептид 2А потивируса или пептид 2А кардиовируса.

В одном варианте осуществления вирусный пептид 2А выбран из группы, состоящей из пептида 2А вируса ящура (FMDV), пептида 2А вируса ринита А лошадей (ERAV), пептида 2А вируса *Thosea asigna* (TaV), пептида 2А свиного тесковируса-1 (PTV-1), пептида 2А тейловируса и пептида 2А вируса энцефаломиокардита.

Иллюстративные примеры сайтов 2А представлены в таблице 2.

ТАБЛИЦА 2

SEQ ID NO: 98	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO: 99	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO: 100	LLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO: 101	GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP
SEQ ID NO: 102	EGRGSLTTCGDVEENPGP
SEQ ID NO: 103	LLTTCGDVEENPGP

SEQ ID NO: 104	GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 105	QCTNYALLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 106	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 107	GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 108	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 109	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 110	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 111	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 112	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 113	NFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 114	QLLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 115	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 116	VTELLYRMKRAETYCPRLLAHPTEARHKQKIVAPVKQT
SEQ ID NO: 117	LNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 118	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 119	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

В предпочтительных вариантах осуществления полипептид или слитый полипептид содержат один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33, DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33.

В предпочтительных вариантах осуществления слитый полипептид содержит компонент передачи сигналов DARIC к CD33 и связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33, разделенные последовательностью саморасщепляющегося полипептида.

В конкретных вариантах осуществления слитый полипептид содержит последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 32—61. В конкретных вариантах осуществления слитый полипептид содержит последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 40, 50 или 60.

В конкретных вариантах осуществления слитый полипептид содержит компонент передачи сигналов DARIC к CD33, содержащий домен мультимеризации FRB с T2098L, трансмембранный домен CD8 α , домен костимуляции CD137 и домен передачи первичного сигнала CD3 ζ ; вирусный саморасщепляющийся полипептид 2A; и связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33, содержащий антитело VHH к CD33, полипептид домена мультимеризации FKBP12 и трансмембранный домен CD4.

В конкретных вариантах осуществления слитый полипептид содержит последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 32—41. В конкретных вариантах осуществления слитый полипептид содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO: 40.

В конкретных вариантах осуществления слитый полипептид содержит компонент передачи сигналов DARIC к CD33, содержащий домен мультимеризации FRB с T2098L, трансмембранный домен CD8 α , домен костимуляции CD137 и домен передачи первичного сигнала CD3 ζ ; вирусный саморасщепляющийся полипептид 2A; и антитело VHH к CD33, трансмембранный домен CD4 и необязательно домен костимуляции CD27, CD28, TNFRS14, TNFRS18, TNFRS25, OX40 или TNFR2.

В конкретных вариантах осуществления слитый полипептид содержит последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 42—51. В конкретных вариантах осуществления слитый полипептид содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO: 50.

В конкретных вариантах осуществления слитый полипептид содержит последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 52—61. В конкретных вариантах осуществления слитый полипептид содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO: 60.

Г. Полинуклеотиды

В конкретных вариантах осуществления предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие DARIC на основе VHH к CD33, связывающие компоненты DARIC на основе VHH к CD33, компоненты передачи сигналов DARIC к CD33, CAR на основе антитела VHH к CD33 и их фрагменты. Используемые в данном документе термины «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота» относятся к дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК),

рибонуклеиновой кислоте (РНК) и гибридам ДНК/РНК. Полинуклеотиды могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, а также рекомбинантными, синтетическими или выделенными. Полинуклеотиды включают без ограничения: пре-матричную РНК (пре-мРНК), матричную РНК (мРНК), РНК, синтетическую РНК, синтетическую мРНК, геномную ДНК (гДНК), ДНК, амплифицированную с помощью ПЦР, комплементарную ДНК (кДНК), синтетическую ДНК или рекомбинантную ДНК. Полинуклеотиды относятся к полимерной форме нуклеотидов длиной по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 400, по меньшей мере 500, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 5000, по меньшей мере 10000 или по меньшей мере 15000 или больше нуклеотидов, представляющих собой либо рибонуклеотиды, либо дезоксирибонуклеотиды, либо модифицированную форму любого типа нуклеотидов, а также все промежуточные значения длины. Нетрудно понять, что «промежуточные значения длины» в данном контексте означает любую длину между приведенными значениями, например 6, 7, 8, 9 и т. д., 101, 102, 103 и т. д.; 151, 152, 153 и т. д.; 201, 202, 203 и т. д. В конкретных вариантах осуществления полинуклеотиды или варианты полинуклеотидов характеризуются по меньшей мере или приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью.

Используемое в данном документе выражение «выделенный полинуклеотид» относится к полинуклеотиду, который был очищен от последовательностей, которые фланкируют его во встречающемся в природе состоянии, *например* к ДНК-фрагменту, который был освобожден от последовательностей, которые в норме расположены рядом с данным фрагментом. В конкретных вариантах осуществления «выделенный полинуклеотид» относится также к комплементарной ДНК (кДНК), рекомбинантной ДНК или другому полинуклеотиду, который не существует в природе и который был создан человеком. В конкретных вариантах осуществления выделенный полинуклеотид представляет собой синтетический полинуклеотид, полусинтетический полинуклеотид или полинуклеотид, полученный или происходящий из рекомбинантного источника.

В различных вариантах осуществления полинуклеотид предусматривает мРНК, кодирующую полипептид, рассматриваемый в данном документе. В определенных

вариантах осуществления мРНК содержит кэп, один или более нуклеотидов и поли(А) хвост.

В конкретных вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 могут быть кодон-оптимизированными. Используемый в данном документе термин «кодон-оптимизированный» относится к замене кодонов в полинуклеотиде, кодирующем полипептид, с целью увеличения уровня экспрессии, стабильности и/или активности полипептида. Факторы, которые влияют на оптимизацию кодонов, включают без ограничения один или более из (i) вариации смещения кодонов между двумя или более организмами или генами, или относительно синтетически построенных таблиц смещения, (ii) вариации по степени смещения кодонов в организме, гене или наборе генов, (iii) систематической вариации контекста, содержащего кодоны, (iv) вариации кодонов в соответствии с их декодирующими тРНК, (v) вариации кодонов в соответствии с % GC, либо в целом, либо в одной позиции триплета, (vi) вариации по степени сходства с эталонной последовательностью, например встречающейся в природе последовательностью, (vii) вариации по граничной частоте кодонов, (viii) структурных свойств мРНК, транскрибируемых из последовательности ДНК, (ix) предварительных сведений о функции последовательностей ДНК, на которых должны основываться при разработке набора замен кодонов, (x) систематической вариации наборов кодонов для каждой аминокислоты и/или (xi) изолированного удаления ложных сайтов инициации трансляции.

Используемый в данном документе термин «нуклеотид» относится к гетероциклическому азотистому основанию в N-гликозидной связи с фосфорилированным сахаром. Подразумевается, что нуклеотиды включают природные основания и широкий спектр признанных в данной области техники модифицированных оснований. Такие основания обычно расположены в положении 1' сахарного фрагмента нуклеотида. Нуклеотиды обычно содержат основание, сахар и фосфатную группу. В рибонуклеиновой кислоте (РНК) сахар представляет собой рибозу, а в дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК) сахар представляет собой дезоксирибозу, *т. е.* сахар, лишенный гидроксильной группы, которая присутствует в рибозе.

Иллюстративные примеры полинуклеотидов включают без ограничения полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, представленные под SEQ ID NO: 2—82.

В различных иллюстративных вариантах осуществления полинуклеотиды, рассматриваемые в данном документе, включают без ограничения полинуклеотиды, кодирующие один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33, рецепторы DARIC на основе VHH к CD33, CAR на основе антитела VHH к CD33, слитые полипептиды и векторы экспрессии, вирусные векторы и плазмиды-переносчики, содержащие рассматриваемые в данном документе полинуклеотиды.

Используемые в данном документе термины «вариант полинуклеотида» и «вариант» и т. п. относятся к полинуклеотидам, проявляющим существенную идентичность последовательности с эталонной полинуклеотидной последовательностью, или с полинуклеотидами, которые гибридизуются с эталонной последовательностью в жестких условиях, которые определены ниже в данном документе. Данные термины также охватывают полинуклеотиды, которые отличаются от эталонного полинуклеотида добавлением, делецией, заменой или модификацией по меньшей мере одного нуклеотида. Соответственно, термины «вариант полинуклеотида» и «вариант» включают полинуклеотиды, в которых один или более нуклеотидов были добавлены или удалены, или модифицированы, или заменены другими нуклеотидами. При этом из уровня техники хорошо известно, что определенные изменения, в том числе мутации, добавления, делеции и замены, можно выполнять относительно эталонного полинуклеотида, при условии что измененный полинуклеотид сохраняет биологическую функцию или активность эталонного полинуклеотида.

Формулировки «идентичность последовательностей» или содержащие, например, фразы «последовательность на 50% идентична», используемые в данном документе, относятся к степени, с которой данные последовательности являются идентичными при попарном сравнении нуклеотидов или попарном сравнении аминокислот в окне сравнения. Таким образом, «процентное значение идентичности последовательностей» можно рассчитать путем сравнения двух последовательностей, подвергнутых оптимальному выравниванию в окне сравнения, определения числа положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты (*например*, А, Т, С, G, I) или идентичный аминокислотный остаток (*например*, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys и Met) встречаются в обеих последовательностях с получением на выходе числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения (*т. е.* размер окна) и умножения результата на 100 с получением на выходе процентного

значения идентичности последовательностей. Включены нуклеотиды и полипептиды, характеризующиеся по меньшей мере приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 86%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из эталонных последовательностей, описанных в данном документе.

Полинуклеотиды, рассматриваемые в данном документе, независимо от длины кодирующей последовательности как таковой, можно объединять с другими последовательностями ДНК, такими как промоторы и/или энхансеры, нетранслируемые области (UTR), сигнальные последовательности, последовательности Козак, сигналы полиаденилирования, дополнительные сайты для ферментов рестрикции, сайты множественного клонирования, сайты внутренней посадки рибосомы (IRES), сайты распознавания для рекомбиназ (*например*, сайты LoxP, FRT и Att), стоп-кодоны, сигналы терминации транскрипции и полинуклеотиды, кодирующие саморасщепляющиеся полипептиды, эпитопные метки, описанные в других частях данного документа или известные из уровня техники, так что их общая длина может значительно изменяться. В связи с этим предполагается, что может быть использован полинуклеотидный фрагмент практически любой длины, при этом общая длина предпочтительно ограничивается простотой получения и применения в протоколе для предполагаемой рекомбинантной ДНК.

Полинуклеотиды могут быть получены, подвергнуты манипуляциям, экспрессированы и/или доставлены с помощью любой из множества общепризнанных методик, известных и доступных из уровня техники. Чтобы экспрессировать необходимый полипептид, нуклеотидную последовательность, кодирующую данный полипептид, можно встроить в соответствующий вектор.

Иллюстративные примеры векторов включают без ограничения плазмиду, автономно реплицирующиеся последовательности и мобильные генетические элементы, *например*, «Спящая красавица», PiggyBac.

Дополнительные иллюстративные примеры векторов включают без ограничения плазмиды, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы, такие как дрожжевая искусственная хромосома (YAC), бактериальная искусственная хромосома (BAC) или

искусственная хромосома, полученная из P1 (PAC), бактериофаги, такие как фаг лямбда или фаг M13, а также вирусы животных.

Иллюстративные примеры вирусов, применимых в качестве векторов, включают без ограничения ретровирус (в том числе лентивирус), аденовирус, аденоассоциированный вирус, герпесвирус (*например*, вирус простого герпеса), поксвирус, бакуловирус, папилломавирус и паповавирус (*например*, SV40).

Иллюстративные примеры векторов экспрессии включают без ограничения векторы pCneo (Promega) для экспрессии в клетках млекопитающих; pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ и pLenti6.2/V5-GW/lacZ (Invitrogen) для опосредованного лентивирусами переноса генов и экспрессии в клетках млекопитающих. В конкретных вариантах осуществления кодирующие последовательности полипептидов, раскрытые в данном документе, могут быть лигированы в такие векторы экспрессии для экспрессии полипептидов в клетках млекопитающих.

В конкретных вариантах осуществления вектор представляет собой эписомный вектор или вектор, который поддерживается экстрахромосомно. Используемый в данном документе термин «эписомный» относится к вектору, который способен реплицироваться без встраивания в хромосомную ДНК хозяина и без постепенной утраты из делящейся клетки-хозяина, что также означает, что указанный вектор реплицируется экстрахромосомно или эписомально.

«Последовательности контроля экспрессии» или «регуляторные последовательности», присутствующие в векторе экспрессии, представляют собой такие нетранслируемые области вектора, которые содержат точку начала репликации, кассеты для отбора, промоторы, энхансеры, сигналы инициации трансляции (последовательность Шайна-Дальгарно или последовательность Козак), интроны, последовательность полиаденилирования, 5'- и 3'-нетранслируемые области, все из которых взаимодействуют с белками клетки-хозяина для осуществления транскрипции и трансляции. Такие элементы могут отличаться по своей силе и специфичности. В зависимости от используемых векторной системы и хозяина можно использовать любое число подходящих элементов транскрипции и трансляции, в том числе универсальные промоторы и индуцируемые промоторы.

В конкретных вариантах осуществления полинуклеотид предусматривает вектор, включая без ограничения векторы экспрессии и вирусные векторы. Вектор может содержать одну или больше экзогенных, эндогенных или гетерологичных контрольных последовательностей, таких как промоторы и/или энхансеры. «Эндогенная последовательность контроля» представляет собой последовательность, которая в природных условиях связана с данным геном в геноме. «Экзогенная последовательность контроля» представляет собой последовательность, которая помещена смежно с геном посредством манипуляции с генами (*m. e.*, методик молекулярной биологии), таким образом, что транскрипция данного гена направляется связанным энхансером/промотором. «Гетерологичная последовательность контроля» представляет собой экзогенную последовательность, которая происходит от вида, отличного от вида, из которого происходит клетка, подвергаемая генетическим манипуляциям. «Синтетическая» контрольная последовательность может содержать элементы еще одной эндогенной и/или экзогенной последовательности и/или последовательности, определенные *in vitro* или *in silico*, которые обеспечивают оптимальную активность промотора и/или энхансера для конкретной терапии.

Термин «промотор», используемый в данном документе, относится к сайту распознавания полинуклеотида (ДНК или РНК), с которым связывается РНК-полимераза. РНК-полимераза инициирует и транскрибирует полинуклеотиды, функционально связанные с промотором. В конкретных вариантах осуществления промоторы, активные в клетках млекопитающих, содержат богатую АТ область, расположенную примерно на 25—30 оснований выше сайта инициации транскрипции, и/или другую последовательность, обнаруживаемую на 70—80 оснований выше начала транскрипции, область CNCAAT, где N может представлять собой любой нуклеотид.

Термин «энхансер» относится к сегменту ДНК, который содержит последовательности, способные обеспечивать усиленную транскрипцию и, в некоторых случаях, способные функционировать независимо от их ориентации относительно другой последовательности контроля. Энхансер может функционировать совместно или аддитивно с промоторами и/или другими энхансерными элементами. Термин «промотор/энхансер» относится к сегменту ДНК, который содержит последовательности, способные обеспечивать как промоторные, так и энхансерные функции.

Термин «функционально связанный» относится к смежному положению, при котором описанные компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать надлежащим им образом. В одном варианте осуществления термин относится к функциональной связи между последовательностью контроля экспрессии нуклеиновой кислоты (такой как промотор и/или энхансер) и второй полинуклеотидной последовательностью, например полинуклеотидом, представляющим интерес, где последовательность контроля экспрессии обеспечивает транскрипцию нуклеиновой кислоты, соответствующей второй последовательности.

Используемый в данном документе термин «последовательность контроля конститутивной экспрессии» относится к промотору, энхансеру или промотору/энхансеру, который непрерывно или постоянно обеспечивает возможность транскрипции функционально связанной последовательности. Последовательность контроля конститутивной экспрессии может представлять собой «универсальный» промотор, энхансер или промотор/энхансер, которые обеспечивают возможность экспрессии в самых различных типах клеток и тканей, или «специфический в отношении клетки», «специфический в отношении типа клеток», «специфический в отношении линии клеток» или «специфический в отношении ткани» промотор, энхансер или промотор/энхансер, которые обеспечивают возможность экспрессии в ограниченном количестве типов клеток и тканей, соответственно.

Иллюстративные универсальные последовательности контроля экспрессии, подходящие для применения в конкретных вариантах осуществления, включают без ограничения немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), вирусный промотор вируса обезьян 40 (SV40) (*например*, ранний или поздний), промотор LTR вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV), LTR вируса саркомы Рауса (RSV), промотор вируса простого герпеса (HSV) (тимидинкиназы), промоторы H5, P7.5 и P11 вируса коровьей оспы, промотор фактора элонгации 1-альфа (EF1a), фактора раннего ростового ответа 1 (EGR1), ферритина H (FerH), ферритина L (FerL), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), фактора инициации трансляции эукариот 4A1 (EIF4A1), белка 5 теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (HSPA5), белка теплового шока бета с молекулярной массой 90 кДа, представителя 1 (HSP90B1), белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (HSP70), β -кинезина (β -KIN), локуса ROSA 26 человека (Irions *et al.*, *Nature Biotechnology* 25, 1477 - 1482 (2007)), промотор убиквитина С (UBC), промотор фосфоглицераткиназы-1 (PGK), энхансер

цитомегаловируса/промотор куриного β -актина (CAG), промотор β -актина и промотор U3 (MND) с энхансером вируса миелопролиферативной саркомы, с удаленным участком отрицательного контроля, с сайтом связывания праймера, замещенным на последовательность из dl587rev (Haas *et al. Journal of Virology*. 2003;77(17): 9439-9450).

В одном варианте осуществления вектор содержит промотор MNDU3.

В одном варианте осуществления вектор содержит промотор EF1a, содержащий первый интрон гена EF1a человека.

В одном варианте осуществления вектор содержит промотор EF1a, не содержащий первый интрон гена EF1a человека.

В конкретном варианте осуществления может быть необходимо использовать контрольную последовательность, обеспечивающую экспрессию, специфическую в отношении клетки, типа клеток, линии клеток или ткани, для достижения экспрессии необходимой полинуклеотидной последовательности, специфической в отношении типа клеток, специфической в отношении линии клеток или специфической в отношении ткани (например, для экспрессии конкретной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, только в субпопуляции типов клеток, линий клеток или тканей, или во время специфических стадий развития).

В конкретном варианте осуществления может быть необходима экспрессия полинуклеотида с помощью специфического в отношении Т-клеток промотора.

Используемая в данном документе «условная экспрессия» может относиться к любому типу условной экспрессии, в том числе без ограничения индуцируемой экспрессии; подавляемой экспрессии; экспрессии в клетках или тканях, характеризующихся конкретным физиологическим, биологическим или болезненным состоянием *и т. д.* Данное определение не предназначено для исключения экспрессии, специфической в отношении типа клеток или ткани. В определенных вариантах осуществления предусмотрена условная экспрессия полинуклеотида, представляющего интерес, *например* экспрессия контролируется путем воздействия на клетку, ткань, организм *и т. д.* с помощью средства обработки или условия, которые обуславливают экспрессию полинуклеотида или которые обуславливают повышение или снижение уровня экспрессии полипептида, кодируемого полинуклеотидом, представляющим интерес.

Иллюстративные примеры индуцируемых промоторов/систем включают без ограничения промоторы, индуцируемые стероидами, такие как промоторы генов, кодирующих глюкокортикоидные или эстрогеновые рецепторы (индуцируемые путем обработки соответствующим гормоном), промотор металлотионеина (индуцируемый путем обработки различными тяжелыми металлами), промотор MX-1 (индуцируемый интерфероном), мифепристон-регулируемая система «GeneSwitch» (Sirin *et al.*, 2003, *Gene*, 323:67), кумат-индуцируемый переключатель генов (WO 2002/088346), тетрациклин-зависимые регуляторные системы *и т. д.* Индуцирующие средства включают без ограничения глюкокортикоиды, эстрогены, мифепристон (RU486), металлы, интерфероны, малые молекулы, кумат, тетрациклин, доксициклин и их варианты.

Используемый в данном документе термин «сайт внутренней посадки рибосомы» или «IRES» относится к элементу, который обеспечивает посадку кодона инициации, такого как ATG, цистрона (область, кодирующая белок) непосредственно внутрь рибосомы, приводя таким образом к кэп-независимой трансляции гена. См., например, Jackson *et al.*, 1990. *Trends Biochem Sci* 15(12):477-83); и Jackson and Kaminski. 1995. *RNA* 1(10):985-1000. Примеры IRES, обычно используемых специалистами в данной области техники, включают те, которые описаны в патенте США № 6692736. Дополнительные примеры «IRES», известные в данной области техники, включают без ограничения IRES, получаемый из пикорнавируса (Jackson *et al.*, 1990) и IRES, получаемый из вирусных или клеточных источников мРНК, таких как, например, белок, связывающий тяжелую цепь иммуноглобулина (BiP), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) (Huez *et al.* 1998. *Mol. Cell. Biol.* 18(11):6178-6190), фактор роста фибробластов 2 (FGF-2) и инсулиноподобный фактор роста (IGFII), фактор инициации трансляции eIF4G и факторы транскрипции дрожжей TFIID и HAP4, вирус энцефаломиокардита (EMCV), который коммерчески доступен от Novagen (Duke *et al.*, 1992. *J. Virol* 66(3):1602-9) и IRES VEGF (Huez *et al.*, 1998. *Mol Cell Biol* 18(11):6178-90). IRES также были обнаружены в вирусных геномах видов из семейств Picornaviridae, Dicistroviridae и Flaviviridae и в HCV, вирусе лейкоза мышей Френда (FrMLV) и вирусе лейкоза мышей Молони (MoMLV).

В одном варианте осуществления IRES, используемый в полинуклеотидах, рассматриваемых в данном документе, представляет собой IRES EMCV.

В конкретных вариантах осуществления полинуклеотиды представляют собой консенсусную последовательность Козак. Используемый в данном документе термин «последовательность Козак» относится к короткой нуклеотидной последовательности, которая в значительно облегчает начальное связывание мРНК с малой субъединицей рибосомы и усиливает трансляцию. Консенсусная последовательность Козак представляет собой (GCC)RCCATGG (SEQ ID NO: 83), где R представляет собой пурин (А или G) (Kozak, 1986. *Cell*. 44(2):283-92, и Kozak, 1987. *Nucleic Acids Res.* 15(20):8125-48).

Элементы, управляющие эффективной терминацией и полиаденилированием транскриптов гетерологичных нуклеиновых кислот, увеличивают уровень экспрессии гетерологичных генов. Сигналы терминации транскрипции, как правило, находятся ниже сигнала полиаденилирования. В конкретных вариантах осуществления векторы содержат последовательность полиаденилирования в направлении 3' от полинуклеотида, кодирующего полипептид, подлежащий экспрессии. Используемый в данном документе термин «сайт поли(А)» или «поли(А)-последовательность» обозначает последовательность ДНК, которая управляет как терминацией, так и полиаденилированием растущей нити РНК-транскрипта с помощью РНК-полимеразы II. Последовательности полиаденилирования могут повышать стабильность мРНК путем добавления поли(А)-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности и тем самым способствовать увеличению эффективности трансляции. Расщепление и полиаденилирование определяется поли(А)-последовательностью в РНК. Коровая поли(А)-последовательность для пре-мРНК млекопитающих имеет два элемента распознавания, фланкирующих сайт расщепления-полиаденилирования. Как правило, почти инвариантный гексамер AAUAAA расположен на 20—50 нуклеотидов выше более переменного элемента, богатого остатками U или GU. Расщепление растущего транскрипта происходит между этими двумя элементами и сопровождается добавлением вплоть до 250 остатков аденозина к 5'-продукту расщепления. В конкретных вариантах осуществления коровая поли(А)-последовательность представляет собой совершенную поли(А)-последовательность (например, AATAAA, ATTAАА, AGTAAA). В конкретных вариантах осуществления поли(А)-последовательность представляет собой поли(А)-последовательность SV40, поли(А)-последовательность бычьего гормона роста (BGHrA), поли(А)-последовательность β-глобина кролика (rβgrA), их варианты или другую подходящую гетерологичную или эндогенную поли(А)-последовательность, известную из уровня

техники. В конкретных вариантах осуществления поли(А)-последовательность является синтетической.

В конкретных вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие один или более полипептидов или слитые полипептиды могут быть введены в иммунные эффекторские клетки, *например* Т-клетки, способами как с использованием вирусов, так и без использования вирусов. В конкретных вариантах осуществления доставка одного или более полинуклеотидов может обеспечиваться одним и тем же способом или разными способами, и/или одним и тем же вектором или разными векторами.

Используемый в данном документе термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить или транспортировать другую молекулу нуклеиновой кислоты. Переносимая нуклеиновая кислота обычно связана с векторной молекулой нуклеиновой кислоты, *например* вставлена в нее. Вектор может содержать последовательности, которые управляют автономной репликацией в клетке, или может содержать последовательности, достаточные для обеспечения встраивания в ДНК клетки-хозяина. В конкретных вариантах осуществления невирусные векторы используются для доставки одного или более полинуклеотидов, рассматриваемых в данном документе, в Т-клетку.

Иллюстративные примеры невирусных векторов включают без ограничения плазмиды (*например*, ДНК-плазмиды или РНК-плазмиды), транспозоны, космиды и искусственные бактериальные хромосомы.

Иллюстративные способы доставки полинуклеотидов, рассматриваемых в конкретных вариантах осуществления, без использования вирусов включают без ограничения: электропорацию, сонопорацию, липофекцию, микроинъекцию, типы баллистической трансфекции, вирусомы, липосомы, иммунолипосомы, наночастицы, поликатионные конъюгаты или конъюгаты липид:нуклеиновая кислота, депротенинизированную ДНК, искусственные вирионы, перенос, опосредованный DEAE-декстраном, генную пушку и тепловой шок.

Иллюстративные примеры систем доставки полинуклеотидов, подходящих для использования в конкретных вариантах осуществления, рассмотренных в конкретных вариантах осуществления, включают без ограничения системы, предоставляемые Amax Biosystems, Maxcyte, Inc., BTX Molecular Delivery Systems и Copernicus Therapeutics Inc.

Реагенты для липофекции продаются на коммерческой основе (например, Transfectam™ и Lipofectin™). Катионные и нейтральные липиды, подходящие для эффективной липофекции полинуклеотидов с распознаванием рецепторов, описаны в литературе. См., например, Liu *et al.* (2003) *Gene Therapy*. 10:180–187; и Balazs *et al.* (2011) *Journal of Drug Delivery*. 2011:1-12. Доставка на основе неживых наноклеток бактериального происхождения с нацеливанием с помощью антител также рассматривается в конкретных вариантах осуществления.

Вирусные векторы, содержащие полинуклеотиды, рассматриваемые в конкретных вариантах осуществления, могут быть доставлены *in vivo* посредством введения отдельному пациенту, как правило посредством системного введения (например, внутривенного, внутривентрикулярного, внутримышечного, подкожного или внутримозгового введения) или местного применения, как описано ниже. В качестве альтернативы векторы могут быть доставлены в клетки *ex vivo*, такие как клетки, эксплантированные от отдельного пациента (например, мобилизованная периферическая кровь, лимфоциты, пунктаты костного мозга, биоптаты ткани и *т. д.*) или универсальные донорские гемопоэтические стволовые клетки с последующей реимплантацией клеток в организм пациента.

В одном варианте осуществления вирусные векторы, содержащие полинуклеотиды, рассматриваемые в данном документе, вводят непосредственно в организм для трансдукции клеток *in vivo*. В качестве альтернативы можно вводить депротенинизированную ДНК. Введение осуществляется любым из путей введения, обычно используемых для введения молекулы с обеспечением непосредственного контакта с клетками крови или ткани, включая без ограничения инъекцию, инфузию, местное нанесение и электропорацию. Подходящие способы введения таких нуклеиновых кислот доступны и хорошо известны специалистам в данной области техники, и, хотя для введения конкретной композиции можно использовать более одного пути введения, конкретный путь введения часто может обеспечить более быструю и более эффективную реакцию, чем другой путь введения.

Иллюстративные примеры вирусных векторных систем, подходящих для использования в конкретных вариантах осуществления, рассмотренных в конкретных вариантах осуществления, включают без ограничения векторы на основе аденоассоциированного

вируса (AAV), ретровируса, вируса простого герпеса, аденовируса и вируса осповакцины.

В различных вариантах осуществления один или более полинуклеотидов, кодирующих один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33, и/или другие полипептиды, рассматриваемые в данном документе, вводятся в иммунную эффекторную клетку, *например* Т-клетку, путем трансдукции клетки рекомбинантным аденоассоциированным вирусом (rAAV), содержащим один или более полинуклеотидов.

AAV представляет собой небольшой (~ 26 нм) дефектный по репликации преимущественно эписомальный безоболочечный вирус. AAV может инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки и может встраивать свой геном в геном клетки-хозяина. Рекомбинантный AAV (rAAV), как правило, состоит как минимум из трансгена и его регуляторных последовательностей, и 5'- и 3'-инвертированных концевых повторов (ITR) AAV. Последовательности ITR имеют длину приблизительно 145 п. о. В конкретных вариантах осуществления rAAV содержит ITR и последовательности капсида, выделенные из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или AAV10.

В некоторых вариантах осуществления используется химерный rAAV, у которого последовательности ITR выделены из одного серотипа AAV, а последовательности капсида выделены из другого серотипа AAV. Например, rAAV с последовательностями ITR, полученными из AAV2, и последовательностями капсида, полученными из AAV6, называется AAV2/AAV6. В конкретных вариантах осуществления вектор на основе rAAV может содержать ITR из AAV2 и капсидные белки из любого из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или AAV10. В предпочтительном варианте осуществления rAAV содержит последовательности ITR, полученные из AAV2, и последовательности капсида, полученные из AAV6. В предпочтительном варианте осуществления rAAV содержит последовательности ITR, полученные из AAV2, и последовательности капсида, полученные из AAV2.

В некоторых вариантах осуществления к капсидам AAV можно применять способы конструирования и отбора, чтобы повысить вероятность трансдукции ими представляющих интерес клеток.

Конструирование векторов на основе rAAV, их получение и очистка раскрыты, *например*, в патентах США № 9169494; 9169492; 9012224; 8889641; 8809058; и 8784799, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В различных вариантах осуществления один или более полинуклеотидов, кодирующих один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33, и/или другие полипептиды, рассматриваемые в данном документе, вводятся в иммунную эффекторную клетку, *например* Т-клетку, путем трансдукции клетки ретровирусом, *например* лентивирусом, содержащим один или более полинуклеотидов.

Используемый в данном документе термин «ретровирус» относится к РНК-вирусу, который обратнo транскрибирует свою геномную РНК в линейную двухнитевую ДНК-копию, а затем путем образования ковалентных связей встраивает свою геномную ДНК в геном хозяина. Иллюстративные ретровирусы, подходящие для применения в конкретных вариантах осуществления, включают без ограничения: Вирус лейкоза мышей Молони (M-MuLV), вирус саркомы мышей Молони (MoMSV), вирус саркомы мышей Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы мышей (MuMTV), вирус лейкоза гиббонов (GaLV), вирус лейкоза кошек (FLV), спумавирус, вирус лейкоза мышей Френда, вирус стволовых клеток мышей (MSCV), а также вирус саркомы Рауса (RSV) и лентивирус.

Используемый в данном документе термин «лентивирус» относится к группе (или роду) сложных ретровирусов. Иллюстративные лентивирусы включают без ограничения HIV (вирус иммунодефицита человека; в том числе HIV типа 1 и HIV типа 2); вирус висна-маеди (VMV); вирус артрита-энцефалита коз (CAEV); вирус инфекционной анемии лошадей (EIAV); вирус иммунодефицита кошек (FIV); вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV) и вирус иммунодефицита обезьян (SIV). В одном варианте осуществления предпочтительными являются остовы векторов на основе HIV (*т. е.*, cis-действующие элементы последовательности HIV).

В различных вариантах осуществления лентивирусный вектор, рассматриваемый в данном документе, содержит один или более LTR и один или более или все из следующих дополнительных элементов: cPPT/FLAP, сигнал упаковки Psi (Ψ), элемент экспорта, поли(A)-последовательности, и могут необязательно содержать WPRE или HPRE,

инсуляторный элемент, селективный маркер и ген самоубийства клетки, как обсуждается в других частях данного документа.

В конкретных вариантах осуществления лентивирусные векторы, рассматриваемые в данном документе, могут представлять собой встраивающиеся, или невстраивающиеся, или дефектные по встраиванию лентивирусы. Используемый в данном документе термин «лентивирус, дефектный по встраиванию» или «IDLV» относится к лентивирусу, содержащему интегразу, которая не обладает способностью обеспечивать встраивание вирусного генома в геном клеток-хозяев. Неспособные к встраиванию вирусные векторы были описаны в заявке на патент WO 2006/010834, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Иллюстративные мутации в гене *pol* HIV-1, подходящие для снижения активности интегразы, включают без ограничения следующие: H12N, H12C, H16C, H16V, S81 R, D41A, K42A, H51A, Q53C, D55V, D64E, D64V, E69A, K71A, E85A, E87A, D116N, D116I, D116A, N120G, N120I, N120E, E152G, E152A, D35E, K156E, K156A, E157A, K159E, K159A, K160A, R166A, D167A, E170A, H171A, K173A, K186Q, K186T, K188T, E198A, R199c, R199T, R199A, D202A, K211A, Q214L, Q216L, Q221 L, W235F, W235E, K236S, K236A, K246A, G247W, D253A, R262A, R263A и K264H.

Термин «длинный концевой повтор (LTR)» относится к доменам из пар оснований, расположенных на концах ретровирусных ДНК, которые в контексте их природных последовательностей представляют собой прямые повторы и содержат области U3, R и U5.

Используемый в данном документе термин «FLAP-элемент» или «сPPT/FLAP» относится к нуклеиновой кислоте, последовательность которой содержит центральный полипуриновый тракт и центральные последовательности терминации (сPPT и CTS) ретровируса, *например* HIV-1 или HIV-2. Подходящие FLAP-элементы описаны в патенте США № 6682907 и в Zennou, *et al.*, 2000, *Cell*, 101:173.

Используемый в данном документе термин «сигнал упаковки» или «последовательность упаковки» относится к последовательностям ψ [Ψ], расположенным в пределах ретровирусного генома, которые необходимы для вставки вирусной РНК в вирусный капсид или частицу, см., *например*, Clever *et al.*, 1995. *J. of Virology*, Vol. 69, No. 4; pp. 2101–2109.

Термин «элемент экспорта» относится к цис-действующему посттранскрипционному регуляторному элементу, который регулирует транспорт РНК-транскрипта из ядра в цитоплазму клетки. Примеры РНК-элементов экспорта включают без ограничения элемент ответа *rev* (RRE) вируса иммунодефицита человека (HIV) (см., например, Cullen *et al.*, 1991. *J. Virol.* 65: 1053; и Cullen *et al.*, 1991. *Cell* 58: 423) и посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита В (HPRE).

В конкретных вариантах осуществления экспрессию гетерологичных последовательностей в вирусных векторах повышают посредством внедрения в векторы посттранскрипционных регуляторных элементов, эффективных сайтов полиаденилирования и, необязательно, сигналов терминации транскрипции. Разнообразные посттранскрипционные регуляторные элементы могут увеличивать экспрессию гетерологичной нуклеиновой кислоты в белок, например, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE; Zufferey *et al.*, 1999, *J. Virol.*, 73:2886); посттранскрипционный регуляторный элемент, присутствующий в вирусе гепатита В (HPRE) (Huang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:3864); и т. п. (Liu *et al.*, 1995, *Genes Dev.*, 9:1766).

Лентивирусные векторы предпочтительно содержат несколько элементов для повышения безопасности, получаемые в результате модификации LTR. Термин «самоинактивирующиеся» (SIN) векторы относится к дефектным по репликации векторам, например ретровирусным или лентивирусным векторам, в которых область энхансер-промотор правого (3')-LTR, известная как U3-область, была модифицирована (например, посредством делеции или замены) с обеспечением предупреждения вирусной транскрипции после первого цикла вирусной репликации. Самоинактивация предпочтительно достигается путем введения делеции в U3-область 3'-LTR векторной ДНК, т. е., ДНК, используемой для получения векторной РНК. Таким образом, во время обратной транскрипции данная делеция переносится на 5'-LTR провирусной ДНК. В конкретных вариантах осуществления для обеспечения значительного уменьшения или полного устранения транскрипционной активности LTR необходимо удалить достаточное количество последовательности U3, тем самым значительно уменьшая или устраняя продукцию полноразмерной векторной РНК в трансдуцированных клетках. В случае лентивирусных векторов на основе HIV было обнаружено, что для таких векторов допустимыми являются значительные делеции U3, включая удаление ТАТА-бокса LTR (например, делеции от -418 до -18), без значительного снижения титров вектора.

Дополнительное усиление безопасности обеспечивают замещением U3-области 5'-LTR гетерологичным промотором для управления транскрипцией вирусного генома во время образования вирусных частиц. Примеры гетерологичных промоторов, которые можно использовать, включают, например, вирусный промотор вируса обезьян 40 (SV40) (*например*, ранний или поздний), промотор цитомегаловируса (CMV) (*например*, немедленно-ранний), промотор вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV), промотор вируса саркомы Рауса (RSV) и промотор вируса простого герпеса (HSV) (тимидинкиназа).

Используемые в данном документе термины «псевдотипировать» или «псевдотипирование» относятся к вирусу, белки оболочки которого были замещены на белки другого вируса, обладающего предпочтительными характеристиками. Например, HIV может быть псевдотипирован с помощью белков оболочки, представляющих собой G-белок вируса везикулярного стоматита (VSV-G), что обеспечивает возможность HIV инфицировать более широкий спектр клеток, поскольку белки оболочки HIV (кодируемые геном env) в норме нацеливают вирус на клетки, презентующие CD4⁺.

В определенных вариантах осуществления лентивирусные векторы получают в соответствии с известными способами. *См., например*, Kutner *et al.*, *BMC Biotechnol.* 2009;9:10. doi: 10.1186/1472-6750-9-10; Kutner *et al.* *Nat. Protoc.* 2009;4(4):495–505. doi: 10.1038/nprot.2009.22.

В соответствии с некоторыми конкретными вариантами осуществления, рассмотренными в данном документе, большинство или все последовательности остовов вирусных векторов происходят из лентивируса, *например* HIV-1. Однако, следует понимать, что можно использовать или объединять множество различных источников ретровирусных и/или лентивирусных последовательностей, а также множество замен и изменений можно поместить в некоторые лентивирусные последовательности без ухудшения способности вектора-переносчика выполнять функции, описанные в данном документе. Более того, из уровня техники известно множество лентивирусных векторов, *см.* Naldini *et al.*, (1996a, 1996b и 1998); Zufferey *et al.*, (1997); Dull *et al.*, 1998, патенты США № 6013516; и 5994136, многие из которых могут быть адаптированы для получения вирусного вектора или плазмиды-переносчика, рассматриваемых в данном документе.

В различных вариантах осуществления один или более полинуклеотидов, кодирующих один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33, и/или другие полипептиды, рассматриваемые в данном документе, вводятся в иммунную эффекторную клетку путем трансдукции клетки аденовирусом, содержащим один или более полинуклеотидов.

Векторы на основе аденовирусов обладают очень высокой эффективностью трансдукции во многих типах клеток и не требуют деления клеток. При использовании таких векторов были получены высокий титр и высокие уровни экспрессии. Данный вектор можно получать в больших количествах в относительно простой системе. Большинство векторов на основе аденовируса сконструированы таким образом, что трансген заменяет гены Ad E1a, E1b и/или E3; впоследствии вектор с дефектом репликации размножают в клетках 293 человека, которые восполняют функцию удаленного гена с помощью средств *извне*. Векторы на основе Ad могут трансдуцировать различные типы тканей *in vivo*, включая неделящиеся дифференцированные клетки, такие как клетки печени, почек и мышц. Обычные векторы на основе Ad характеризуются большой емкостью.

Для создания и размножения современных векторов на основе аденовируса, которые являются дефектными по репликации, может использоваться уникальная линия хелперных клеток, названная 293, которая была трансформирована из клеток эмбриональной почки человека фрагментами ДНК Ad5 и которая постоянно экспрессирует белки E1 (Graham *et al.*, 1977). Поскольку область E3 является неотъемлемой частью генома аденовируса (Jones & Shenk, 1978), современные векторы на основе аденовируса с помощью клеток 293 переносят чужеродную ДНК либо в E1, либо в D3, либо в обе области (Graham & Prevec, 1991). Векторы на основе аденовируса использовались для экспрессии эукариотических генов (Levrero *et al.*, 1991; Gomez-Foix *et al.*, 1992) и разработки вакцины (Grunhaus & Horwitz, 1992; Graham & Prevec, 1992). Исследования по введению рекомбинантного аденовируса в различные ткани включают инстилляцию трахеи (Rosenfeld *et al.*, 1991; Rosenfeld *et al.*, 1992), мышечную инъекцию (Ragot *et al.*, 1993), периферические внутривенные инъекции (Herz & Gerard, 1993) и стереотаксическую инокуляцию в головной мозг (Le Gal La Salle *et al.*, 1993). Пример использования вектора на основе Ad в клиническом исследовании включал лечение с использованием полинуклеотидов для противоопухолевой иммунизации с помощью внутримышечной инъекции (Serman *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 7:1083-9 (1998)).

В различных вариантах осуществления один или более полинуклеотидов, кодирующих один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33, и/или другие полипептиды, рассматриваемые в данном документе, вводятся в иммунную эффекторную клетку путем трансдукции клетки вирусом простого герпеса, *например* HSV-1, HSV-2, содержащим один или более полинуклеотидов.

Зрелый вирион HSV состоит из покрытого оболочкой икосаэдрического капсида с вирусным геномом, состоящим из линейной двухцепочечной молекулы ДНК размером 152 т. о. В одном варианте осуществления вирусный вектор на основе HSV является дефектным по одному или более основным или неосновным генам HSV. В одном варианте осуществления вирусный вектор на основе HSV является дефектным по репликации. Большинство векторов HSV, дефектных по репликации, содержат делецию, обеспечивающую удаление одного или более промежуточно-ранних, ранних или поздних генов HSV, для предупреждения репликации. Например, вектор HSV может являться дефектным по непосредственно-раннему гену, выбранному из группы, состоящей из ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 и их комбинации. Преимуществами вектора на основе HSV являются его способность вступать в латентную стадию, которая может приводить к долговременной экспрессии ДНК, и его большой вирусный ДНК-геном, который может вмещать вставки экзогенной ДНК размером до 25 т. о. Векторы на основе HSV описаны, например, в патентах США № 5837532, 5846782 и 5804413 и в международных патентных заявках WO 91/02788, WO 96/04394, WO 98/15637 и WO 99/06583, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Г. ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ

В различных вариантах осуществления клетки модифицированы для экспрессии DARIC на основе VHH к CD33, одного или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33, CAR на основе антитела VHH к CD33 и/или слитых белков, рассматриваемых в данном документе, для использования при лечении рака. Клетки могут быть генетически немодифицированными для экспрессии одного или более полипептидов, рассматриваемых в данном документе, или в конкретных предпочтительных вариантах осуществления клетки могут быть генетически модифицированными для экспрессии одного или более полипептидов, рассматриваемых в данном документе. Используемый в данном документе термин «полученный методами генной инженерии» или «генетически модифицированный» относится к добавлению дополнительного

генетического материала в форме ДНК или РНК в общий генетический материал клетки. Термины «генетически модифицированные клетки», «модифицированные клетки» и «перенаправленные клетки» используются взаимозаменяемо в конкретных вариантах осуществления.

В конкретных вариантах осуществления один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, рассматриваемых в данном документе, вводятся в иммунные эффекторные клетки и экспрессируются в них с обеспечением повышения эффективности иммунных эффекторных клеток.

«Иммунная эффекторная клетка» представляет собой любую клетку иммунной системы, которая характеризуется одной или более эффекторными функциями (например, цитолитической активностью цитотоксической клетки, секрецией цитокинов, индукцией ADCC и/или CDC). Иллюстративные иммунные эффекторные клетки, рассматриваемые в данном документе, представляют собой Т-лимфоциты, включая без ограничения цитотоксические Т-клетки (CTL; CD8⁺ Т-клетки), TIL и хелперные Т-клетки (HTL; CD4⁺ Т-клетки). В конкретном варианте осуществления клетки предусматривают $\alpha\beta$ Т-клетки. В конкретном варианте осуществления клетки предусматривают $\gamma\delta$ Т-клетки. В одном варианте осуществления иммунные эффекторные клетки включают естественные клетки-киллеры (NK). В одном варианте осуществления иммунные эффекторные клетки включают Т-клетки с функциями естественных киллеров (NKT). Иммунные эффекторные клетки могут быть аутологичными/аутогенными («своими») или неаутологичными («не своими», *например* аллогенными, сингенными или ксеногенными).

Термин «аутологичные», используемый в данном документе, относится к клеткам от того же субъекта. Термин «аллогенные», используемый в данном документе, относится к клеткам того же вида, которые генетически отличны от клетки сравнения. Термин «сингенные», используемый в данном документе, относится к клеткам другого субъекта, которые генетически идентичны клетке сравнения. Термин «ксеногенные», используемый в данном документе, относится к клеткам вида, отличного от вида клетки сравнения. В предпочтительных вариантах осуществления клетки представляют собой аутологичные иммунные эффекторные клетки человека.

Иллюстративные иммунные эффекторныe клетки, подходящие для введения одного или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, рассматриваемых в данном документе, включают Т-лимфоциты. Термины «Т-клетка» или «Т-лимфоцит» приняты в данной области техники и подразумевают включение тимоцитов, незрелых Т-лимфоцитов, зрелых Т-лимфоцитов, покоящихся Т-лимфоцитов или активированных Т-лимфоцитов. Т-клетка может представлять собой Т-хелперную клетку (Th), например Т-хелперную клетку типа 1 (Th1) или Т-хелперную клетку типа 2 (Th2). Т-клетка может представлять собой хелперную Т-клетку (HTL; CD4⁺ Т-клетку), цитотоксическую Т-клетку (CTL; CD8⁺ Т-клетку), CD4⁺CD8⁺ Т-клетку, CD4⁻CD8⁻ Т-клетку или любую другую субпопуляцию Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления Т-клетка экспрессирует рецептор Т-клетки. Рецепторы Т-клеток содержат две субъединицы – субъединицу, представляющую собой альфа-цепь и бета-цепь ($\alpha\beta$ TCR), или субъединицу, представляющую собой гамма-цепь и дельта-цепь ($\gamma\delta$ TCR), каждая из которых представляет собой уникальный белок, образованный за счет явления рекомбинации в геноме каждой Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления Т-клетка представляет собой Т-клетку с $\alpha\beta$ TCR ($\alpha\beta$ Т-клетку). В конкретных вариантах осуществления Т-клетка представляет собой Т-клетку с $\gamma\delta$ TCR ($\gamma\delta$ Т-клетку). Другие иллюстративные популяции Т-клеток, подходящие для применения в конкретных вариантах осуществления, включают необученные Т-клетки и Т-клетки памяти.

Как будет понятно специалисту в данной области техники, другие клетки также можно использовать в качестве иммунных эффекторных клеток, содержащих один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, рассматриваемых в данном документе. В конкретных вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки также включают НК-клетки, НКТ-клетки, нейтрофилы и макрофаги. Иммунные эффекторные клетки также включают предшественников эффекторных клеток, где такие клетки-предшественники можно индуцировать с обеспечением дифференциации в иммунные эффекторные клетки *in vivo* или *in vitro*. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки включают предшественников иммунных эффекторных клеток, таких как гемопоэтические стволовые клетки (HSC), входящие в популяцию CD34⁺ клеток, полученных из пуповинной крови, костного мозга или мобилизованных клеток периферической крови, которые после введения субъекту дифференцируются в зрелые

иммунные эффекторныe клетки, или которые можно индуцировать *in vitro* с обеспечением дифференциации во зрелые иммунные эффекторныe клетки.

Термин «CD34+ клетка», используемый в данном документе, относится к клетке, экспрессирующей на своей клеточной поверхности белок CD34. Термин «CD34», используемый в данном документе, относится к гликопротеину клеточной поверхности (*например*, белку сиаломуцину), который зачастую действует в качестве фактора межклеточной адгезии и участвует в проникновении Т-клеток в лимфатические узлы. Популяция CD34+ клеток состоит из гемопоэтических стволовых клеток (HSC), которые после введения пациенту дифференцируются и участвуют в образовании всех ростков кроветворения, в том числе Т-клеток, NK-клеток, NKT-клеток, нейтрофилов и клеток моноцитарной/макрофагальной линии.

Способы получения иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, рассматриваемых в данном документе, предусмотрены в конкретных вариантах осуществления. В одном варианте осуществления способ включает трансфекцию или трансдукцию иммунных эффекторных клеток, выделенных из организма индивидуума, таким образом, чтобы иммунные эффекторные клетки содержали одну или более нуклеиновых кислот и/или один или более векторов, *например* лентивирусных векторов, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, рассматриваемых в данном документе. В другом варианте осуществления способ включает трансфекцию или трансдукцию иммунных эффекторных клеток, выделенных из организма индивидуума, таким образом, чтобы иммунные эффекторные клетки экспрессировали один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, рассматриваемых в данном документе. В определенных вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки выделяют из организма индивидуума и генетически модифицируют без дальнейших манипуляций *in vitro*. Такие клетки затем можно напрямую повторно вводить в организм индивидуума. В дополнительных вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки сначала активируют и стимулируют с обеспечением пролиферации *in vitro*, после чего подвергают генетической модификации. В связи с этим, иммунные эффекторные клетки можно культивировать до и/или после того, как их подвергли генетической модификации.

В конкретных вариантах осуществления до проведения *in vitro* манипуляций или генетических модификаций иммунных эффекторных клеток, описанных в данном документе, источник клеток получают из организма субъекта. В конкретных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки включают Т-клетки.

Т-клетки можно получать из различных источников, в том числе без ограничения мононуклеарных клеток периферической крови, костного мозга, ткани лимфатических узлов, пуповинной крови, ткани тимуса, ткани из очага инфекции, асцитов, плеврального выпота, ткани селезенки и опухолей. В определенных вариантах осуществления Т-клетки можно получать из единицы объема крови, собранной у субъекта с применением любой из целого ряда методик, известных специалисту в данной области техники, например с помощью осаждения, *например* разделения с помощью FICOLL™.

В других вариантах осуществления применяют выделенную или очищенную популяцию Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления после выделения РВМС как цитотоксические, так и хелперные Т-лимфоциты можно сортировать на субпопуляции необученных Т-клеток, Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток либо перед, либо после активации, размножения и/или генетической модификации.

В одном варианте осуществления выделенная или очищенная популяция Т-клеток экспрессирует один или более маркеров, включая без ограничения CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ или их комбинацию.

В определенных вариантах осуществления Т-клетки выделяют из организма индивидуума и сначала активируют и стимулируют с обеспечением пролиферации *in vitro*, а затем модифицируют с обеспечением экспрессии одного или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, рассматриваемых в данном документе.

Для достижения достаточных терапевтических доз композиций на основе Т-клеток зачастую проводят один или более раундов стимуляции, активации и/или размножения Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления Т-клетки можно активировать и размножать с применением обычных способов, описываемых, например, в патентах США 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514 и 6867041, каждый из которых

включен в данный документ посредством ссылки в своей полноте. В конкретных вариантах осуществления Т-клетки активируются и размножаются в течение приблизительно 6 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 18 часов или приблизительно 24 часов до введения векторов или полинуклеотидов, кодирующих один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, рассматриваемых в данном документе.

Н. Композиции и составы

Рассматриваемые в данном документе композиции могут содержать один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, полинуклеотиды, кодирующие один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, содержащие их векторы, генетически модифицированные иммунные эффекторные клетки, мостиковые факторы и *т. д.* Композиции включают без ограничения фармацевтические композиции. Термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции, составленной в фармацевтически приемлемых или физиологически приемлемых растворах для введения в клетку или животному либо отдельно, либо в комбинации с одним или более другими видами терапии. Следует также иметь в виду, что, при необходимости, композиции можно также вводить в комбинации с другими средствами, такими как, *например*, цитокины, факторы роста, гормоны, малые молекулы, химиотерапевтические средства, пролекарства, лекарственные средства, антитела или другие различные фармацевтически активные средства. Для других компонентов, которые также можно включать в композиции, практически не существует ограничений, при условии, что такие дополнительные средства не оказывают отрицательного влияния на способность композиции доставлять предусмотренное терапевтическое средство.

Фраза «фармацевтически приемлемый» используется в данном документе для обозначения тех соединений, материалов, композиций и/или готовых лекарственных форм, которые, в рамках медицинских показаний, пригодны для применения в контакте с тканями человека и животных, при этом не вызывая чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соизмеримых с приемлемым соотношением польза/риск.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к разбавителю, адьюванту, вспомогательному средству или среде-носителю, с которыми вводятся мостиковые факторы, полипептиды, полинуклеотиды, содержащие их векторы, или генетически модифицированные иммунные эффекторные клетки. Иллюстративными примерами фармацевтических носителей могут быть стерильные жидкости, такие как среды для культивирования клеток, вода и масла, включая масла минерального, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, в частности для растворов для инъекций. Подходящие фармацевтические вспомогательные средства в конкретных вариантах осуществления включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и т. п. За исключением случаев, когда обычная среда или средство несовместимы с активным ингредиентом, предусмотрено их использование в терапевтических композициях. В композиции также могут быть включены дополнительные активные ингредиенты.

В одном варианте осуществления композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель, подходит для введения субъекту. В конкретных вариантах осуществления композиция, содержащая носитель, подходит для парентерального введения, *например* внутрисосудистого (внутривенного или внутриартериального), внутрибрюшинного или внутримышечного введения. В конкретных вариантах осуществления композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель, подходит для внутрижелудочкового, интраспинального или интратекального введения. Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы, среды для культивирования клеток или дисперсии. Использование данных сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда обычная среда или средство несовместимы с мостиковыми факторами, полипептидами, полинуклеотидами, содержащими их векторами или генетически модифицированными иммунными эффекторными клетками, предусмотрено их использование в фармацевтических композициях.

В конкретных вариантах осуществления рассматриваемые в данном документе композиции содержат генетически модифицированные Т-клетки и фармацевтически

приемлемый носитель. Композицию, содержащую композицию на основе клеток, рассматриваемую в данном документе, можно вводить отдельно с помощью способов энтерального или парентерального введения или в комбинации с другими подходящими соединениями для достижения необходимых целей лечения.

В конкретных вариантах осуществления рассматриваемые в данном документе композиции содержат мостиковый фактор и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтически приемлемый носитель должен характеризоваться достаточно высокой чистотой и достаточно низкой токсичностью, чтобы являться пригодным для введения субъекту-человеку, который находится на лечении. Дополнительно, он должен поддерживать или повышать стабильность композиции. Фармацевтически приемлемый носитель может быть жидким или твердым, и его выбирают с учетом запланированного способа введения, для обеспечения необходимого объема, консистенции и *т. д.* при комбинации с другими компонентами композиции. Например, фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой без ограничения связывающее средство (*например*, прежелатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу и *т. д.*), наполнитель (*например*, лактозу и другие сахара, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, желатин, кальция сульфат, этилцеллюлозу, полиакрилат, кальция гидрофосфат и *т. д.*), смазочный материал (*например*, магния стеарат, тальк, кремния диоксид, коллоидный кремния диоксид, стеариновую кислоту, стеараты металлов, гидрогенизированное растительное масло, кукурузный крахмал, полиэтиленгликоль, натрия бензоат, натрия ацетат и *т. д.*), разрыхлитель (*например*, крахмал, натрия крахмала гликолят и *т. д.*) или увлажняющее средство (*например*, лаурилсульфат натрия и *т. д.*). Другие подходящие фармацевтически приемлемые носители для рассматриваемых в данном документе композиций включают без ограничения воду, растворы солей, спирты, виды полиэтиленгликоля, виды желатина, виды амилозы, виды магния стеарата, виды талька, кремниевые кислоты, вязкие парафины, виды гидроксиметилцеллюлозы, виды поливинилпирролидона и *т. п.*

Такие растворы-носители также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Используемый в данном документе термин «буфер» относится к раствору или жидкости, химический состав которого нейтрализует кислоты или основания без значительного изменения pH. Примеры рассматриваемых в данном

документе буферов включают без ограничения фосфатно-солевой буфер Дульбекко (PBS), раствор Рингера, 5% раствор декстрозы в воде (D5W), нормальный/физиологический раствор (0,9% NaCl).

Фармацевтически приемлемые носители могут присутствовать в количествах, достаточных для поддержания значения pH композиции на уровне приблизительно 7. В качестве альтернативы, композиция имеет pH в диапазоне от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,4, *например* 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 и 7,4. В еще одном варианте осуществления композиция имеет pH приблизительно 7,4.

Рассматриваемые в данном документе композиции могут содержать нетоксичную фармацевтически приемлемую среду. Композиции могут представлять собой суспензию. Термин «суспензия», используемый в данном документе, относится к условиям отсутствия прилипания, в которых клетки не прикрепляются к твердой подложке. Например, клетки, поддерживаемые в виде суспензии, можно перемешивать или встряхивать, и они не прилипают к подложке, такой как чашка для культивирования.

В конкретных вариантах осуществления рассматриваемые в данном документе композиции составлены в виде суспензии, где модифицированные Т-клетки распределены в приемлемой жидкой среде или растворе, *например* физиологическом растворе или бессывороточной среде, в пакете для внутривенного (IV) вливания или тому подобное. Приемлемые разбавители включают без ограничения воду, PlasmaLyte, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия (физиологический раствор), бессывороточную среду для культивирования клеток и среду, подходящую для криогенного хранения, *например* среду Cryostor®.

В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемый носитель практически не содержит природных белков человеческого или животного происхождения и подходит для хранения композиции, содержащей популяцию модифицированных Т-клеток. Терапевтическая композиция предназначена для введения пациенту-человеку и, следовательно, практически не содержит компонентов культуры клеток, таких как бычий сывороточный альбумин, лошадиная сыворотка и фетальная бычья сыворотка.

В некоторых вариантах осуществления композиции составлены в фармацевтически приемлемой среде для культивирования клеток. Такие композиции подходят для введения субъектам-людям. В конкретных вариантах осуществления фармацевтически приемлемая среда для культивирования клеток представляет собой бессывороточную среду.

Бессывороточная среда имеет несколько преимуществ по сравнению со средой, содержащей сыворотку, включая упрощенную и лучше определенную композицию, меньшую степень загрязнения, устранение потенциального источника возбудителей инфекции и более низкую стоимость. В различных вариантах осуществления бессывороточная среда не содержит компонентов животного происхождения и необязательно может не содержать белка. Необязательно среда может содержать биофармацевтически приемлемые рекомбинантные белки. Среда, «не содержащая компонентов животного происхождения» относится к среде, компоненты которой получены из источника, отличного от источника животного происхождения. Рекомбинантные белки заменяют нативные животные белки в среде, не содержащей компонентов животного происхождения, и питательные вещества получают из источников синтетического, растительного или микробного происхождения. «Безбелковая» среда, напротив, определяется как практически не содержащая белка.

Иллюстративные примеры бессывороточных сред, используемых в конкретных композициях, включают без ограничения QBSF-60 (Quality Biological, Inc.), StemPro-34 (Life Technologies) и X-VIVO 10.

В одном варианте осуществления композиции, содержащие модифицированные Т-клетки, составляют в PlasmaLyte.

В различных вариантах осуществления композиции, содержащие модифицированные Т-клетки, составляют в среде для криоконсервации. Например, среда для криоконсервации со средствами для криоконсервации может использоваться для поддержания высокой жизнеспособности клеток после размораживания. Иллюстративные примеры сред для криоконсервации, используемых в конкретных композициях, включают без ограничения CryoStor CS10, CryoStor CS5 и CryoStor CS2.

В одном варианте осуществления композиции составлены в растворе, содержащем 50:50 PlasmaLyte А к CryoStor CS10.

В конкретных вариантах осуществления композиция практически не содержит микоплазм, эндотоксина и загрязнения микроорганизмами. Под «практически не содержащим» в отношении эндотоксина подразумевается, что на дозу клеток приходится меньше эндотоксина, чем разрешено FDA для биологического препарата, что является суммарной дозой эндотоксина 5 ЕЭ/кг массы веса в день, что в среднем для человека 70 кг составляет 350 ЕЭ на суммарную дозу клеток. В конкретных вариантах осуществления рассматриваемые в данном документе композиции содержат от приблизительно 0,5 ЕЭ/мл до приблизительно 5,0 ЕЭ/мл или приблизительно 0,5 ЕЭ/мл, 1,0 ЕЭ/мл, 1,5 ЕЭ/мл, 2,0 ЕЭ/мл, 2,5 ЕЭ/мл, 3,0 ЕЭ/мл, 3,5 ЕЭ/мл, 4,0 ЕЭ/мл, 4,5 ЕЭ/мл или 5,0 ЕЭ/мл.

В конкретных вариантах осуществления составы растворов фармацевтически приемлемых носителей хорошо известны специалистам в данной области техники, как и в случае разработки подходящих схем введения доз и схем лечения для использования конкретных композиций, описанных в данном документе, в различных схемах лечения, включая, например, энтеральное и парентеральное, например, внутрисосудистое, внутривенное, внутриартериальное, внутрикостное, внутрижелудочковое, внутримозговое, внутричерепное, интраспинальное, интратекальное и интрамедуллярное введение и составление. Специалисту будет понятно, что конкретные варианты осуществления, рассматриваемые в данном документе, могут включать другие составы, которые хорошо известны в области фармацевтики и описаны, например, в *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, том I и том II. 22-е издание. Под редакцией Loyd V. Allen Jr. Philadelphia, PA: Pharmaceutical Press; 2012, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В конкретных вариантах осуществления композиции содержат некоторое количество иммунных эффекторных клеток, содержащих полинуклеотид, кодирующий один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, рассматриваемых в данном документе. В конкретных вариантах осуществления композиции содержат некоторое количество иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, рассматриваемых в данном документе. Используемый в данном документе термин «некоторое количество» относится к «количеству, которое эффективно» или «эффективному количеству» клеток, содержащих один или более

компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, рассматриваемых в данном документе и *т. д.*, для достижения полезного или желаемого профилактического или терапевтического результата при наличии мостикового фактора, включая клинические результаты.

«Профилактически эффективное количество» относится к количеству клеток, содержащих один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, рассматриваемых в данном документе, и *т. д.*, эффективному для достижения желаемого профилактического результата в присутствии мостикового фактора. Как правило, но не обязательно, поскольку профилактическую дозу применяют у субъектов до появления заболевания или на его ранней стадии, профилактически эффективное количество меньше терапевтически эффективного количества.

«Терапевтически эффективное количество» относится к количеству клеток, содержащих один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, рассматриваемых в данном документе, которое эффективно для «лечения» субъекта (*например*, пациента) в присутствии мостикового фактора. Если указано терапевтическое количество, точное количество вводимых композиций, клеток, мостикового фактора и *т. д.*, может определить лечащий врач с учетом индивидуальных отличий в возрасте, весе, размере опухоли, степени инфекции или метастазов и состоянии пациента (субъекта).

В целом можно указать, что фармацевтическую композицию, содержащую иммунные эффекторные клетки, описанные в данном документе, можно вводить в дозе 10^2 — 10^{10} клеток/кг веса тела, предпочтительно 10^5 — 10^6 клеток/кг веса тела, включая все целые значения в пределах этих диапазонов. Количество клеток будет зависеть от способа конечного применения, для которого предназначена данная композиция, а также от типа клеток, включенных в нее. Для вариантов применения, предусмотренных в данном документе, клетки в основном находятся в объеме один литр или меньше, при этом объем может составлять 500 мл или меньше, даже 250 мл или 100 мл или меньше. Следовательно, плотность требуемых клеток, как правило, превышает 10^6 клеток/мл и в основном превышает 10^7 клеток/мл, в основном составляет 10^8 клеток/мл или больше. Клинически значимое количество иммунных клеток можно распределить на несколько инфузий, которые совокупно равны или превышают 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} или

10^{12} клеток. В некоторых вариантах осуществления, в частности, если все введенные клетки будут перенаправлены на конкретный целевой антиген, можно вводить сниженные количества клеток в диапазоне $10^6/\text{кг}$ (10^6 — 10^{11} на пациента).

При необходимости, для усиления индукции иммунного ответа лечение может также включать введение митогенов (*например*, РНА) или лимфокинов, цитокинов и/или хемокинов (*например*, IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF-альфа, IL-18 и TNF-бета, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 α и *т. д.*), описываемых в данном документе.

В целом, композиции, содержащие клетки, активированные и размноженные, как описано в данном документе, можно использовать в лечении и предупреждении заболеваний, которые возникают у индивидуумов с ослабленным иммунитетом. В частности, композиции, рассматриваемые в данном документе, применяют в лечении рака. В конкретных вариантах осуществления иммунные эффекторный клетки можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с носителями, разбавителями, вспомогательными средствами и/или с другими компонентами, такими как IL-2 или другие цитокины или популяции клеток.

В конкретных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат некоторое количество генетически модифицированных Т-клеток в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными средствами.

В конкретных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат некоторое количество мостикового фактора в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными средствами.

В конкретном варианте осуществления композиции содержат эффективное количество иммунных эффекторных клеток, содержащих один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, рассматриваемых в данном документе, отдельно или в комбинации с мостиковым фактором и/или одним или несколькими терапевтическими средствами, такими как лучевая терапия, химиотерапия, трансплантация, иммунотерапия, гормональная терапия, фотодинамическая терапия и *т. д.* Композиции также можно вводить в комбинации с антибиотиками. Такие терапевтические средства могут быть приняты в данной области

техники в качестве стандартного лечения конкретного болезненного состояния, описываемого в данном документе, такого как конкретный тип рака. Примеры предусмотренных терапевтических средств включают цитокины, факторы роста, стероиды, NSAID, DMARD, противовоспалительные средства, химиотерапевтические средства, радиотерапевтические средства, терапевтические антитела или другие активные и вспомогательные средства.

В конкретном варианте осуществления субъекту вводят композицию, содержащую эффективное количество иммунных эффекторных клеток, содержащих полинуклеотид, кодирующий один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, рассматриваемых в данном документе, и композицию, содержащую эффективное количество мостикового фактора, вводят субъекту до, во время введения клеточной композиции, в комбинации с ней или после нее, и при необходимости вводят субъекту повторно.

В определенных вариантах осуществления композиции, содержащие иммунные эффекторные клетки, содержащие полинуклеотид, кодирующий один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, рассматриваемых в данном документе, можно вводить в комбинации с любым количеством противовоспалительных средств, химиотерапевтических средств или лекарственных средств на основе моноклональных антител и т. п.

I. СПОСОБЫ ТЕРАПИИ

Иммунные эффекторные клетки, модифицированные для экспрессии полинуклеотида, кодирующего один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, рассматриваемых в данном документе, обеспечивают улучшенные способы адоптивной иммунотерапии для использования в предотвращении, лечении и облегчении или для предупреждения, лечения или облегчения по меньшей мере одного симптома, связанного с иммунным нарушением, *например* раком.

Иммунные эффекторные клетки, содержащие компонент передачи сигналов DARIC к CD33, связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, обеспечивают улучшенные способы адоптивной иммунотерапии для использования в предотвращении, лечении и облегчении или для

предупреждения, лечения или облегчения по меньшей мере одного симптома, связанного с иммунным нарушением, *например* раком.

В конкретных вариантах осуществления, иммунные эффекторныe клетки модифицированы для экспрессии DARIC на основе VHH к CD33, обеспечивают улучшенные способы адаптивной иммунотерапии для тонкой настройки безопасности и эффективности цитотоксического ответа против клеток-мишеней, например опухолевых клеток, экспрессирующих антигены-мишени, при одновременном уменьшении риска развития цитотоксичности в ответ на антигены-мишени и клетки, отличные от клеток-мишеней (распознавание антигена-мишени на нормальной клетке).

В конкретных вариантах осуществления способ предупреждения, лечения или облегчения по меньшей мере одного симптома рака включает введение субъекту эффективного количества модифицированных иммунных эффекторных клеток или Т-клеток, содержащих один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33 для перенаправления клеток к клетке-мишени. Генетически модифицированные клетки представляют собой более эффективное и безопасное средство клеточной иммунотерапии благодаря передаче химически регулируемого иммуностимулирующего сигнала.

В конкретных вариантах осуществления одна или более иммунных эффекторных клеток, *например* Т-клетки, модифицированы для экспрессии как связывающего компонента DARIC на основе VHH к CD33, так и компонента передачи сигналов DARIC к CD33. В данном случае модифицированные клетки вводятся нуждающемуся в этом субъекту и нацеливаются на клетки-мишени посредством взаимодействия компонента связывания VHH к CD33, экспрессируемого на иммунной эффекторной клетке, и CD33, экспрессируемого на клетке-мишени. Мостиковый фактор вводят субъекту перед введением модифицированных клеток, приблизительно в то же время, что и модифицированные клетки, или после того, как модифицированные клетки были введены субъекту. В присутствии мостикового фактора образуется трехчастный комплекс между связывающим компонентом DARIC на основе VHH к CD33, мостиковым фактором и компонентом передачи сигналов DARIC к CD33. После образования трехчастного комплекса DARIC на основе VHH к CD33 передает иммуностимулирующий сигнал иммунной эффекторной клетке, которая, в свою очередь, вызывает цитотоксический ответ иммунной эффекторной клетки в отношении клетки-мишени.

В конкретных вариантах осуществления одна или более иммунных эффекторных клеток, *например* Т-клеток, модифицированы для экспрессии компонента передачи сигналов DARIC к CD33. В данном случае модифицированные клетки вводят нуждающемуся в этом субъекту. Связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 можно вводить субъекту перед введением модифицированных клеток, приблизительно в то же время, что и модифицированные клетки, или после того, как модифицированные клетки были введены субъекту. Кроме того, связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 можно вводить субъекту в предварительно сформированном комплексе с мостиковым фактором; одновременно с мостиковым фактором, но в отдельном составе; или во время, отличное от времени введения мостикового фактора. Связывающий компонент VHH к CD33 связывает CD33, экспрессируемый на клетке-мишени, либо в присутствии, либо в отсутствие мостикового фактора. В присутствии мостикового фактора образуется трехчастный комплекс между связывающим компонентом DARIC на основе VHH к CD33, мостиковым фактором и компонентом передачи сигналов DARIC к CD33. После образования трехчастного комплекса DARIC на основе VHH к CD33 передает иммуностимулирующий сигнал иммунной эффекторной клетке, которая, в свою очередь, вызывает цитотоксический ответ иммунной эффекторной клетки в отношении клетки-мишени.

В конкретных вариантах осуществления одна или более иммунных эффекторных клеток, *например* Т-клеток, модифицированы для экспрессии компонента передачи сигналов DARIC к CD33. В данном случае модифицированные клетки вводят нуждающемуся в этом субъекту. Связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 можно вводить субъекту перед введением модифицированных клеток, приблизительно в то же время, что и модифицированные клетки, или после того, как модифицированные клетки были введены субъекту. Кроме того, связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 можно вводить субъекту в предварительно сформированном комплексе с мостиковым фактором; одновременно с мостиковым фактором, но в отдельном составе; или во время, отличное от времени введения мостикового фактора. Связывающий компонент CD33 связывает антиген-мишень, экспрессируемый на клетке-мишени, либо в присутствии, либо в отсутствие мостикового фактора. В присутствии мостикового фактора образуется трехчастный комплекс между связывающим компонентом DARIC на основе VHH к CD33, мостиковым фактором и компонентом передачи сигналов DARIC к CD33. После образования трехчастного комплекса DARIC на основе VHH к CD33 передает

иммуностимулирующий сигнал иммунной эффекторной клетке, которая, в свою очередь, вызывает цитотоксический ответ иммунной эффекторной клетки в отношении клетки-мишени. В конкретных вариантах осуществления активация DARIC на основе VHH к CD33 может быть индуцирована в случаях, когда ремиссия или регресс являются неполными и состояние рецидивирует или становится рефрактерным к лечению.

В конкретных предпочтительных вариантах осуществления специфичность первичной Т-клетки перенаправляется на опухолевые или раковые клетки, которые экспрессируют CD33, путем генетической модификации Т-клетки, *например* первичной Т-клетки, с помощью одного или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33.

В конкретных предпочтительных вариантах осуществления специфичность первичной Т-клетки перенаправляется на опухолевые или раковые клетки, которые экспрессируют CD33, путем генетической модификации Т-клетки, *например* первичной Т-клетки, с помощью сконструированного антигенного рецептора, направленного на антиген-мишень и одного или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33.

В конкретных вариантах осуществления рассматриваемые в данном документе модифицированные иммунные эффекторные клетки используются при лечении солидных опухолей или типов рака.

В конкретных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, рассматриваемые в данном документе, используются для лечения солидных опухолей или типов рака, включая без ограничения следующие: рак надпочечников, карциному надпочечников, рак анального канала, рак аппендикса, астроцитому, атипичную тератоидную/рабдоидную опухоль, базальноклеточную карциному, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак костей, рак головного мозга/ЦНС, рак молочной железы, опухоли бронхов, опухоли сердца, рак шейки матки, холангиокарциному, хондросаркому, хордому, рак толстой кишки, колоректальный рак, краниофарингиому, протоковую карцинома in situ (DCIS), рак эндометрия, эпендимому, рак пищевода, эстезионеробластому, саркому Юинга, экстракраниальную герминогенную опухоль, внегонадную герминогенную опухоль, рак глаза, рак маточной трубы, фиброзную гистиосаркому, фибросаркому, рак желчного пузыря, рак желудка, желудочно-кишечные карциноидные опухоли, желудочно-кишечные стромальные опухоли, герминогенные опухоли, глиому, глиобластому, рак головы и шеи, гемангиобластому,

гепатоцеллюлярный рак, гипофарингеальный рак, интраокулярную меланому, саркому Капоши, рак почки, рак гортани, лейомиосаркому, рак губы, липосаркому, рак печени, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, карциноид легких, злокачественную мезотелиому, медуллярную карциному, медуллобластому, менингиому, меланому, карциному из клеток Меркеля, серединную карциному кишечного тракта, рак рта, злокачественную миксому, липосаркому, миелодиспластический синдром, миелопролиферативные новообразования, рак полости носа и околоносовых пазух, рак носоглотки, нейробластому, олигодендроглиому, рак ротовой полости, рак ротовой полости рта, рак ротоглотки, остеосаркому, рак яичника, рак поджелудочной железы, опухоли островковых клеток поджелудочной железы, папиллярную карциному, параганглиому, рак парашитовидной железы, рак полового представителя, рак глотки, феохромоцитому, пинеалому, опухоль гипофиза, плевропульмональную бластому, первичный рак брюшины, рак предстательной железы, рак прямой кишки, ретинобластому, почечно-клеточную карциному, рак таза и мочеочника, рабдомиосаркому, рак слюнных желез, карциному слюнной железы, рак кожи, саркому мягких тканей, плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак кишечника, рак желудка, карциному потовых желез, синовиому, рак яичка, рак горла, рак вилочковой железы, рак щитовидной железы, рак уретры, рак матки, саркому матки, рак влагалища, рак сосудов, рак вульвы и опухоль Вильмса.

В конкретных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, рассматриваемые в данном документе, используются при лечении солидных опухолей или типов рака, включая без ограничения немелкоклеточную карциному легкого, плоскоклеточный рак головы и шеи, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак щитовидной железы, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак пищевода, рак яичника, рак желудка, рак эндометрия, глиомы, глиобластомы и олигодендроглиому.

В конкретных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, рассматриваемые в данном документе, используются при лечении солидных опухолей или типов рака, включая без ограничения немелкоклеточный рак легкого, метастатический колоректальный рак, глиобластому, рак головы и шеи, рак поджелудочной железы и рак молочной железы.

В конкретных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, рассматриваемые в данном документе, используются при лечении глиобластомы.

В конкретных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, рассматриваемые в данном документе, используются при лечении гемобластозов или гематологических типов рака.

В конкретных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, рассматриваемые в данном документе, используются при лечении В-клеточных злокачественных новообразований, включая без ограничения следующие: лейкозы, лимфомы и множественную миелому.

В конкретных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, рассматриваемые в данном документе, используются при лечении гемобластозов, включая без ограничения лейкозы, лимфомы и множественные миеломы: острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный, эритролейкоз, волосатоклеточный лейкоз (HCL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и хронический миелоидный лейкоз (CML), хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML) и истинную полицитемию, лимфому Ходжкина, нодулярную лимфому Ходжкина с лимфоидным преобладанием, лимфому Беркитта, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, иммунобластную крупноклеточную лимфому, В-лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников, лимфому из клеток мантийной зоны, лимфому из клеток маргинальной зоны, грибовидный микоз, анапластическую крупноклеточную лимфому, синдром Сезари, Т-лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников, множественную миелому, манифестную множественную миелому, вялотекущую множественную миелому, плазмноклеточный лейкоз, несекреторную миелому, IgD-миелому, остеосклеротическую миелому, солитарную плазмоцитому кости и экстрамедуллярную плазмоцитому.

В конкретных вариантах осуществления рассматриваемые в данном документе модифицированные иммунные эффекторные клетки используются при лечении острого миелоидного лейкоза (AML).

Клетки, предпочтительные для использования в рассматриваемых в данном документе способах, включают аутологичные/аутогенные («собственные») клетки, предпочтительно гемопоэтические клетки, более предпочтительно Т-клетки и более предпочтительно иммунные эффекторные клетки.

В конкретных вариантах осуществления способ включает введение терапевтически эффективного количества модифицированных иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33, пациенту, нуждающемуся в этом, и также введение субъекту мостикового фактора. В определенных вариантах осуществления клетки применяют при лечении пациентов с риском развития иммунного нарушения. Таким образом, конкретные варианты осуществления включают лечение, предупреждение или облегчение по меньшей мере одного симптома иммунного нарушения, *например* рака, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества модифицированных иммунных эффекторных клеток, рассматриваемых в данном документе, и мостикового фактора.

В конкретных вариантах осуществления способ включает введение терапевтически эффективного количества модифицированных иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют CAR на основе антитела VHH к CD33, пациенту, нуждающемуся в этом. В определенных вариантах осуществления клетки применяют при лечении пациентов с риском развития иммунного нарушения. Таким образом, конкретные варианты осуществления включают лечение, предупреждение или облегчение по меньшей мере одного симптома иммунного нарушения, *например* рака, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества модифицированных иммунных эффекторных клеток, рассматриваемых в данном документе, и мостикового фактора.

В конкретных вариантах осуществления способ включает введение терапевтически эффективного количества модифицированных иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют компонент передачи сигналов DARIC к CD33, или композиции, содержащей таковые, пациенту, нуждающемуся в этом, и также введение субъекту связывающего компонента DARIC на основе VHH к CD33 и мостикового фактора, при этом необязательно связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 связан с мостиковым фактором перед введением. В определенных вариантах осуществления клетки применяют при лечении пациентов с риском развития иммунного нарушения. Таким образом, конкретные варианты осуществления включают лечение, предупреждение или облегчение по меньшей мере одного симптома иммунного нарушения, *например* рака, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества модифицированных иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют компонент передачи сигналов DARIC к CD33, и необязательно сконструированный

рецептор для антигена или другой связывающий компонент DARIC, связывающий компонент DARIC на основе VHH к CD33 и мостиковый фактор.

Количество и частоту введения модифицированных иммунных эффекторных клеток, связывающих компонентов DARIC на основе VHH к CD33 и/или мостикового фактора будут определять в зависимости от таких факторов, как состояние пациента, а также тип и тяжесть заболевания пациента, хотя соответствующие дозировки и схемы введения доз можно определить с помощью клинических испытаний.

В одном иллюстративном варианте осуществления эффективное количество модифицированных иммунных эффекторных клеток, предоставляемых субъекту, составляет по меньшей мере 2×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 3×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 4×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 5×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 6×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 7×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 8×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 9×10^6 клеток/кг или по меньшей мере 10×10^6 клеток/кг, или более клеток/кг, включая все промежуточные дозы клеток.

В другом иллюстративном варианте осуществления эффективное количество модифицированных иммунных эффекторных клеток, предоставляемых субъекту, составляет приблизительно 2×10^6 клеток/кг, приблизительно 3×10^6 клеток/кг, приблизительно 4×10^6 клеток/кг, приблизительно 5×10^6 клеток/кг, приблизительно 6×10^6 клеток/кг, приблизительно 7×10^6 клеток/кг, приблизительно 8×10^6 клеток/кг, приблизительно 9×10^6 клеток/кг или приблизительно 10×10^6 клеток/кг или больше клеток/кг, включая все промежуточные дозы клеток.

В другом иллюстративном варианте осуществления эффективное количество модифицированных иммунных эффекторных клеток, предоставляемых субъекту, составляет от приблизительно 2×10^6 клеток/кг до приблизительно 10×10^6 клеток/кг, от приблизительно 3×10^6 клеток/кг до приблизительно 10×10^6 клеток/кг, от приблизительно 4×10^6 клеток/кг до приблизительно 10×10^6 клеток/кг, от приблизительно 5×10^6 клеток/кг до приблизительно 10×10^6 клеток/кг, от 2×10^6 клеток/кг до приблизительно 6×10^6 клеток/кг, от 2×10^6 клеток/кг до приблизительно 8×10^6 клеток/кг, от 3×10^6 клеток/кг до приблизительно 6×10^6 клеток/кг, от 3×10^6 клеток/кг до приблизительно 7×10^6 клеток/кг, от 3×10^6 клеток/кг до приблизительно 8×10^6 клеток/кг, от 4×10^6

клеток/кг до приблизительно 6×10^6 клеток/кг, от 4×10^6 клеток/кг до приблизительно 7×10^6 клеток/кг, от 4×10^6 клеток/кг до приблизительно 8×10^6 клеток/кг, от 5×10^6 клеток/кг до приблизительно 6×10^6 клеток/кг, от 5×10^6 клеток/кг до приблизительно 7×10^6 клеток/кг, от 5×10^6 клеток/кг до приблизительно 8×10^6 клеток/кг или от 6×10^6 клеток/кг до приблизительно 8×10^6 клеток/кг, включая все промежуточные дозы клеток.

Специалисту средней квалификации в данной области техники будет понятно, что для осуществления необходимого лечения могут потребоваться множественные введения композиций, рассмотренных в конкретных вариантах осуществления. Например, композиция может быть введена 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или больше раз на протяжении 1 недели, 2 недель, 3 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 5 лет, 10 лет или больше. Модифицированные иммунные эффекторные клетки, компоненты DARIC на основе VHN к CD33 и мостиковый фактор можно вводить в виде одной или разных композиций; в виде одной или нескольких композиций одновременно; или в виде более чем одной композиции в разное время. Модифицированные иммунные эффекторные клетки, компоненты DARIC на основе VHN к CD33 и мостиковый фактор можно вводить одним и тем же путем введения или разными путями.

В определенных вариантах осуществления может быть необходимо вводить субъекту активированные Т-клетки, а затем осуществлять забор крови (или выполнять аферез), активировать полученные из нее Т-клетки и осуществлять повторную инфузию этих активированных и размноженных Т-клеток пациенту. Этот процесс можно осуществлять несколько раз через каждые несколько недель. В определенных вариантах осуществления Т-клетки можно активировать из крови, взятой в количестве от 10 см³ до 400 см³. В определенных вариантах осуществления Т-клетки активируют из крови, взятой в количестве 20 см³, 30 см³, 40 см³, 50 см³, 60 см³, 70 см³, 80 см³, 90 см³, 100 см³, 150 см³, 200 см³, 250 см³, 300 см³, 350 см³ или 400 см³ или больше. Не привязываясь к какой-либо теории, применение такого протокола множественного взятия крови/множественной повторной инфузии может служить для отбора определенных популяций Т-клеток.

В одном варианте осуществления способ лечения субъекта, у которого был диагностирован рак, включает извлечение иммунных эффекторных клеток из субъекта, модификацию иммунных эффекторных клеток с помощью введения одного или более

векторов, кодирующих один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33, в клетку, и получение популяции модифицированных иммунных эффекторных клеток, и введение популяции модифицированных иммунных эффекторных клеток тому же субъекту. В предпочтительном варианте осуществления иммунные эффекторные клетки представляют собой Т-клетки.

В одном варианте осуществления способ лечения субъекта, у которого был диагностирован рак, включает извлечение иммунных эффекторных клеток из субъекта, модификацию иммунных эффекторных клеток с помощью введения в клетку одного или более векторов, кодирующих CAR на основе антитела VHH к CD33, и получение популяции модифицированных иммунных эффекторных клеток, и введение популяции модифицированных иммунных эффекторных клеток тому же субъекту. В предпочтительном варианте осуществления иммунные эффекторные клетки представляют собой Т-клетки.

Способы для введения композиций на основе клеток, рассматриваемых в конкретных вариантах осуществления, включают любой способ, который является эффективным для повторного введения *ex vivo* модифицированных иммунных эффекторных клеток, или для повторного введения модифицированных предшественников иммунных эффекторных клеток, которые после введения субъекту дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки. Один способ включает модификацию Т-клеток периферической крови *ex vivo* с помощью введения одного или более векторов, кодирующих один или более компонентов DARIC на основе VHH к CD33 или CAR на основе антитела VHH к CD33, в клетку и возвращение трансдуцированных клеток субъекту.

Все публикации, патентные заявки и выданные патенты, цитируемые в настоящем описании, включены в данный документ посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация, патентная заявка или выданный патент были конкретно и индивидуально указаны как включенные посредством ссылки.

Хотя вышеизложенные варианты осуществления были довольно подробно описаны в целях иллюстрации и обеспечения примера для ясности понимания, специалисту средней квалификации в данной области техники будет очевидно в свете идей, рассматриваемых в данном документе, что в него могут быть внесены определенные изменения и модификации без отступления от сущности или объема прилагаемой формулы

изобретения. Следующие примеры предусмотрены только в качестве иллюстрации, и не в качестве ограничения. Специалисты в данной области техники без труда смогут выявить целый ряд второстепенных параметров, которые можно было бы изменить или модифицировать в конкретных вариантах осуществления, чтобы получить по существу такие же результаты.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

Т-КЛЕТКИ С DARIC НА ОСНОВЕ VHH К CD33 ПРОЯВЛЯЮТ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ОТВЕТЫ

Связывающие компоненты и компоненты передачи сигналов DARIC на основе антитела VHH к CD33 были разработаны, сконструированы и проверены. CD33-специфические лентивирусные векторы с DARIC на основе VHH были сконструированы таким образом, чтобы они содержали промотор MNDU3, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим следующее: компонент передачи сигналов DARIC (сигнальный пептид CD8 α , вариант FRB (T82L), трансмембранный домен CD8 α , внутриклеточный домен костимуляции 4-1BB и сигнальный домен CD3 дзета); последовательность P2A; и связывающий компонент DARIC (сигнальный пептид Igk, CD33-специфический связывающий домен VHH (верблюдовых или гуманизированный), линкер G4S, домен FKBP12 и полученный из CD4 трансмембранный домен с усеченным внутриклеточным доменом (фигура 1B)). См., например, SEQ ID NO: 32—41. Т-клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами с DARIC к CD33, экспрессируют связанные с мембраной полипептиды, показанные на фигуре 1A. Структуру CAR или DARIC на основе scFv к CD33 использовали в качестве контроля.

Все Т-клетки от трех доноров трансдуцировали с помощью LVV, кодирующих различные DARIC на основе VHH, специфичного к CD33, DARIC на основе scFv к CD33 или CAR на основе scFv к CD33, и размножали в течение 10 дней. Нетрансдуцированные Т-клетки, Т-клетки, трансдуцированные контрольными конструкциями, представляющими собой scFv к CD33, или Т-клетки с DARIC на основе антитела VHH к CD33 окрашивали рекомбинантным реагентом CD33-Fc. Только для контрольных Т-клеток с CAR и с DARIC было получено положительное окрашивание при окрашивании с помощью CD33-Fc (фигура 2A, нижняя панель,

фигура 2B). Однако для большинства Т-клеток с DARIC на основе антитела VHH к CD33, за исключением контрольных Т-клеток с CAR или с DARIC, было получено положительное окрашивание при анализе с использованием моноклональных антител, специфичных в отношении домена VHH (фигура 2A, верхняя панель). Как контрольные Т-клетки с CAR и с DARIC, так и Т-клетки с DARIC на основе антитела VHH к CD33 имели сходный Т-клеточный фенотип, что было определено, частично, путем окрашивания с помощью CD62L и CD45RA (фигура 3A и фигура 3B).

Нетрансдуцированные Т-клетки, Т-клетки, трансдуцированные контрольными конструкциями с scFv к CD33, или Т-клетки с DARIC на основе антитела VHH к CD33 культивировали совместно с клетками THP-1 CD33⁺ при соотношении E:T, составляющем 1:1, в присутствии или отсутствие AP21967 в течение 24 часов. Контрольные клетки с CAR на основе scFv к CD33 характеризовались высоким уровнем продуцирования цитокинов как в присутствии, так и в отсутствие рапалога. Т-клетки с DARIC на основе scFv к CD33 и Т-клетки с DARIC на основе антитела VHH к CD33 проявляли устойчивый цитокиновый ответ только при культивировании с клеткой THP-1 в присутствии AP21967 (фигура 4A и фигура 4B). Минимальная продукция цитокинов была обнаружена в нетрансдуцированных контролях.

Кроме того, специфичность DARIC на основе VHH9 и VHH10 оценивалась в отношении как полноразмерного CD33 (CD33M), так и сплайс-варианта, который экспрессируется в виде более короткого, усеченного CD33 (CD33m). Клетки 293T человека подвергали электропорации с использованием мРНК, кодирующей либо полноразмерный CD33M, либо сплайс-вариант CD33m (фигура 4C). Т-клетки с DARIC культивировали совместно с модифицированными клетками 293T при соотношении E:T, составляющем 1:1, в присутствии или отсутствие AP21967 в течение 24 часов и оценивали в отношении активации, которую измеряли по секреции цитокинов (фигура 4C). Т-клетки с DARIC на основе VHH9 проявляли устойчивый цитокиновый ответ в ответ на клетки 293T с CD33M или CD33m, тогда как Т-клетки с DARIC на основе VHH10 активировались только в присутствии CD33M.

ПРИМЕР 2Т-КЛЕТКИ С DARIC НА ОСНОВЕ VHH К CD33 СПЕЦИФИЧЕСКИ РЕАГИРУЮТ НА АНТИГЕН
CD33

Т-клетки с DARIC на основе антитела VHH к CD33 получали, как описано в примере 1. Все Т-клетки от трех доноров трансдуцированы с помощью LVV, кодирующих различные DARIC на основе VHH, специфичного к CD33, и размножали в течение 10 дней. Контроли включали нетрансдуцированные (UTD) Т-клетки и Т-клетки, трансдуцированные с помощью CAR к CD33. Линия клеток AML MV4-11 в норме экспрессирует CD33. Клетки MV4-11 были сконструированы с обеспечением нокаута гена CD33 (клетки CD33-KO). В полученной линии клеток CD33-KO отсутствовала экспрессия CD33 на клеточной поверхности. Фигура 5А. Т-клетки с DARIC на основе антитела VHH к CD33 культивировали совместно с клетками MV4-11 или клетками CD33-KO при соотношении Е:Т, составляющем 1:1, в присутствии или отсутствии димеризирующего лекарственного средства в течение 24 часов. Т-клетки с DARIC на основе антитела VHH к CD33 продуцировали цитокин в присутствии клеток-мишеней MV4-11, но не в присутствии клеток CD33-KO. Фигура 5В.

Линия клеток CD33-KO была модифицирована для экспрессии сплайс-варианта CD33m (CD33-KO-C2). Клетки MV4-11 и клетки CD33-KO-C2 культивировали совместно с UTD клетками, Т-клетками с CAR к CD33 или Т-клетками с DARIC на основе антитела VHH к CD33 в присутствии или в отсутствии димеризирующего лекарственного средства и анализировали продукцию цитокинов через 24 часа. DARIC на основе антитела VHH9 к CD33 распознавал как нормальный CD33, так и сплайс-вариант CD33m и продуцировал цитокин при совместном культивировании с клетками MV4-11 или клетками CD33-KO-C2 (фигура 5С). Т-клетки с CAR к CD33 или контрольные Т-клетки с DARIC на основе VHH2 к CD33 были активны только в отношении клеток-мишеней MV4-11.

ПРИМЕР 3

Т-КЛЕТКИ С DARIC НА ОСНОВЕ VHH К CD33 НЕ ИНГИБИРУЮТСЯ РАСТВОРИМЫМ БЕЛКОМ CD33

Т-клетки с DARIC на основе антитела VHH к CD33 получали, как описано в примере 1. Все Т-клетки от трех доноров трансдуцированы с помощью LVV, кодирующих различные DARIC на основе VHH, специфичного к CD33, и размножали в течение 10 дней. Т-клетки с DARIC на основе антитела VHH к CD33 культивировали совместно с клетками THP-1 CD33⁺ при соотношении E:T, составляющем 1:1, в присутствии или отсутствие рапамицина в течение 24 часов. В течение периода совместного культивирования добавляли различные количества рекомбинантного белка CD33-Fc. Т-клетки с DARIC на основе антитела VHH к CD33 проявляли устойчивый цитокиновый ответ в присутствии рапамицина в присутствии и отсутствии рекомбинантного растворимого белка CD33. Фигура 6.

ПРИМЕР 4

Т-КЛЕТКИ С DARIC НА ОСНОВЕ VHH К CD33 РЕАГИРУЮТ НА НИЗКИЕ УРОВНИ АНТИГЕНА CD33

Т-клетки с DARIC на основе антитела VHH к CD33 получали, как описано в примере 1. Все Т-клетки от трех доноров трансдуцированы с помощью LVV, кодирующих различные DARIC на основе VHH, специфичного к CD33, и размножали в течение 10 дней. Т-клетки с DARIC на основе антитела VHH к CD33 культивировали совместно с димеризирующим лекарственным средством AP21967 и CD33^{отриц.} клетками 293Т, трансфицированными различными количествами мРНК, кодирующей CD33. Супернатант собирали через 24 часа и анализировали продукцию цитокинов. Т-клетки с DARIC на основе антитела VHH к CD33 показали дозозависимое увеличение продукции IFN γ после совместного культивирования с клетками-мишенями, трансфицированными с помощью CD33, даже при очень низких концентрациях мРНК (фигура 7).

ПРИМЕР 5

Т-КЛЕТКИ С DARIC НА ОСНОВЕ VHH К CD33 ОБЕСПЕЧИВАЮТ КОНТРОЛЬ РОСТА ОПУХОЛИ *IN VIVO*

Т-клетки с DARIC на основе антитела VHH к CD33 получали, как описано в примере 1. Опухоли, экспрессирующие CD33, имплантировали мышам NSG с иммунодефицитом путем инокуляции мышей опухолевыми клетками AML HL60, экспрессирующими репортерный ген люциферазы. Мониторинг роста опухоли осуществляли по люминесценции. Через 10 дней мышам вводили 10×10^6 Т-клеток с DARIC на основе антитела VHH к CD33 совместно со средой-носителем или рапамицином. Контроли включали мышей, которым вводили только рапамицин или нетрансдуцированные (UTD) Т-клетки. Рост опухоли являлся сопоставимым как в экспериментальной, так и в контрольной группах. Фигура 8А. У мышей, которых обрабатывали с использованием Т-клеток с DARIC на основе антитела VHH к CD33 и рапамицина, наблюдалось повышение уровня контроля опухоли по сравнению с мышами, которых обрабатывали с использованием нетрансдуцированных Т-клеток и рапамицина. Фигура 8В.

В целом, в нижеследующей формуле изобретения используемые термины не должны толковаться как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в данном описании и формуле изобретения, но должны быть истолкованы как включающие все возможные варианты осуществления вместе с полным объемом эквивалентов, которые такая формула изобретения охватывает. Соответственно, формула изобретения не ограничивается настоящим раскрытием.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими вариантами осуществления.

1. Неприродная клетка, содержащая:

(a) первый полипептид, содержащий: полипептид домена мультимеризации FRB или его вариант; трансмембранный домен CD8 α или трансмембранный домен CD4; домен костимуляции CD137 и/или домен передачи первичного сигнала CD3 ζ ; и

(b) второй полипептид, содержащий: антитело VHH к CD33, которое имеет аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 2—

21; полипептид домена мультимеризации FKBP или его вариант; и трансмембранный домен CD4 или трансмембранный домен CD8 α ;

где мостиковый фактор способствует образованию полипептидного комплекса на поверхности неприродной клетки, при этом мостиковый фактор связан с доменами мультимеризации первого и второго полипептидов и располагается между ними.

2. Неприродная клетка по п. 1, где домен мультимеризации FKBP представляет собой FKBP12.

3. Неприродная клетка по п. 1 или п. 2, где полипептид FRB представляет собой FRB с T2098L.

4. Неприродная клетка по любому из пп. 1—3, где мостиковый фактор выбран из группы, состоящей из AP21967, сиролимуса, эверолимуса, новолимуса, пимекролимуса, ридафоролимуса, такролимуса, темсиролимуса, умиролимуса и зотаролимуса.

5. Неприродная клетка по любому из пп. 1—4, где первый полипептид содержит сигнальный пептид, трансмембранный домен CD8 α ; домен костимуляции CD137 и домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

6. Неприродная клетка по любому из пп. 1—5, где второй полипептид содержит сигнальный пептид и трансмембранный домен CD4.

7. Неприродная клетка по любому из пп. 1—6, где второй полипептид содержит домен костимуляции.

8. Неприродная клетка по п. 7, где домен костимуляции второго полипептида выбран из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из Toll-подобного рецептора 1 (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, представителя 11 семейства доменов рекрутирования каспаз (CARD11), CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD94, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), белка 10 активации DNAX (DAP10), представителя 1 семейства линкеров для активации Т-клеток (LAT), содержащего SH2-домен лейкоцитарного белка с молекулярной массой 76 кДа (SLP76), трансмембранного адаптера 1, ассоциированного с рецептором Т-клетки (TRAT1), TNFR2, TNFRS14, TNFRS18,

TNRFS25 и дзета-цепи протеинкиназы 70, ассоциированной с рецептором Т-клетки (ZAP70).

9. Неприродная клетка по п. 7 или п. 8, где домен костимуляции второго полипептида представляет собой домен костимуляции, выделенный из OX40 или TNFR2.

10. Неприродная клетка по любому из пп. 1—9, где второй полипептид содержит последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 22—31.

11. Неприродная клетка, содержащая полипептидный комплекс, который содержит:

(a) первый полипептид, содержащий: полипептид домена мультимеризации FRB или его вариант; трансмембранный домен CD8 α или трансмембранный домен CD4; домен костимуляции CD137 и/или домен передачи первичного сигнала CD3 ζ ;

(b) второй полипептид, содержащий: антитело VHH к CD33, которое имеет аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 2—21; полипептид домена мультимеризации FKBP или его вариант; и трансмембранный домен CD4 или трансмембранный домен CD8 α ; и

(c) мостиковый фактор, связанный с доменами мультимеризации первого и второго полипептидов и расположенный между ними.

12. Неприродная клетка по п. 11, где домен мультимеризации FKBP представляет собой FKBP12.

13. Неприродная клетка по п. 11 или п. 12, где полипептид FRB представляет собой FRB с T2098L.

14. Неприродная клетка по любому из пп. 11—13, где мостиковый фактор выбран из группы, состоящей из AP21967, сиролимуса, эверолимуса, новолимуса, пимекролимуса, ридафоролимуса, такролимуса, темсиролимуса, умиролимуса и зотаролимуса.

15. Неприродная клетка по любому из пп. 11—14, где первый полипептид содержит сигнальный пептид, трансмембранный домен CD8 α ; домен костимуляции CD137 и домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

16. Неприродная клетка по любому из пп. 11—15, где второй полипептид содержит сигнальный пептид и трансмембранный домен CD4.

17. Неприродная клетка по любому из пп. 11—16, где второй полипептид содержит домен костимуляции.

18. Неприродная клетка по п. 17, где домен костимуляции второго полипептида выбран из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из Toll-подобного рецептора 1 (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, представителя 11 семейства доменов рекрутирования каспаз (CARD11), CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD94, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), белка 10 активации DNAX (DAP10), представителя 1 семейства линкеров для активации Т-клеток (LAT), содержащего SH2-домен лейкоцитарного белка с молекулярной массой 76 кДа (SLP76), трансмембранного адаптера 1, ассоциированного с рецептором Т-клетки (TRAT1), TNFR2, TNFRS14, TNFRS18, TNFRS25 и дзета-цепи протеинкиназы 70, ассоциированной с рецептором Т-клетки (ZAP70).

19. Неприродная клетка по п. 17 или п. 18, где домен костимуляции второго полипептида представляет собой домен костимуляции, выделенный из OX40 или TNFR2.

20. Неприродная клетка по любому из пп. 11—19, где второй полипептид содержит последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 22—31.

21. Неприродная клетка по любому из пп. 1—20, где клетка представляет собой гемопоэтическую клетку.

22. Неприродная клетка по любому из пп. 1—21, где клетка представляет собой Т-клетку, $\alpha\beta$ Т-клетку или $\gamma\delta$ Т-клетку.

23. Неприродная клетка по любому из пп. 1—22, где клетка представляет собой клетку CD3⁺, CD4⁺ и/или CD8⁺.

24. Неприродная клетка по любому из пп. 1—23, где клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку.

25. Неприродная клетка по любому из пп. 1—24, где клетка представляет собой цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL) или хелперную Т-клетку.

26. Неприродная клетка по любому из пп. 1—25, где клетка представляет собой естественную клетку-киллера (NK) или Т-клетку с функциями естественных киллеров (NKT).

27. Неприродная клетка по любому из пп. 1—26, где источником клеток являются мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинная кровь, ткань тимуса, ткань из очага инфекции, асциты, плевральный выпот, ткань селезенки или опухоли.

28. Неприродная клетка по любому из пп. 1—27, где домен мультимеризации FRB и домен мультимеризации FKBP локализуются вне клетки, если экспрессируются в составе первого полипептида и второго полипептида.

29. Слитый полипептид, содержащий:

(a) первый полипептид, содержащий: полипептид домена мультимеризации FRB или его вариант; трансмембранный домен CD8 α или трансмембранный домен CD4; домен костимуляции CD137 и/или домен передачи первичного сигнала CD3 ζ ;

(b) сигнал расщепления полипептида; и

(c) второй полипептид, содержащий: антитело VHH к CD33, которое имеет аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 2—21; полипептид домена мультимеризации FKBP или его вариант и трансмембранный домен CD4 или трансмембранный домен CD8 α .

30. Слитый полипептид по п. 29, где домен мультимеризации FKBP представляет собой FKBP12.

31. Слитый полипептид по п. 29 или п. 30, где полипептид FRB представляет собой FRB с T2098L.

32. Слитый полипептид по любому из пп. 29—31, где мостиковый фактор выбран из группы, состоящей из AP21967, сиролимуса, эверолимуса, новолимуса,

пимекролимуса, ридафоролимуса, такролимуса, темсиролимуса, умиролимуса и зотаролимуса.

33. Слитый полипептид по любому из пп. 29—32, где первый полипептид содержит сигнальный пептид, трансмембранный домен CD8 α ; домен костимуляции CD137 и домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

34. Слитый полипептид по любому из пп. 29—33, где второй полипептид содержит сигнальный пептид и трансмембранный домен CD4.

35. Неприродная клетка по любому из пп. 29-34, где слитый полипептид содержит последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 32—41.

36. Слитый полипептид по любому из пп. 29—35, где второй полипептид содержит домен костимуляции.

37. Слитый полипептид по п. 36, где домен костимуляции второго полипептида выбран из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из Toll-подобного рецептора 1 (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, представителя 11 семейства доменов рекрутирования каспаз (CARD11), CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD94, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), белка 10 активации DNAX (DAP10), представителя 1 семейства линкеров для активации Т-клеток (LAT), содержащего SH2-домен лейкоцитарного белка с молекулярной массой 76 кДа (SLP76), трансмембранного адаптера 1, ассоциированного с рецептором Т-клетки (TRAT1), TNFR2, TNFRS14, TNFRS18, TNFRS25 и дзета-цепи протеинкиназы 70, ассоциированной с рецептором Т-клетки (ZAP70).

38. Слитый полипептид по п. 36 или п. 37, где домен костимуляции второго полипептида представляет собой домен костимуляции, выделенный из OX40 или TNFR2.

39. Слитый полипептид по любому из пп. 29—38, где сигнал расщепления полипептида представляет собой вирусный саморасщепляющийся полипептид.

40. Слитый полипептид по любому из пп. 29—39, где сигнал расщепления полипептида представляет собой вирусный саморасщепляющийся полипептид 2A.

41. Слитый полипептид по любому из пп. 29—40, где сигнал расщепления полипептида представляет собой вирусный саморасщепляющийся полипептид, выбранный из группы, состоящей из пептида вируса ящура (FMDV) (F2A), пептида вируса ринита А лошадей (ERAV) (E2A), пептида вируса *Thosea asigna* (TaV) (T2A), пептида свиного тесковируса-1 (PTV-1) (P2A), пептида 2А тейловируса и пептида 2А вируса энцефаломиокардита.

42. Неприродная клетка по любому из пп. 29—41, где слитый полипептид содержит последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 42—61.

43. Слитый полипептид по любому из пп. 29—42, где домен мультимеризации FRB и домен мультимеризации FKBP локализируются вне клетки, если экспрессируются в составе первого полипептида и второго полипептида.

44. Полипептидный комплекс, содержащий:

(а) первый полипептид, содержащий: полипептид домена мультимеризации FRB или его вариант; трансмембранный домен CD8 α или трансмембранный домен CD4; домен костимуляции CD137 и/или домен передачи первичного сигнала CD3 ζ ;

(b) второй полипептид, содержащий: антитело VHH к CD33, которое имеет аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 2—21; полипептид домена мультимеризации FKBP или его вариант; и трансмембранный домен CD4 или трансмембранный домен CD8 α ; и

(с) мостиковый фактор, связанный с доменами мультимеризации первого и второго полипептидов и расположенный между ними.

45. Полипептидный комплекс по п. 44, где домен мультимеризации FKBP представляет собой FKBP12.

46. Полипептидный комплекс по п. 44 или п. 45, где полипептид FRB представляет собой FRB с T2098L.

47. Полипептидный комплекс по любому из пп. 44—46, где мостиковый фактор выбран из группы, состоящей из AP21967, сиролимуса, эверолимуса, новолимуса,

пимекролимуса, ридафоролимуса, такролимуса, темсиролимуса, умиролимуса и зотаролимуса.

48. Полипептидный комплекс по любому из пп. 44—47, где первый полипептид содержит трансмембранный домен CD8 α ; домен костимуляции CD137 и домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

49. Полипептидный комплекс по любому из пп. 44—48, где второй полипептид содержит трансмембранный домен CD4.

50. Полипептидный комплекс по любому из пп. 44—49, где второй полипептид содержит домен костимуляции.

51. Полипептидный комплекс по п. 50, где домен костимуляции второго полипептида выбран из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из Toll-подобного рецептора 1 (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, представителя 11 семейства доменов рекрутирования каспаз (CARD11), CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD94, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), белка 10 активации DNAX (DAP10), представителя 1 семейства линкеров для активации Т-клеток (LAT), содержащего SH2-домен лейкоцитарного белка с молекулярной массой 76 кДа (SLP76), трансмембранного адаптера 1, ассоциированного с рецептором Т-клетки (TRAT1), TNFR2, TNFRS14, TNFRS18, TNFRS25 и дзета-цепи протеинкиназы 70, ассоциированной с рецептором Т-клетки (ZAP70).

52. Полипептидный комплекс по п. 50 или п. 51, где домен костимуляции второго полипептида представляет собой домен костимуляции, выделенный из OX40 или TNFR2.

53. Полипептидный комплекс по любому из пп. 44—52, где клетка представляет собой гемопоэтическую клетку.

54. Полипептидный комплекс по любому из пп. 44—53, где клетка представляет собой Т-клетку, $\alpha\beta$ Т-клетку или $\gamma\delta$ Т-клетку.

55. Полипептидный комплекс по любому из пп. 44—54, где клетка представляет собой клетку CD3 $^+$, CD4 $^+$ и/или CD8 $^+$.

56. Полипептидный комплекс по любому из пп. 44—55, где клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку.

57. Полипептидный комплекс по любому из пп. 44—56, где клетка представляет собой цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL) или хелперную Т-клетку.

58. Полипептидный комплекс по любому из пп. 44—57, где клетка представляет собой естественную клетку-киллера (NK) или Т-клетку с функциями естественных киллеров (NKT).

59. Полипептидный комплекс по любому из пп. 44—58, где источником клеток являются мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинная кровь, ткань тимуса, ткань из очага инфекции, асциты, плевральный выпот, ткань селезенки или опухоли.

60. Полипептидный комплекс по любому из пп. 44—59, где домен мультимеризации FRB и домен мультимеризации FKBP локализуются вне клетки, если экспрессируются в составе первого полипептида и второго полипептида.

61. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий:

a) антитело VHH к CD33, которое имеет аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 2—21;

b) шарнирный домен;

c) трансмембранный домен;

d) один или более внутриклеточных доменов передачи костимулирующего сигнала; и/или

e) домен передачи первичного сигнала.

62. CAR по п. 61, где CAR содержит в направлении от 5' к 3':

a) антитело VHH к CD33, которое имеет аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 2—21;

- b) шарнирный домен;
- c) трансмембранный домен;
- d) один или более внутриклеточных доменов передачи костимулирующего сигнала; и/или
- e) домен передачи первичного сигнала.

63. CAR по п. 61 или п. 62, где шарнирный домен и трансмембранный домен выделены из CD8 α , CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD71, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD154, AMN и PD1.

64. CAR по любому из пп. 61—63, где один или более доменов передачи костимулирующего сигнала выделены из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD28, CD134, CD137 и CD278.

65. CAR по любому из пп. 61—64, где CAR содержит сигнальный пептид CD8 α , шарнирный и трансмембранный домен CD8 α , домен костимуляции CD134 и домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

66. CAR, содержащий аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 62—81.

67. Полинуклеотид, кодирующий первый или второй полипептид по любому из пп. 1—28, слитый полипептид по любому из пп. 29—43 или CAR по любому из пп. 61—66.

68. кДНК, кодирующая первый или второй полипептид по любому из пп. 1—28, слитый полипептид по любому из пп. 29—43 или CAR по любому из пп. 61—66.

69. РНК, кодирующая первый или второй полипептид по любому из пп. 1—28, слитый полипептид по любому из пп. 29—43 или CAR по любому из пп. 61—66.

70. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 67—69.

71. Вектор по п. 70, где вектор представляет собой вектор экспрессии.

72. Вектор по п. 70, где вектор представляет собой транспозон.

73. Вектор по п. 72, где вектор представляет собой транспозон piggyBAC или транспозон "Спящая красавица".

74. Вектор по п. 70, где вектор представляет собой вирусный вектор.

75. Вектор по п. 74, где вектор представляет собой аденовирусный вектор, вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), вектор на основе вируса герпеса, вектор на основе вируса осповакцины или ретровирусный вектор.

76. Вектор по п. 75, где ретровирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор.

77. Вектор по п. 76, где лентивирусный вектор выбран из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека 1 (HIV-1); вируса иммунодефицита человека 2 (HIV-2); вируса висна-маеди (VMV); вируса артрита-энцефалита коз (CAEV); вируса инфекционной анемии лошадей (EIAV); вируса иммунодефицита кошек (FIV); вируса иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV) и вируса иммунодефицита обезьян (SIV).

78. Клетка, содержащая первый и второй полипептид по любому из пп. 1—28, слитый полипептид по любому из пп. 29—43 или CAR по любому из пп. 61—66.

79. Клетка по п. 78, где клетка представляет собой гемопоэтическую клетку.

80. Клетка по п. 78 или п. 79, где клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку.

81. Клетка по любому из пп. 78—80, где клетка представляет собой Т-клетку, $\alpha\beta$ Т-клетку или $\gamma\delta$ Т-клетку.

82. Клетка по любому из пп. 78—81, где клетка экспрессирует $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ или их комбинацию.

83. Клетка по любому из пп. 78—82, где клетка представляет собой цитотоксический Т-лимфоцит (CTL), инфильтрирующий опухоль лимфоцит (TIL) или хелперную Т-клетку.

84. Клетка по любому из пп. 78—83, где клетка представляет собой естественную клетку-киллера (NK) или Т-клетку с функциями естественных киллеров (NKT).

85. Композиция, содержащая клетку по любому из пп. 1—28 и 78—84.
86. Композиция, содержащая физиологически приемлемый носитель и клетку по любому из пп. 1—28 и 78—84.
87. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества композиции по п. 85 или п. 86.
88. Способ лечения, предупреждения или облегчения по меньшей мере одного симптома рака, инфекционного заболевания, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания и иммунодефицита или состояния, связанного с ними, включающий введение субъекту эффективного количества композиции по п. 85 или п. 86.
89. Способ лечения солидного рака, включающий введение субъекту эффективного количества композиции по п. 85 или п. 86.
90. Способ по п. 89, где солидный рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, плоскоклеточной карциномы, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака щитовидной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака пищевода, рака яичника, рака желудка, рака эндометрия или рака головного мозга.
91. Способ по п. 89 или п. 90, где солидный рак представляет собой немелкоклеточную карциному легкого, плоскоклеточный рак головы и шеи, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак щитовидной железы, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак пищевода, рак яичника, рак желудка, рак эндометрия, глиомы, глиобластомы или олигодендроглиому.
92. Способ лечения гематологического злокачественного новообразования, включающий введение субъекту эффективного количества композиции по п. 85 или п. 86.
93. Способ по п. 92, где гематологическое злокачественное новообразование представляет собой лейкоз, лимфому или множественную миелому.
94. Способ по п. 92, где гематологическое злокачественное новообразование представляет собой острый миелогенный лейкоз (AML).

Заменяющая формула изобретения

1. Неприродная клетка, содержащая:

(а) первый полипептид, содержащий: полипептид домена мультимеризации FRB или его вариант; трансмембранный домен CD8 α или трансмембранный домен CD4; домен костимуляции CD137 и/или домен передачи первичного сигнала CD3 ζ ; и

(б) второй полипептид, содержащий: антитело VHH к CD33, которое имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10; полипептид домена мультимеризации FKBP или его вариант и трансмембранный домен CD4 или трансмембранный домен CD8 α ;

где мостиковый фактор способствует образованию полипептидного комплекса на поверхности неприродной клетки, при этом мостиковый фактор связан с доменами мультимеризации первого и второго полипептидов и располагается между ними.

2. Неприродная клетка по п. 1, где домен мультимеризации FKBP представляет собой FKBP12, и/или где полипептид FRB представляет собой FRB с T2098L.

3. Неприродная клетка по п. 1 или п. 2, где мостиковый фактор выбран из группы, состоящей из AP21967, сиролимуса, эверолимуса, новолимуса, пимекролимуса, ридафоролимуса, такролимуса, темсиролимуса, умиролимуса и зотаролимуса.

4. Неприродная клетка по любому из пп. 1—3, где первый полипептид содержит сигнальный пептид, трансмембранный домен CD8 α ; домен костимуляции CD137 и домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

5. Неприродная клетка по любому из пп. 1—4, где второй полипептид содержит сигнальный пептид и трансмембранный домен CD4 и/или домен костимуляции.

6. Неприродная клетка по п. 4 или п. 5, где домен костимуляции второго полипептида представляет собой домен костимуляции, выделенный из OX40 или TNFR2.

7. Неприродная клетка по любому из пп. 1—6, где второй полипептид содержит последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 22—31.

8. Неприродная клетка по любому из пп. 1—7, где клетка представляет собой

a) гемопоэтическую клетку,

b) T-клетку, $\alpha\beta$ T-клетку или $\gamma\delta$ T-клетку,

c) клетку CD3⁺, CD4⁺ и/или CD8⁺,

d) иммунную эффекторную клетку,

e) цитотоксический T-лимфоцит (CTL), инфильтрирующий опухоль лимфоцит (TIL) или хелперную T-клетку или

f) естественную клетку-киллера (NK) или T-клетку с функциями естественных киллеров (NKT).

9. Неприродная клетка по любому из пп. 1—8, где домен мультимеризации FRB и домен мультимеризации FKBP локализуются вне клетки, если экспрессируются в составе первого полипептида и второго полипептида.

10. Слитый полипептид, содержащий:

(a) первый полипептид, содержащий: полипептид домена мультимеризации FRB или его вариант; трансмембранный домен CD8 α или трансмембранный домен CD4; домен костимуляции CD137 и/или домен передачи первичного сигнала CD3 ζ ;

(b) сигнал расщепления полипептида; и

(с) второй полипептид, содержащий: антитело VHH к CD33, которое имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10; полипептид домена мультимеризации FKBP или его вариант и трансмембранный домен CD4 или трансмембранный домен CD8 α .

11. Слитый полипептид по п. 10, где домен мультимеризации FKBP представляет собой FKBP12, и/или полипептид FRB представляет собой FRB с T2098L.

12. Слитый полипептид по п. 10 или п. 11, где первый полипептид содержит сигнальный пептид, трансмембранный домен CD8 α ; домен костимуляции CD137 и домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

13. Слитый полипептид по любому из пп. 10—12, где второй полипептид содержит сигнальный пептид и трансмембранный домен CD4 и/или домен костимуляции.

14. Слитый полипептид по любому из пп. 10—13, где слитый полипептид содержит последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 32—41.

15. Слитый полипептид по п. 13 или п. 14, где домен костимуляции второго полипептида представляет собой домен костимуляции, выделенный из OX40 или TNFR2.

16. Слитый полипептид по любому из пп. 10—15, где слитый полипептид содержит последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 42—61.

17. Полинуклеотид, кодирующий первый или второй полипептид по любому из пп. 1—10 или слитый полипептид по любому из пп. 10—16.

18. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 17.

19. Вектор по п. 18, где вектор представляет собой лентивирусный вектор.

20. Клетка, содержащая слитый полипептид по любому из пп. 10—16.

21. Клетка по п. 20, где клетка представляет собой

a) гемопоэтическую клетку,

b) T-клетку, $\alpha\beta$ T-клетку или $\gamma\delta$ T-клетку,

c) клетку $CD3^+$, $CD4^+$ и/или $CD8^+$,

d) иммунную эффекторную клетку,

e) цитотоксический T-лимфоцит (CTL), инфильтрирующий опухоль лимфоцит (TIL) или хелперную T-клетку или

f) естественную клетку-киллера (NK) или T-клетку с функциями естественных киллеров (NKT).

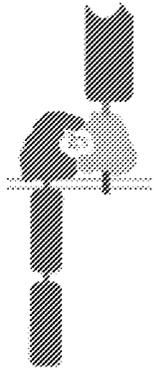
22. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку по п. 8 или п. 21.

23. Способ лечения субъекта, у которого имеется солидный рак или гематологическое злокачественное новообразование, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей клетку по п. 8 или п. 21.

24. Способ по п. 23, где рак представляет собой солидный рак, выбранный из группы, состоящей из рака легкого, плоскоклеточной карциномы, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака щитовидной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака пищевода, рака яичника, рака желудка, рака эндометрия или рака головного мозга.

25. Способ по п. 23, где гематологическое злокачественное новообразование представляет собой лейкоз, лимфому или множественную миелому.

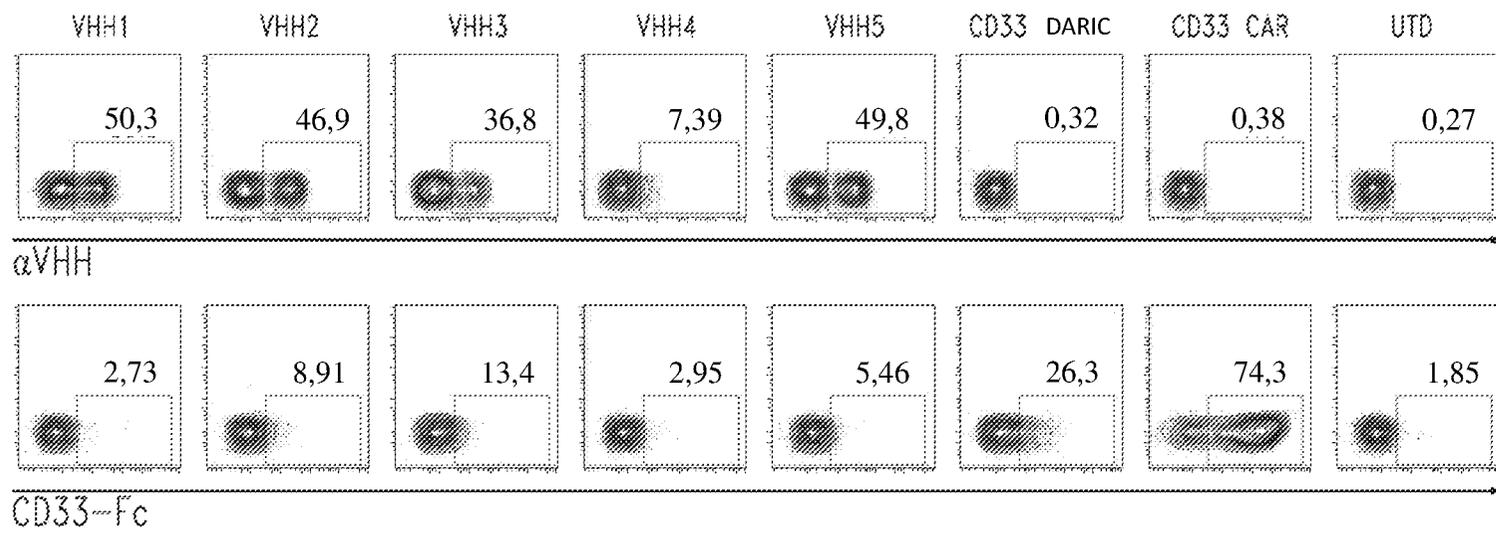
26. Способ по п. 23, где гематологическое злокачественное новообразование представляет собой острый миелогенный лейкоз (AML).



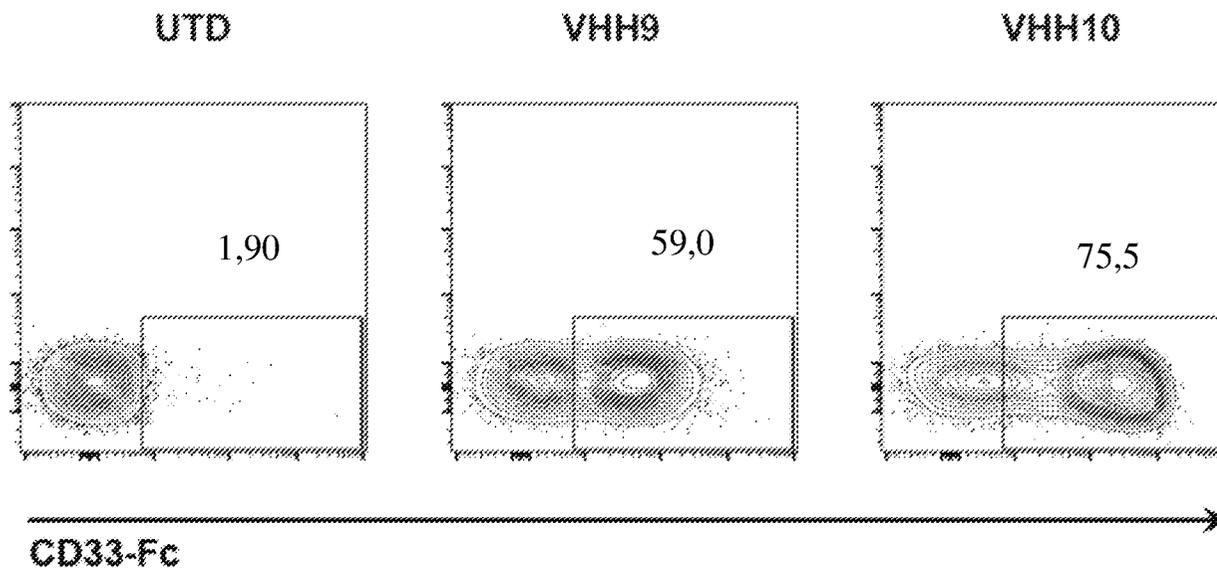
Фиг. 1А



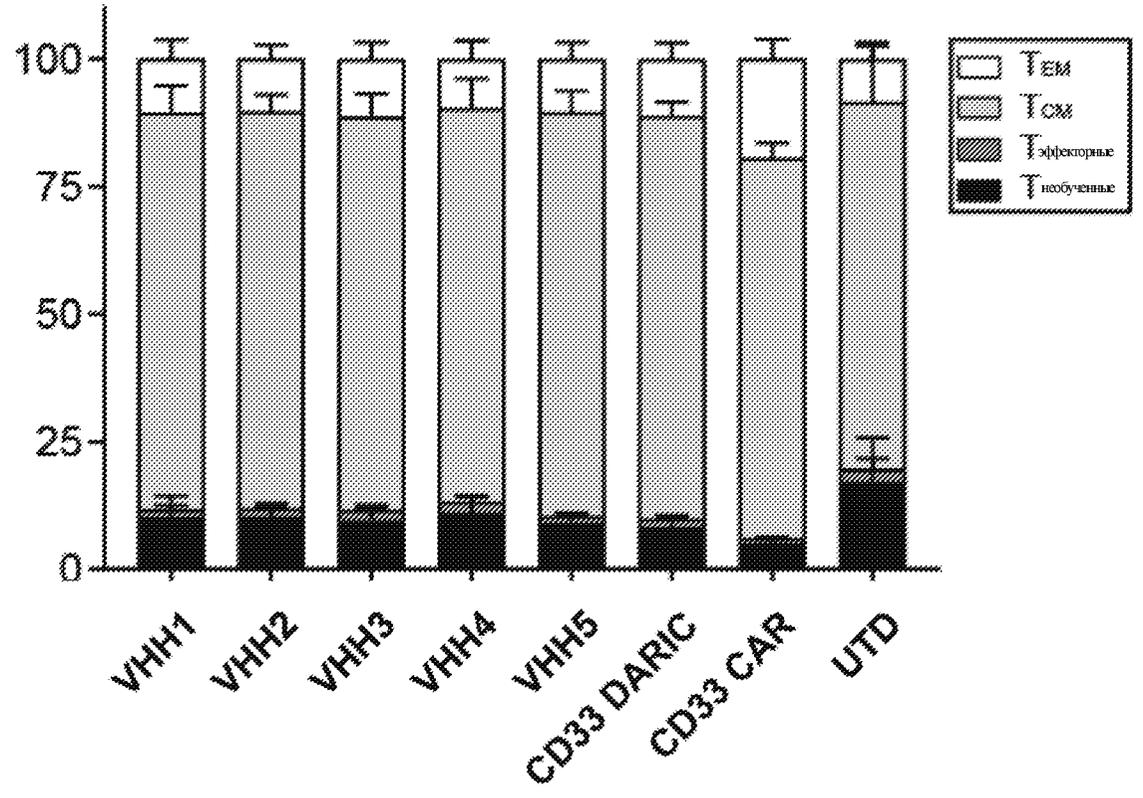
Фиг. 1В



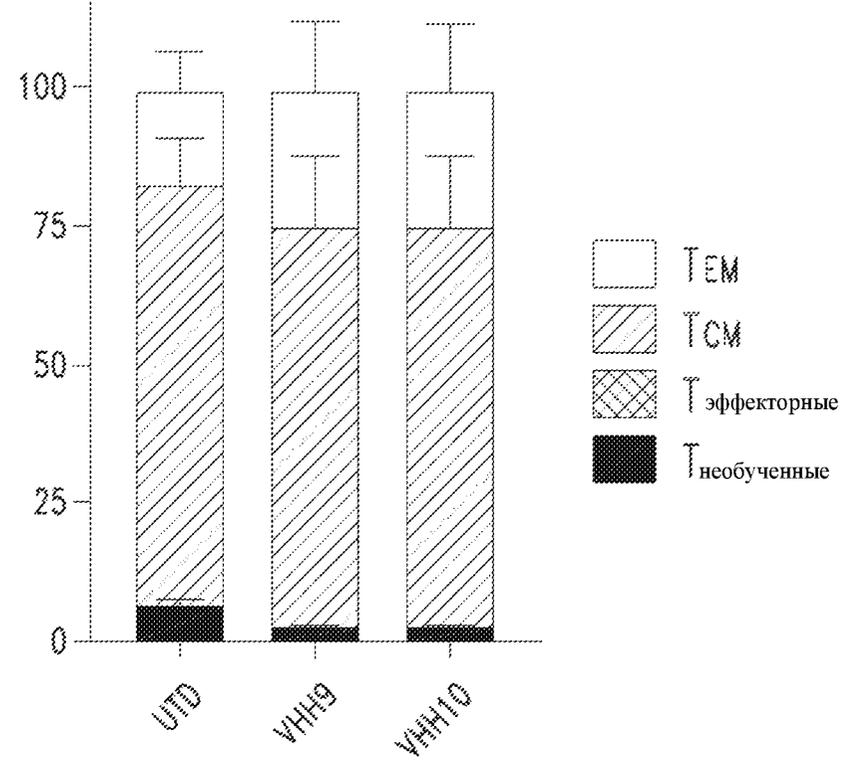
Фиг. 2А



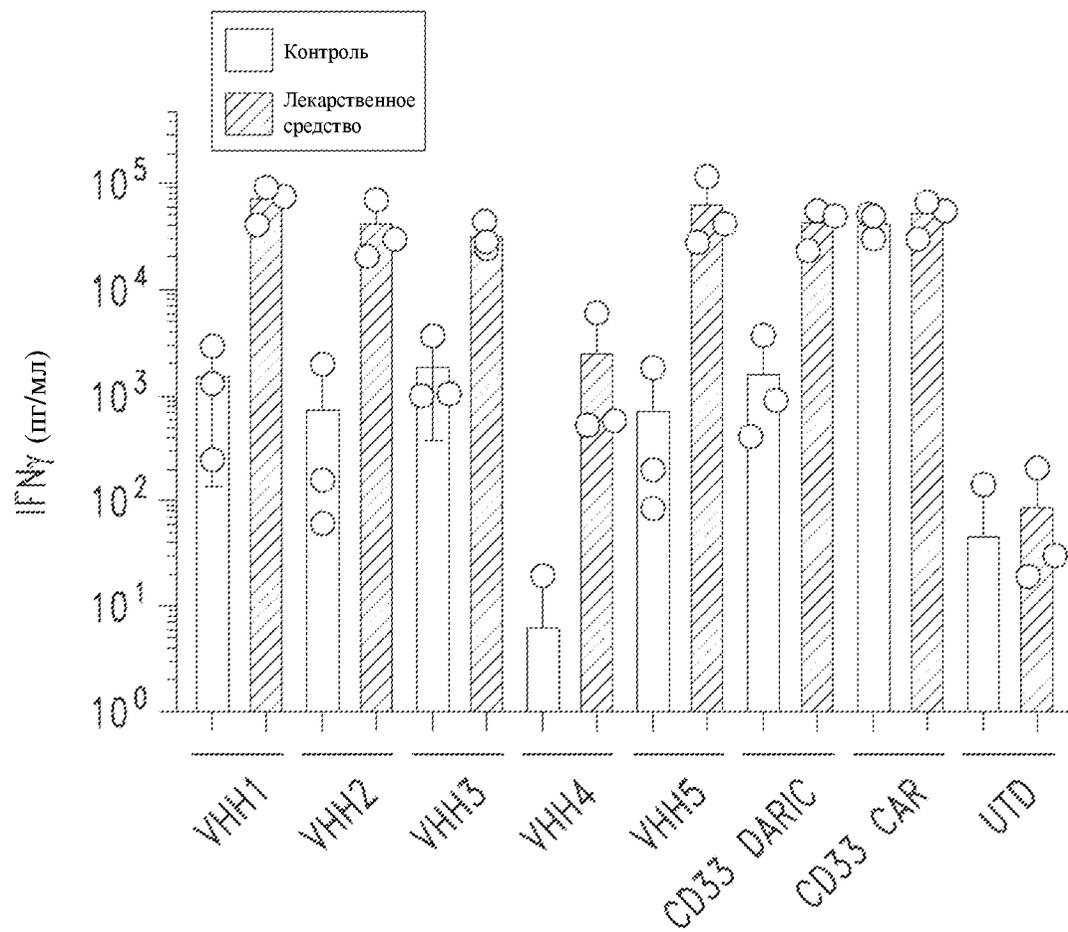
Фиг. 2В



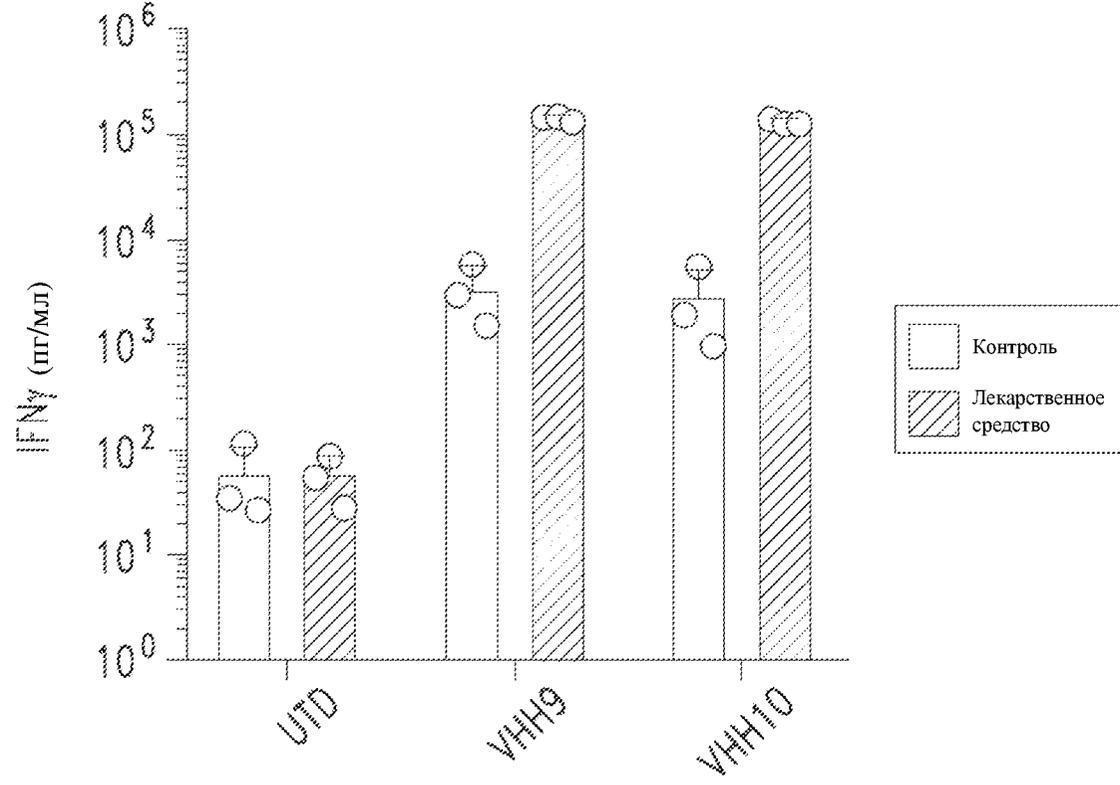
Фиг. 3А



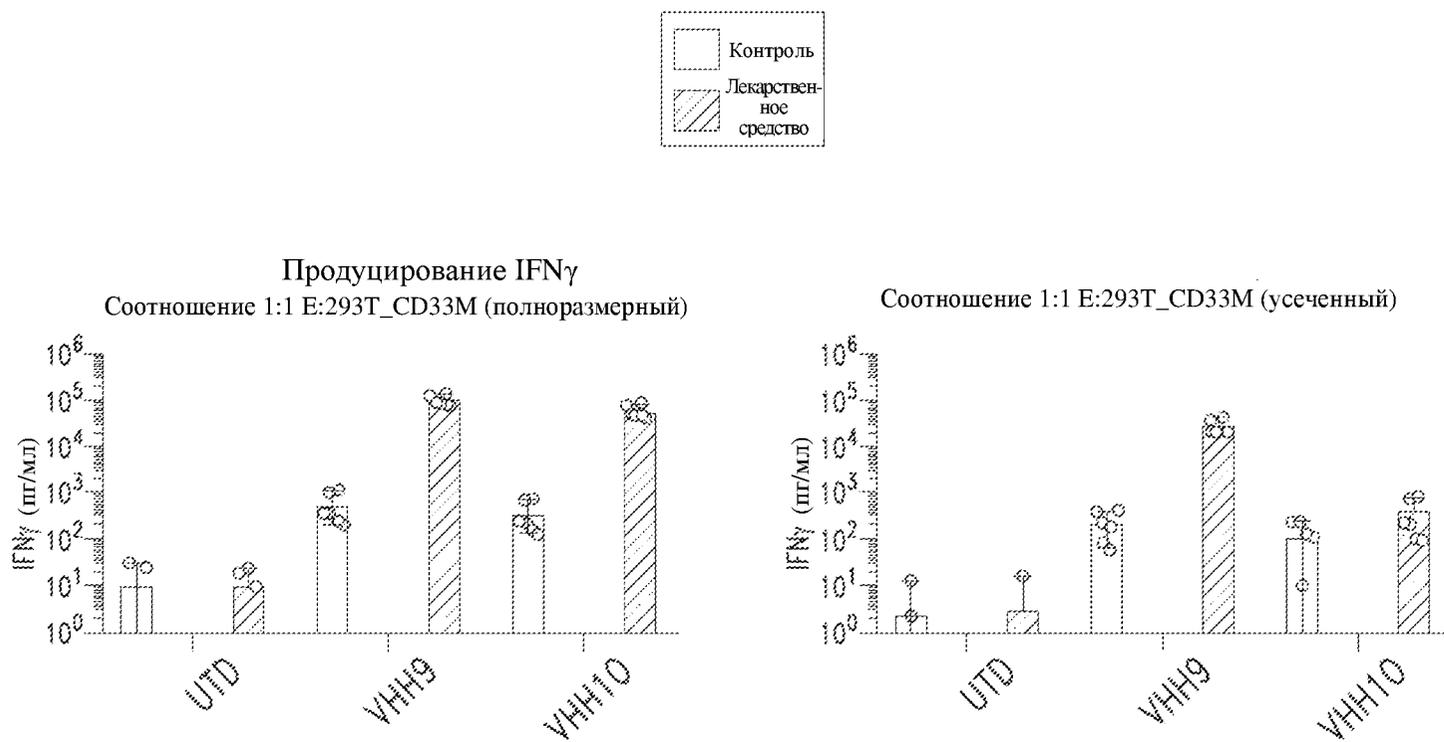
Фиг. 3В



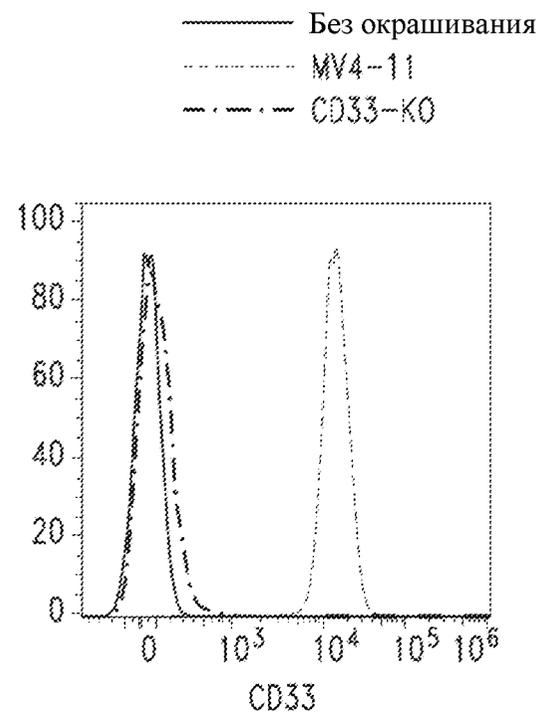
Фиг. 4А



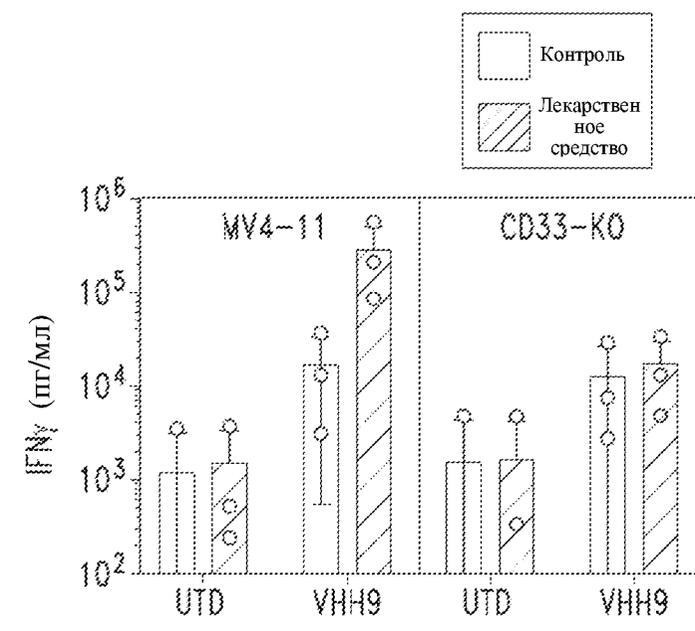
Фиг. 4В



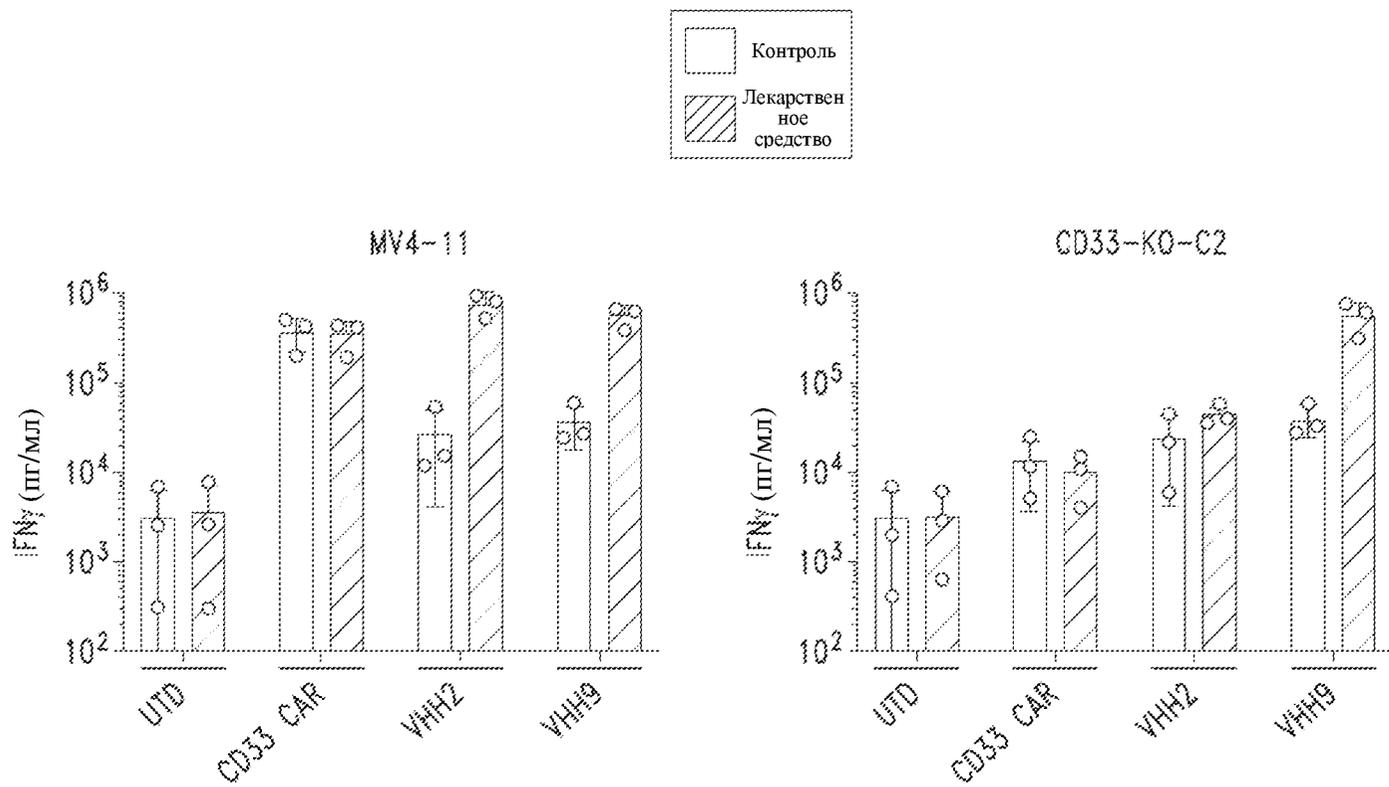
Фиг. 4С



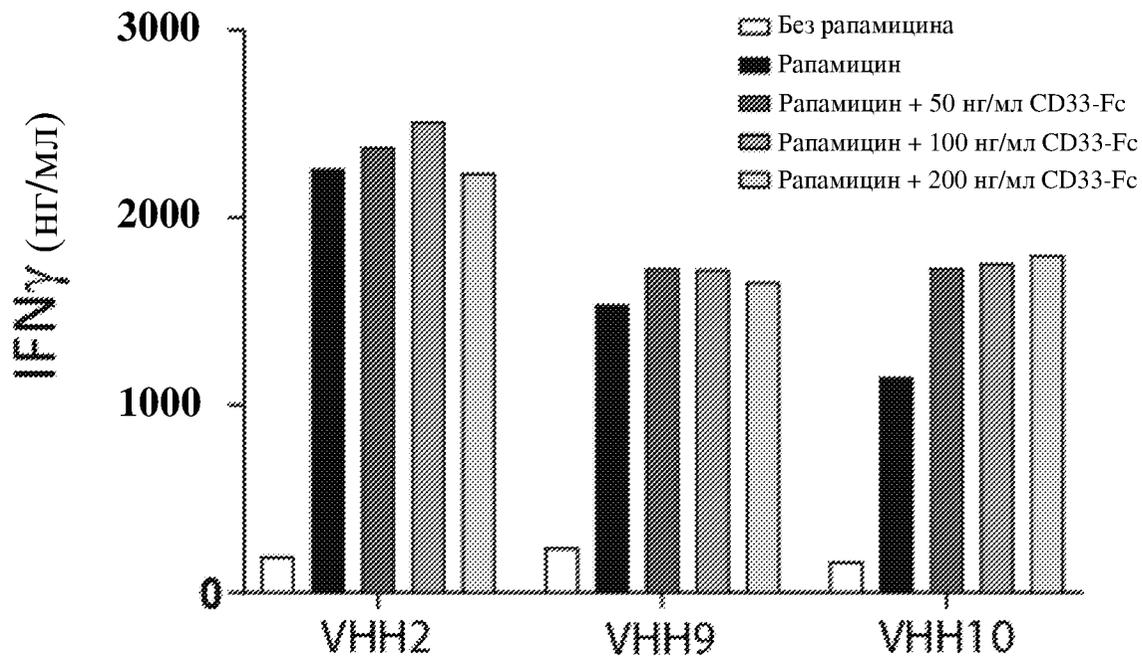
Фиг. 5А



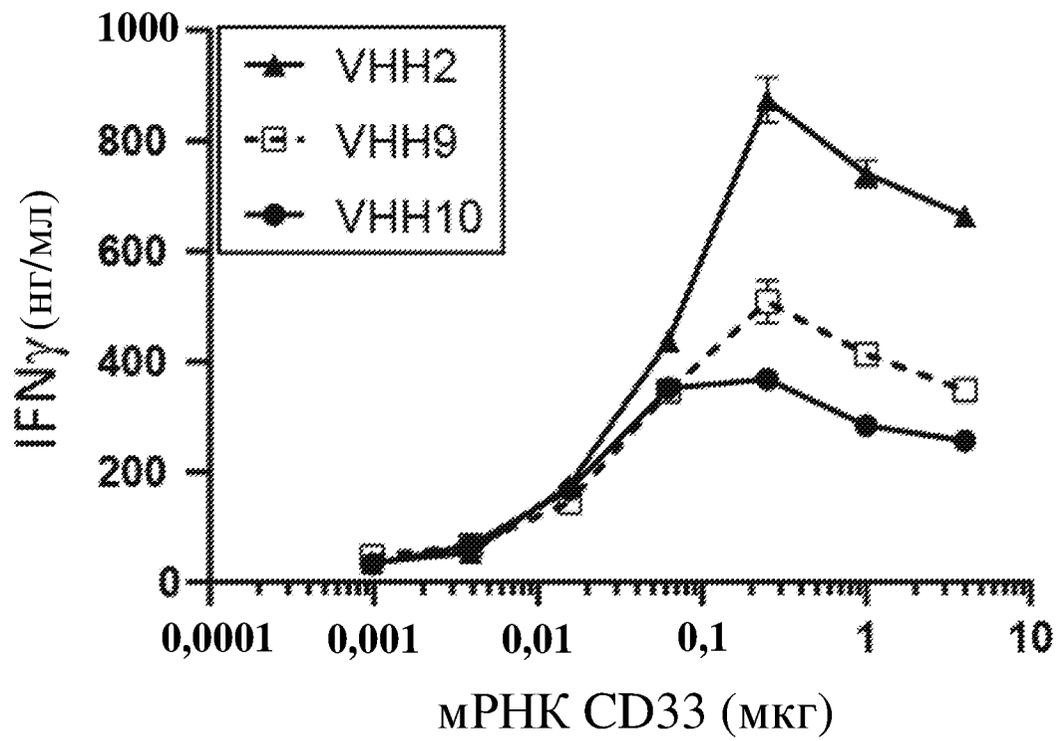
Фиг. 5В



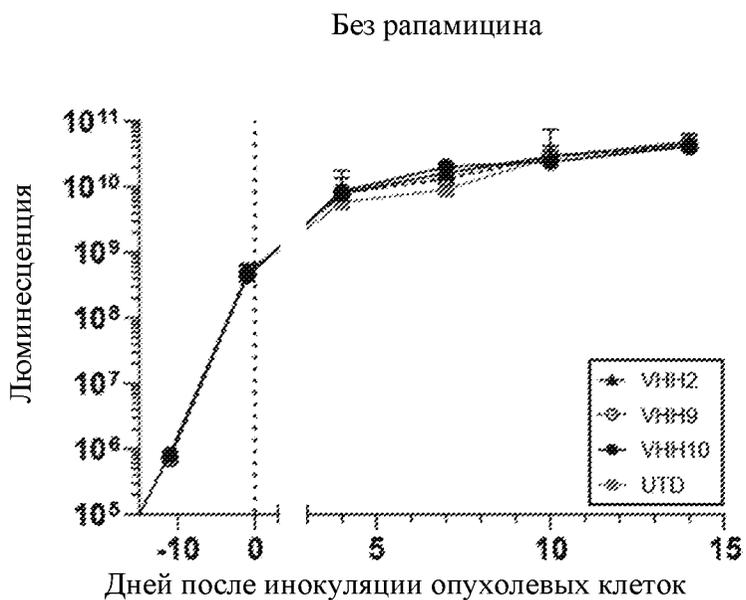
Фиг. 5С



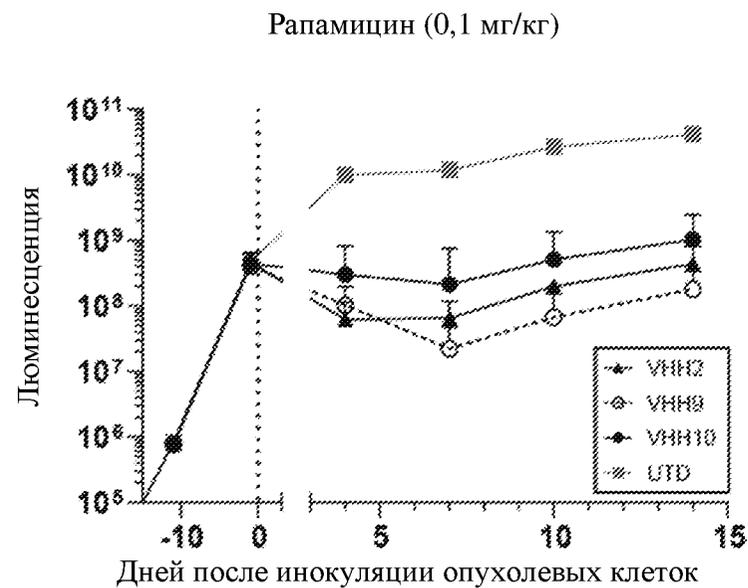
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8А



Фиг. 8В

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202490156А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
См. дополнительный лист

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, EAPATIS, Google, Reaxys

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 2016014576 A1 (NOVARTIS AG И ДР.) 2016-01-28 формула, реферат, пример 6, стр. 128-138	1-26
A	WO 2018175988 A1 (LENTIGEN TECHNOLOGY, INC. И ДР.) 2018-09-27 реферат, стр. 77, фиг. 10A, 10B	1-26
A	WO 2015142661 A1 (NOVARTIS AG И ДР.) 2015-09-24 стр. 7, 324, фиг. 1, 2, 5	1-26
A	WO 2015017214 A1 (BLUEBIRD BIO, INC.) 2015-02-05 формула, стр. 15	1-26
A	WO 2017032777 A1 (CELLECTIS) 2017-03-02 реферат	1-26
A	EA 201790624 A1 (НОВАРТИС АГ И ДР.) 2017-08-31 формула	1-26

 последующие документы указаны в продолжении графы

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

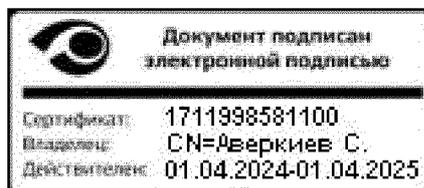
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 16 июля 2024 (16.07.2024)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202490156

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

МПК:

C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

СПК:

A61K 38/1709
A61K 39/4631
A61K 39/464411
C07K 14/7051
A61K 2039/505
C07K 2317/22
C07K 2317/569